

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

EVALUACIÓN DE DIFERENTES
PRETRATAMIENTOS EN LA DESLIGNIFICACIÓN DE
RESIDUOS DE COCO VERDE (Cocos nucifera) PARA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GENERACIÓN.

Tesis que presenta

BIOL, WENDY PRISCILA VÁRGUEZ NOH

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, junio 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y la Unidad de Energía Renovable, por dejarme ser parte de su comunidad estudiantil y permitirme el acceso a sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número 488083, para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias en Energía Renovable.

A mi director de tesis, Dr. Raúl Tapia Tussell, por guiarme durante el desarrollo de este trabajo, la confianza otorgada en todo momento, el tiempo dedicado y la paciencia para aclarar mis dudas, contribuyendo de esta manera tanto a mi formación académica como en mi desarrollo personal.

A cada uno de los miembros de mi comité tutoral: Dr. Luis Felipe Barahona Pérez y Dra. Sara Solís Pereira, por apoyarme con equipo y material de laboratorio para concluir el trabajo de investigación, así como sus aportes realizados, observaciones y sugerencias para el desarrollo del mismo.

A la Dra. Daisy Pérez Brito y a la Dra. Patricia Lappe Oliveras, por ayudarme a transmitir los resultados obtenidos de una manera más clara y entendible, por sus aportes, observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo de investigación.

A la IQ. Tanit Toledano Thompson por todo el apoyo prestado durante el desarrollo de este proyecto, por su asesoría en el uso adecuado de los materiales y el manejo correcto de los equipos de laboratorio, en especial por apoyarme con el uso del Microscopio Electrónico de Barrido.

Al M.C. Jorge Domínguez Maldonado por su apoyo e indicaciones en el manejo de equipos de laboratorio, por facilitarme material para realizar la fase experimental y explicarme la técnica de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR).

Al M.C. Martín Baas López por su apoyo en la obtención de datos mediante la técnica de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR).

Al QI. Santiago Duarte Aranda por facilitarme el material para llevar a cabo una parte de la fase experimental en este proyecto.

Al M.C. Carlos Vidal Cupul Manzano por el apoyo en el uso del equipo para procesar la materia prima.

A la Lic. Julia González Montilla por su apoyo administrativo durante mis estudios de maestría.

Al Laboratorio de Biocombustibles de la Unidad de Energía Renovable y al Laboratorio de Procesamiento de la Unidad de Materiales del CICY, y al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana del Instituto Tecnológico de Mérida.

A la M.C. Rubí Chablé Villacis y al M.C. Edgar Olguín Maciel, por todo su apoyo en cada etapa de este proyecto, por facilitarme literatura, explicarme pacientemente, ayudarme a tener mayor confianza en mí desempeño en el laboratorio, y hacerme sentir parte del equipo de trabajo.

A la M.C. Paola García Hernández por su ayuda con el uso de ciertos equipos y durante el proceso experimental, así como por todo el apoyo brindado en cada momento durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Alejandrina Pereira Patrón por su apoyo durante una parte de la fase experimental, por darme las indicaciones para usar correctamente los equipos y enseñarme técnicas diferentes técnicas de laboratorio.

A la M.C. Ingrid Jiménez Villareal por su asistencia durante la fase experimental de este trabajo.

A la LAE. Arely Bertha Ramírez González por su apoyo en la edición electrónica del documento.

A mis compañeros de la generación 2017-II por todo el apoyo y ánimos brindados durante el proceso de la maestría.

A mi equipo de trabajo y compañeros de laboratorio por el ambiente generado para un buen desarrollo de las actividades de esta investigación.

DEDICATORIA

Los resultados que logres serán en proporción directa al esfuerzo que apliques. Denis Waitley

Este trabajo está dedicado a mis padres Pedro Várguez y Ena Lina Noh, quienes siempre me han apoyado en cada decisión tomada, como fue el caso al estudiar un posgrado, aún a la distancia me acompañaron, me animaron y motivaron a no darme por vencida, enseñándome que siempre hay que luchar cuando se quiere algo, y la recompensa más grande es la satisfacción de sentir que se ha logrado. Les dedico cada esfuerzo y meta lograda, así como ellos se esforzaron cada día por hacerme un ser humano de bien, una persona dedica, responsable y perseverante.

A mis hermanos Pedro y Roger, por ser tan solidarios conmigo, por entenderme y comprenderme, porque el estrés que se vive al ser estudiante, me hace ser un poco distante, pero a pesar de todo, siempre están para mí.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	iv
LISTADO DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Demandas crecientes y alternativas de combustible	3
1.2 Concepto de biomasa	4
1.3 Biomasa lignocelulósica	7
1.3.1 Lignina	8
1.3.2 Hemicelulosa	9
1.3.3 Celulosa	10
1.3.4 Compuestos extraíbles	11
1.4 Bioetanol	11
1.5 Pretratamientos	13
1.5.1 Pretratamiento físico	14
1.5.2 Pretratamiento químico	15
1.5.3 Pretratamiento fisicoquímico	18
1.5.4 Pretratamiento biológico	22
1.6 Desintoxicación empleando lacasas	24
1.7 Hidrólisis enzimática	26
1.8 Fermentación	26
1.9 Palma de coco (Cocos nucifera L.)	27
1.10 Pretratamientos para obtención de bioetanol a partir de cáscara de coco	29
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

CA	PITULO II	35
MΑ	TERIALES Y MÉTODOS	35
2.1	Diagrama de flujo del diseño experimental	35
2.2	Preparación de la materia prima	36
2.3	Caracterización de la materia prima	36
2.4	Microorganismo	. 37
2.5	Producción del inóculo	. 38
2.6	Obtención del extracto enzimático crudo	38
2.7	Pretratamientos biológicos	39
	2.7.1 Pretratamiento biológico en estado sólido	39
	2.7.2 Pretratamiento biológico en medio líquido	40
2.8	Pretratamiento físico con ultrasonido	40
2.9	Pretratamientos fisicoquímicos	41
	2.9.1 Ultrasonido más extracto enzimático crudo de T. hirsuta Bm-2	41
	2.9.2 Ultrasonido más enzima comercial de Aspergillus sp	41
2.1	0 Análisis de la fracción líquida	42
	2.10.1 Cuantificación de fenoles	42
	2.10.2 Cuantificación de la actividad lacasa	42
	2.10.3 Cuantificación de azúcares reductores	42
2.1	1 Análisis de la fracción sólida	43
	2.11.1 Porcentaje de deslignificación	43
	2.11.2 Determinación de lignina insoluble	44
	2.11.2.1 Determinación de cenizas totales	44
	2.11.3 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	45
	2.11.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	45
2.1	2 Sacarificación	45
CA	PITULO III	47
RE:	SULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1	Caracterización de la materia prima	47
	3.1.1 Composición estructural de la fibra	48
3.2	Pretratamientos biológicos	49
	3.2.1 Pretratamiento biológico en estado sólido	49
	3.2.2 Pretratamiento biológico en medio líquido	53

BIL	IOGRAFÍA	. 74
COI	NCLUSIONES	. 73
3.5	Sacarificación de los pretratamientos físico y fisicoquímicos	. 72
3.4	Sacarificación de los pretratamientos biológicos	. 71
	3.3.2 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier	. 69
	3.3.1 Análisis de la deslignificación	. 67
3.3	Efecto de los pretratamientos físico y fisicoquímicos	. 63
	3.2.4 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier	. 61
	3.2.3 Análisis de la deslignificación	. 57

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Generación de biomasa [5]
Figura 1.2. Esquema de la estructura de la lignina que muestra los principales enlaces inter
unitarios entre los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico [22]
Figura 1.3. Esquema de la estructura de la hemicelulosa [24]
Figura 1.4. Esquema de la estructura de la celulosa [19]
Figura 1.5. Esquema del proceso de producción de bioetanol a partir de material
lignocelulósico [25]
Figura 1.6. Esquema de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica donde
se muestran las diferentes etapas del proceso, así como aquellas en las que la
deslignificación (DL) y la detoxificación (DT) por lacasa pueden ser aplicadas [22] 14
Figura 1.7. Compuestos inhibidores más comunes derivados de la lignina, celulosa, y
hemicelulosa, durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica [22]
Figura 2.1. Fibra de cáscara de coco verde
Figura 2.2. Colonia de Trametes hirsuta Bm-2 de tres días de crecimiento en medio de
extracto de malta agar, incubada a 35 °C
Figura 2.3. Inóculo de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 obtenido en medio YMPG
Figura 2.4. Extracto enzimático crudo de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 obtenido en buffer fosfatos
adicionado con salvado de trigo al 3 % (p/v)
Figura 3.1. Fibra de cáscara de $Cocos$ $nucifera$ L. con tamaño de partícula de 300-500 μm
obtenida después de molerla y tamizarla47
Figura 3.2. Fibra de coco verde en el pretratamiento biológico en estado sólido a diferentes
tiempos de incubación. a) Control (0 días); b) 7 días; c) 14 días; d) 21 días; e) 28 días. 50
Figura 3.3. Concentración de fenoles en mg de ácido gálico • mL-1 y actividad lacasa
obtenidos con el pretratamiento biológico en estado sólido a diferentes tiempos de
incubación
Figura 3.4. Cambios físicos en la fibra de coco verde después del pretratamiento en estado
sólido. a) Control (fibra sin inocular); b) 7 días
Figura 3. 5. Fibra de coco verde en el pretratamiento en medio líquido a diferentes tiempos
de incubación. a) 7 días; b) 14 días, c) 21 días; d) 28 días

Figura 3.6. Concentración de fenoles en mg de ácido gálico • mL-1 y actividad lacasa en U
• mL ⁻¹ obtenidos con el pretratamiento biológico en medio líquido a diferentes tiempos de
incubación
Figura 3.7. Cambios estructurales de la fibra de coco verde después del pretratamiento en
medio líquido con <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2
Figura 3.8. Comparación entre el % de sólidos recuperados después de los pretratamientos
biológicos y el crecimiento de Trametes hirsuta Bm-2 en los diferentes tiempos de
incubación (0, 7, 14 y 21 días) 58
Figura 3.9. Espectros FT-IR de las fibras de coco verde sin tratar y pretratadas
biológicamente, a los 7 días
Figura 3. 10. Concentración de fenoles, en mg de ácido gálico • mL-1, después de los
pretratamientos físico y fisicoquímicos
Figura 3.11. Actividad lacasa en U • mL-1 en la fracción líquida de los pretratamientos
fisicoquímicos
Figura 3.12. Micrografías de fibra de cáscara de coco verde después de los pretratamientos
físico y fisicoquímicos. a) Control (fibra sin tratar); b) Ultrasonido; c) Ultrasonido combinado
con extracto enzimático crudo de T. hirsuta Bm-2; d) Ultrasonido combinado con lacasa
comercial de Aspergillus sp
Figura 3.13. Concentración de azúcares reductores en g equivalentes de glucosa • L-1
obtenida a partir de las fibras de coco pretratadas física y fisicoquímicamente 67
Figura 3.14. Espectros FT-IR de las fibras sin tratar y las fibras pretratadas con ultrasonido,
ultrasonido combinado con un extracto crudo enzimático de enzima lacasa y ultrasonido
combinado con lacasa comercial
Figura 3.15. Concentración de azúcares fermentables de los pretratamientos biológicos
con Trametes hirsuta Bm-2 después de la hidrólisis enzimática. a) En estado sólido, b) en
medio líquido. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tiempos de
incubación (P<0.05, Prueba de Tukey)71

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos [19].	. 7
Tabla 1.2 Aplicación de lacasas en la desintoxicación de distintos materiales	
lignocelulósicos pretratados [22]	25
Tabla 3.1. Composición química de la fibra de coco reportada en distintos trabajos	48
Tabla 3.2. Concentración de azúcares después de los pretratamientos biológicos	56
Tabla 3.3. Reducción del contenido de lignina en los diferentes tiempos de los	
pretratamientos biológicos.	30
Tabla 3.4. Reducción del contenido de lignina en los pretratamientos físico y	
fisicoquímicos.	37

RESUMEN

El incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero, la naturaleza finita de las reservas de combustibles fósiles, y la creciente demanda de energía, ha impulsado la necesidad de buscar fuentes alternativas para su suministro. Una alternativa al uso de combustibles fósiles, es el bioetanol lignocelulósico, debido a que la materia prima es de gran disponibilidad y bajo costo. Sin embargo, al ser un material recalcitrante, requiere de un pretratamiento previo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar diversos pretratamientos biológicos, físico y fisicoquímicos en la deslignificación de residuos de coco (Cocos nucifera), para que las enzimas tengan mayor accesibilidad a la celulosa durante la sacarificación. En los pretratamientos biológicos, la disminución de la lignina fue directamente proporcional al tiempo del pretratamiento. La mayor deslignificación se registró con el pretratamiento de Trametes hirsuta Bm-2 en cultivo en medio líquido (43.44 ± 0.10 %, día 28), mientras que, en fermentación en estado sólido, la deslignificación fue de 37.77 ± 0.07 % (día 28). La menor deslignificación se obtuvo en el pretratamiento con ultrasonido (15.25 ± 0.12 %). Después de sacarificar todas las muestras pretratadas, el mejor resultado se obtuvo en la muestra pretratada en cultivo en medio líquido (agitación por 7 días), donde se registró una concentración de 9.57 ± 0.15 g • L-1 de glucosa. También fue en esta muestra en la cual se obtuvo el extracto enzimático crudo con mayor actividad lacasa (4,512.34 ± 98.14 U • mL⁻¹) después de 7 días de pretratamiento. Los subproductos obtenidos (lignina y extracto crudo enzimático) son importantes considerando el concepto de biorrefinería.

ABSTRACT

The increase in greenhouse gas emissions, the finite nature of fossil fuel reserves, and the growing demand for energy, has driven the need to search for alternative sources for its supply. An alternative to the use of fossil fuels, is lignocellulosic bioethanol, because the raw material is highly available and low cost. However, being a recalcitrant material, it requires a previous pretreatment. Therefore, the objective of this work was to evaluate various pretreatments, biological, physicochemical and physical, in the delignification of green coconut waste (Cocos nucifera), so that the enzymes have greater accessibility to cellulose during saccharification. The highest delignification was obtained with the pretreatment of Trametes hirsuta Bm-2 in liquid medium, where 43.44 ± 0.10 % of lignin was removed (day 28), followed by biological pretreatment in solid state with 37.77 ± 0.07 % (day 28). With the physicochemical pretreatments, using ultrasound in combination with laccases, the mean delignification was 20.63%, while with the ultrasonic pretreatment, the lowest delignification was obtained (15.25 ± 0.12 %). The best result, in the saccharification, was obtained with the biologically pretreated sample in liquid medium (shaking for 7 days), with a concentration of fermentable sugars of 9.57 ± 0.15 g • L⁻¹. It was also in this sample that the crude enzyme extract with the highest laccase activity was obtained (4,512.34 ± 98.14 U • mL⁻¹). The byproducts obtained (lignin and crude enzyme extracts) are important considering the concept of biorefinery.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los combustibles fósiles son la principal fuente de energía primaria a nivel mundial. Su uso ha generado altas concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) y otras emisiones contaminantes por la combustión de gas natural, carbón y derivados del petróleo, además de accidentes y derrames de petróleo durante su extracción, transporte o refinación, entre otros problemas, provocando impactos negativos en el ambiente [1,2]. En los últimos años, con el fin de disminuir dichos efectos, se ha impulsado a nivel mundial la búsqueda de fuentes alternativas de energía, como el desarrollo de biocombustibles a partir de la biomasa, la cual supone ventajas medioambientales de primer orden [2–5].

En México, de acuerdo a la Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética, publicada en el Diario Oficial el 28 de noviembre de 2008 [6], se establece que la Secretaría de Energía debe desarrollar un programa especial para la explotación de la energía renovable, plantear una estrategia nacional para la transición energética y el uso sostenible de esta energía amigable con el ambiente. Dentro de las nuevas alternativas de energía se encuentran las provenientes de fuentes solares, eólicas, hidráulicas, y geotérmicas para la generación de electricidad, y a partir de biomasa para biocombustibles [7]. Sin embargo, en México, está última no ha sido explotada completamente [2].

Los biocombustibles son una fuente renovable para los combustibles líquidos para el transporte, aunque se espera que en un futuro los automóviles eléctricos aumenten en demanda, los aviones y buques seguirán necesitando combustibles líquidos, por lo que una fuente prometedora para la producción de éstos es a partir de biomasa, esto debido a la gran disponibilidad con la que se cuenta. Por ejemplo, en México, en el 2010 se estimaron 75.7 millones de toneladas de biomasa seca provenientes de 20 cultivos diferentes, siendo las principales fuentes de residuos los cultivos de sorgo, maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de agave y pulpa de café [2].

De lo anterior surge la búsqueda de fuentes de materias primas sustentables para la generación de energía, sin olvidar la necesidad de proteger al medio ambiente, preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial de uso de

productos agrícolas, y en especial de los subproductos que estos generan al someterlos a distintos procesos agroindustriales, cuya disposición final representa una gran problemática ambiental y económica debido a que los costos de recolección, transporte y destino final son cada vez mayores [3,8]. Una de las materias primas considerada como fuente potencial importante y prometedora para la producción de biocombustibles es la lignocelulósica (de la cual se obtiene bioetanol de segunda generación), debido a que es abundante, barata y su uso es ecológico, sin embargo, presenta altos costos de procesamiento [2,3,9–13].

El pretratamiento del material lignocelulósico es necesario, debido a que se requiere romper la lignina, para obtener celulosa y hemicelulosa que serán luego hidrolizadas, mediante un proceso enzimático, en azúcares fermentables [10]. Los procesos de pretratamiento se consideran eficientes si logran romper la mayor cantidad de lignina y si las enzimas pueden hidrolizar la mayor cantidad de celulosa [3,10]. También se debe considerar que el aporte de energía debe ser bajo y la recuperación de los carbohidratos debe ser alta para que sea un proceso rentable. El proceso de eliminación de la lignina tiene un alto costo y es de baja eficiencia, lo que impide que el proceso de obtención de bioetanol a partir de materia lignocelulósica sea económicamente competitivo en México. Por lo que se requiere de continuas propuestas en el mejoramiento de los procesos, encontrar enzimas adecuadas, o realizar pretratamientos a nuevas fuentes de biomasa [3,13,14].

México está nuevamente reactivando la producción y consumo de coco para su empleo en cosméticos, aceites, fibras, obtención de compuestos (como carbón activado) [15], lo cual generará un aumento en los residuos de coco. Al ser éstos un residuo agroindustrial lignocelulósico con potencial para la producción de bioetanol de segunda generación (2G), en este trabajo se evaluaron diferentes pretratamientos (biológicos, físico y fisicoquímicos) en cáscaras de coco verde, con el objetivo de contribuir a la investigación de nuevas fuentes de biomasa, para producción de bioetanol de 2G, al proponer una materia prima que no compite con la producción de alimentos y dar una alternativa de uso para este residuo.

CAPITULO I ANTECEDENTES

Actualmente se están buscando combustibles energéticos alternativos, distintos a los obtenidos del petróleo, lo cual ha llevado al uso de diversas materias primas para la producción de biocombustibles, entre los cuales destaca el bioetanol. Entre las materias primas que se consideran con potencial para la producción de bioetanol están los subproductos o residuos lignocelulósicos que se generan de distintos procesos agroindustriales que, aunque son ricos en polímeros de celulosa y hemicelulosa (75-80 %), contienen gran cantidad de lignina, la cual dificulta su aprovechamiento. Mediante diferentes pretratamientos químicos, físicos y/o biológicos es posible disminuir la recalcitrancia de dicha biomasa y hacer más accesible la celulosa, para luego desdoblarla en azúcares simples que serán fermentados para obtener bioetanol. Por lo anterior, actualmente se realizan investigaciones para determinar qué pretratamientos, que sean viables y económicos, puedan aplicarse en la biomasa lignocelulósica [3,16].

1.1 Demandas crecientes y alternativas de combustible

El consumo de energía por habitante por año de un país o región, es un índice directamente relacionado con su desarrollo social y nivel de vida. El aumento de la población demanda cada vez más energía, por lo que se espera que la demanda mundial de energía se duplique en los próximos 20 años. De un consumo de 12 Giga toneladas en el 2007, este probablemente aumente a 24 para el 2025, lo que obligará a la búsqueda de alternativas viables, sostenibles y acorto plazo para solucionar el problema de abasto [17].

Existen varias alternativas para la sustitución progresiva de los combustibles fósiles como son el empleo de la energía hidráulica, eólica, nuclear, solar (directa y fotovoltaica), la obtención de combustibles a partir de la biomasa y más recientemente la obtenida de las mareas, así, poco a poco el empleo de energías limpias ha ido en aumento [3].

En el caso del aprovechamiento de la biomasa, el combustible líquido que más se ha desarrollado y ha recibido más atención como posible sustituto de la gasolina es el

bioetanol, esto derivado o debido a la experiencia acumulada a lo largo de los años para su obtención, la posibilidad de mezclarlo con gasolina en diferentes proporciones, y utilizar dichas mezclas en los motores convencionales de combustión interna sin la necesidad de realizar grandes cambios, además de poder emplear la infraestructura existente para la distribución de la gasolina. Así, la producción de bioetanol está destinada principalmente a sustituir de forma parcial la gasolina y el diésel en el sector de transporte. En la producción de este combustible destacan Estados Unidos de Norteamérica y Brasil [1,17,18].

En México una de las alternativas como materia prima para la producción de bioetanol son los residuos agroindustriales, ya que de los 76 millones de toneladas de materia seca (MtMS) de residuos que se produjeron en el país a partir de los principales cultivos en 2006, entre 7 y 16 MtMS correspondieron a residuos agroindustriales o secundarios obtenidos del procesamiento postcosecha (bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave y pulpa de café, entre otros). Estos podrían brindar un potencial energético de entre 100 y 125 PJ/año [1]. Para el 2010 se estimó una producción de 75.7 MtMS de 20 cultivos diferentes, siendo las principales fuentes de residuos los cultivos de sorgo, maíz, bagazo de caña de azúcar, bagazo de agave y pulpa de café nuevamente. Si se identifican los municipios con potencial alto en producción de biomasa, se podrían hacer estimaciones precisas de su disponibilidad y capacidad de producción de bioenergía, a partir de los residuos de cultivos [2].

1.2 Concepto de biomasa

Comúnmente se denomina como biomasa a la materia orgánica (de origen vegetal, animal o procedente de la transformación natural o artificial de la misma) para producir energía [5,17]. Esta abarca un amplio grupo de diversos materiales como son: residuos del aprovechamiento forestal y cultivos agrícolas; residuos de podas de jardines; residuos de industrias agroforestales; cultivos energéticos; residuos de origen animal o humano (Figura 1.1) [1]. La Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), utiliza la definición de la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 para catalogar la biomasa como todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización, entre estos últimos están el carbón, el petróleo y el gas [5].

La energía de la biomasa es energía solar almacenada a través de la fotosíntesis, proceso por el cual algunos organismos vivos, como las plantas, utilizan la energía solar para convertir los compuestos inorgánicos que asimilan (como el CO₂) en compuestos orgánicos como la glucosa. La energía solar transformada en energía química en la fotosíntesis, se acumula en diferentes compuestos orgánicos (polisacáridos, grasas y otros) a lo largo de toda la cadena trófica, incluido el hombre (Figura 1.1) [5].

FOTOSÍNTESIS RESIDUOS ANIMALES RESIDUAS AGRICOLAS Y FORESTALES CULTIVOS ENERGÉTICOS BIOMASA

Figura 1.1. Generación de biomasa [5].

Considerando el origen de la biomasa esta se puede clasificar en: biomasa vegetal, animal y residual.

Biomasa vegetal: como su nombre lo indica, incluye a toda la biomasa de procedencia vegetal, a la biomasa lignocelulósica y a los productos de la agricultura que contienen azúcares, almidones y proteínas, como granos, frutos y otros. La biomasa vegetal se puede clasificar como: biomasa natural, la cual es producida en ecosistemas naturales como bosques, selvas, sábanas etc. sin la intervención humana; en cultivos energéticos, los cuales son campos de cultivo donde se produce un tipo de especie concreto con la única

finalidad de su aprovechamiento energético, y se caracterizan por una gran producción de materia viva por unidad de tiempo; y en biomasa residual la cual se puede dividir en:

- Residuos agrícolas: Estos son los provenientes de los residuos de cultivos leñosos y de cultivos herbáceos. Los residuos de cultivos leñosos presentan marcada estacionalidad, esto debido al momento de su producción como por la necesidad de retirarlos del campo en el menor tiempo posible para no interferir con otras tareas agrícolas, y evitar la propagación de plagas o incendios. Los residuos de cultivos herbáceos, generados por las industrias agrícola y agroalimentaria, no pueden ser considerados estrictamente como tales, ya que en muchas ocasiones son realmente subproductos que se emplean como materia prima en otras industrias.
- Residuos forestales: Se originan en los tratamientos y aprovechamientos de las masas vegetales, tanto para la defensa y mejora de éstas como para la obtención de materias primas para el sector forestal (madera, resinas, etc.). Los residuos generados en las operaciones de limpieza, poda, y tala de los montes pueden utilizarse para usos energéticos dadas sus excelentes características como combustibles.

<u>Biomasa animal</u>: como su nombre lo indica, es la que se obtiene a través de la cadena trófica de los seres vivos que se alimentan de la biomasa vegetal.

<u>Biomasa residual</u>: Es todo desecho de materia orgánica proveniente de los seres vivos, ya sea por vía natural o debido a la intervención de las tecnologías del hombre. Incluye los residuos de la industria agrícola y forestal, los residuos sólidos urbanos y los residuos biodegradables (efluentes ganaderos, lodos de depuradoras y aguas residuales urbanas). Los residuos orgánicos que a menudo se consideran un subproducto, pueden llegar a cobrar un valor muy importante en los procesos productivos. Dependiendo de donde se originen los residuos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Residuos industriales: Son aquellos residuos derivados de la producción industrial con posibilidades de generación de biomasa energética residual, como la industria maderera o agroalimentaria.
- Residuos urbanos: Son residuos de carácter orgánico producidos diariamente y en grandes cantidades en los núcleos urbanos de población pudiéndose distinguir dos

formas de los mismos: residuos sólidos, los cuales son generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques; y en aguas residuales, líquidos procedentes de la actividad humana, especialmente en la que se halla materia fecal y orina de los seres humanos o de animales, cuya parte sólida contiene una cantidad relevante de biomasa residual.

1.3 Biomasa lignocelulósica

Es la biomasa vegetal más abundante en la tierra, está constituida principalmente por celulosa (20-55 %), hemicelulosas (16-85 %), lignina (15-40 %) [19], proteínas (5-10 %) [20], compuestos extraíbles (mezcla de diferentes compuestos orgánicos) y algunos compuestos inorgánicos, que se transforman en cenizas después de la combustión del material. La celulosa, hemicelulosas y lignina, en general representan más del 75 % del material vegetal, y están constituidos por polímeros orgánicos de alto peso molecular [4,20,21]. Para lograr un mejor aprovechamiento del material lignocelulósico es importante conocer sus características generales y propiedades particulares. A continuación, en la Tabla 1.1, se presenta la composición química de diferentes materiales lignocelulósicos:

Tabla 1.1. Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos [19].

Biomasa lignocelulósica	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Tallos de maderas duras	40-55	24-40	18-25
Tallos de madera blanda	45-50	25-35	25-35
Cáscaras de frutos secos	25-30	25-30	30-40
Mazorcas de maíz	45	35	15
Gramíneas	25-40	35-50	10-30
Paja de trigo	30	50	15

La biomasa lignocelulósica se puede obtener de los bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y otros residuos industriales como los de la industria maderera, residuos de la industria del papel y el papel reciclado [13,18,19]. Cada fuente de biomasa tiene potencial para la producción de bioetanol, lo que depende del tipo y cantidad de carbohidratos

presentes en ella [18,20]. Los materiales lignocelulósicos, tienen la ventaja de ser biodegradables, y renovables, y son el resultado del proceso de fotosíntesis de los vegetales mediante la energía solar. Bajo este enfoque, su empleo como combustible representa una forma sostenible y amigable con el medio ambiente de aprovechamiento de la energía solar [10].

1.3.1 Lignina

La lignina es el componente más importante presente en la pared celular de la planta madura. Es un heteropolímero condensado de alto peso molecular y estructura constituida por tres diferentes unidades de fenilpropano (alcohol sinapílico, alcohol coniferílico y alcohol p-cumarilíco) que se mantienen unidos por distintos enlaces. La estructura polimérica de la lignina se entrelaza con las microfibrillas de celulosa y también se une a las de hemicelulosa y pectina mediante enlaces de tipo éster. El resultado es una red hidrofóbica que rodea los demás componentes de la pared celular proporcionándole mayor resistencia, rigidez y protección contra ataques microbianos (Figura 1.2) [13,17,21].

La lignina residual, proveniente del aprovechamiento de la celulosa, puede ser utilizada por su alta densidad de energía debido a sus numerosos enlaces carbono-carbono, en procesos térmicos o como intermediario para la obtención de productos químicos, como el benceno, a través de procesos de hidrogenación. Sin embargo, su uso principal es como materia prima, para la combustión o gasificación, en una biorrefinería integrada para la generación de calor y electricidad. Por lo tanto, la biomasa lignocelulósica con alto contenido de lignina es deseable cuando se considera su uso en combustión para generar electricidad. Por el contrario, la lignina puede afectar negativamente el rendimiento de azúcares fermentables, obtenidos después de una sacarificación enzimática, debido a que su degradación es difícil [19].

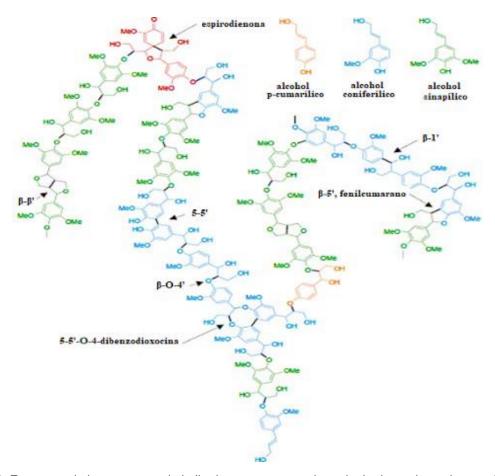


Figura 1.2. Esquema de la estructura de la lignina que muestra los principales enlaces inter unitarios entre los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico [22].

1.3.2 Hemicelulosa

Es un carbohidrato complejo y heterogéneo que en su estructura posee diferentes azúcares como pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (manosa, glucosa y galactosa), entrelazadas entre sí glucosídicamente (Figura 1.3). Las hemicelulosas se encuentran ramificadas; son amorfas y poco polimerizadas debido a que no pueden formar puentes de hidrógeno [17,20]. Se conocen diferentes tipos de hemicelulosas en las plantas: xilanos, mananos, glucanos, galactanos y galacturanos [17]. La hemicelulosa se hidroliza más fácilmente en comparación con la celulosa debido a su naturaleza ramificada y amorfa. Los azúcares dominantes en las hemicelulosas son manosa en maderas blandas y xilosa en maderas duras y residuos agrícolas [17,21,23].

Figura 1.3. Esquema de la estructura de la hemicelulosa [24].

1.3.3 Celulosa

Es un polímero de cadena lineal constituido por moléculas de D-glucosa, que se unen entre sí por enlaces β-1,4; disposición que la hace estable además de poseer enlaces de hidrógeno que une sus moléculas entre sí, confiriéndole propiedades que le permiten ser un buen material estructural de la pared celular. La base de la estructura de la celulosa es la unidad de anhidroglucosa (Figura 1.4) en conformación química de silla, el número de unidades de glucosa determina el grado de polimerización. Cada cadena de celulosa está ligada a otras mediante enlaces de hidrógeno lo que le aporta rigidez. Si los enlaces de hidrógeno son pocos, la celulosa es amorfa, mientras que una disposición especial, más organizada y simétrica de estos enlaces generan casi siempre diferentes formas cristalinas. Así, la celulosa puede presentarse en cuatro macro estructuras cristalinas denominadas I, II, III, y IV. Las dos primeras son las más importantes que hay que considerar para el establecimiento de los pretratamientos sobre los materiales lignocelulósicos [13,17].

Figura 1.4. Esquema de la estructura de la celulosa [19].

1.3.4 Compuestos extraíbles

Se denominan extractivos a los compuestos orgánicos de bajo peso molecular que están presentes en los materiales lignocelulósicos y que pueden extraerse con solventes orgánicos (como cloroformo, benceno, etanol) o mezclas de ellos (etanol-benceno, cloroformo-metanol, etanol-agua). Las resinas son extractivos característicos de las maderas, y están compuestas por terpenos, lignanos y otros compuestos aromáticos, grasas, ceras, ácidos grasos, y alcoholes, serpentinas, taninos y flavonoides. Los extractivos representan en general entre el 4 y 10 % del peso total del material lignocelulósico [21].

1.4 Bioetanol

El etanol o alcohol etílico es el más conocido de los alcoholes y puede obtenerse por procesos químicos a partir del etileno, o bien por procesos bioquímicos empleando azúcares fermentables provenientes de la caña de azúcar, cultivos con almidón, celulosa y otros tipos de biomasa [25]. Al etanol producido a partir de biomasa se le conoce como bioetanol, y su uso como combustible para automóviles se remonta a inicios del siglo XX, cuando Henry Ford diseñó el modelo Ford T (1908-1927), que podía utilizar etanol como combustible [1].

El proceso bioquímico convencional de producción de bioetanol consiste en la conversión de la biomasa en azúcares fermentables, la fermentación de estos azúcares y la posterior separación y purificación del bioetanol. A estos procesos se les conoce como de primera generación. Los residuos orgánicos o subproductos generados por actividades agroindustriales y agrícolas son reservorios de energía "sólida", que pueden convertirse en energéticos líquidos como el bioetanol lignocelulósico a partir de tecnologías llamadas de segunda generación que requieren de un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Figura 1.5). Dicha biomasa contiene un alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes que se encuentran juntos, tanto en plantas gimnospermas como angiospermas.

La lignocelulosa se encuentra de forma natural en árboles y hierbas, y como residuo de cultivos agrícolas como rastrojo, pajas, bagazo, entre otros [1,16,25]. Actualmente el etanol se ha propuesto como una alternativa entre los biocombustibles para el sector del transporte, ya que tiene el potencial para aumentar la seguridad energética, mejorar el impacto medioambiental y ayudar a satisfacer la creciente necesidad energética [20].

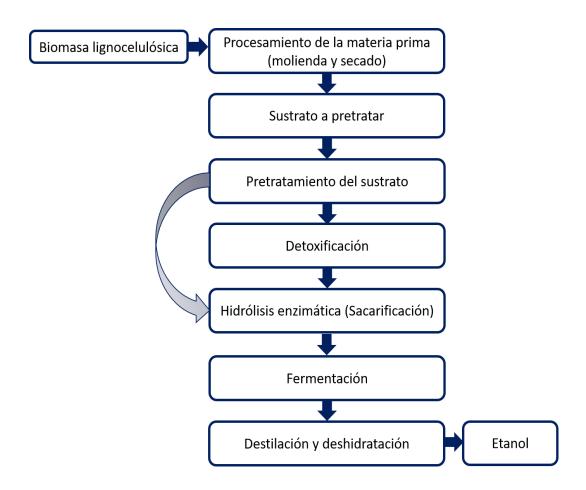


Figura 1.5. Esquema del proceso de producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico [25].

1.5 Pretratamientos

La estructura y composición química de la biomasa lignocelulósica, la hace recalcitrante y difícil de hidrolizar por las enzimas, lo que hace necesario llevar a cabo un pretratamiento previo para realizar una hidrólisis enzimática eficiente. El principal objetivo del pretratamiento es separar o eliminar la lignina porque ésta evita el ataque enzimático o microbiano de la celulosa y la hemicelulosa debido a la estrecha relación entre estas [26].

La efectividad del pretratamiento dependerá del tipo de pretratamiento que se realice y de la materia prima [27]. Adicionalmente es necesario retirar la lignina porque esta sustancia inhibe el proceso de fermentación. La mejora en la hidrólisis enzimática, por lo tanto, dependerá de la modificación en el grado de polimerización y el índice de cristalinidad, a la interrupción de los enlaces lignina-carbohidrato, a la eliminación de la lignina y la hemicelulosa, así como del aumento en la porosidad del material.

Por ejemplo, con los pretratamientos biológicos, se elimina la lignina, mientras que, con el pretratamiento de explosión de vapor, la lignina solo se distribuye, y con el pretratamiento hidrotérmico, se solubiliza parcialmente. Con la oxidación húmeda y con el pretratamiento ácido se solubiliza la hemicelulosa, y con la explosión de la fibra de amoníaco (AFEX) se puede reducir la cristalinidad de la celulosa.

El pretratamiento debe cumplir con ciertos requisitos: I) aumentar la obtención de azúcares fermentables, ya sea después del pretratamiento o de la hidrólisis enzimática, II) evitar la degradación o la pérdida de carbohidratos, III) evitar la formación de subproductos inhibidores de la hidrólisis y de la fermentación como fenoles, furfural, ácido levulínico entre otros [19,22], y IV) ser económicamente viable [4,13,17,26].

En la Figura 1.6, se muestran diferentes etapas del proceso de conversión de materia lignocelulósica en la producción de bioetanol, y los principales puntos de en los que puede llevarse a cabo la deslignificación o detoxificación por lacasas.

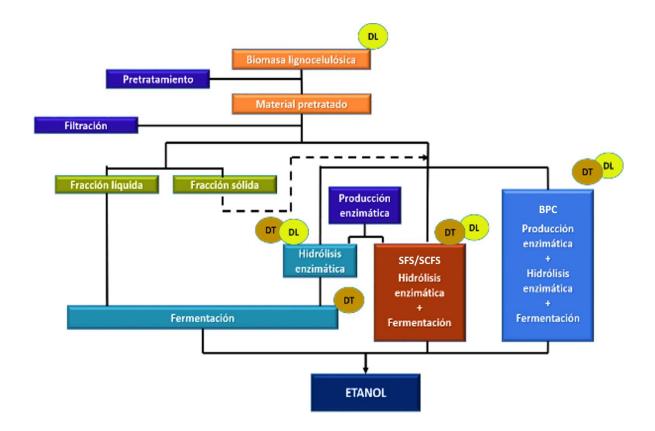


Figura 1.6. Esquema de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica donde se muestran las diferentes etapas del proceso, así como aquellas en las que la deslignificación (DL) y la detoxificación (DT) por lacasa pueden ser aplicadas [22].

Durante las últimas décadas, han surgido diferentes tipos de pretratamiento para la biomasa lignocelulósica y su conversión a bioetanol de segunda generación. Esos procesos generalmente se clasifican en pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos [27,28]. También se pueden aplicar una combinación entre estos para obtener mejores resultados.

1.5.1 Pretratamiento físico

El pretratamiento físico, mediante la aplicación de fuerzas físicas o mecánicas y diferentes tipos de irradiaciones [29], permite reducir el tamaño de partícula o interrumpir la regularidad estructural de los materiales lignocelulósicos con el objetivo de disminuir el grado de

polimerización de la celulosa y la lignina, así como de aumentar la superficie accesible para las enzimas [28].

Pretratamiento mecánico: Este pretratamiento mediante diversos molinos, permite la trituración o molienda de materiales duros o fibrosos. El tamaño de partícula obtenido dependerá del método aplicado. Sin embargo, con la molienda se pueden obtener tamaños de partícula de 10-30 mm y de 0.2-2 mm. La reducción del tamaño de la biomasa lignocelulósica aumenta el área de superficie accesible del material y reduce la cristalinidad de la celulosa [29]. La molienda no elimina la lignina de la biomasa lignocelulósica, lo que restringe la actividad enzimática, por lo que, generalmente, se utiliza este pretratamiento en combinación con otros [28].

Irradiación: La irradiación es otro tipo de pretratamiento físico, en el que se incluyen los pretratamientos por rayos gamma, haz de electrones y microondas [23,27], para separar los enlaces glucosídicos de las moléculas de celulosa, mejorando la hidrólisis enzimática. El calentamiento de la biomasa lignocelulósica, en el proceso de irradiación por microondas, es desde el interior hacia el exterior, lo cual produce un aumento de la temperatura y la presión dentro de la biomasa, provocando rupturas en la estructura de la biomasa [29]. Sin embargo, suele ser un pretratamiento caro y no se puede aplicar en los procesos industriales. Debido a que la irradiación no puede eliminar la hemicelulosa o la lignina de los materiales lignocelulósicos, o reducir su tamaño de partícula, la irradiación generalmente se usa como coadyuvante en otros procesos de pretratamiento [30].

1.5.2 Pretratamiento químico

En los pretratamientos químicos se utilizan diferentes tipos de compuestos químicos, principalmente ácidos y bases bajo diferentes condiciones. El principio de los pretratamientos químicos consiste en que, mediante diferentes tipos de sustancias químicas, se puede modificar la estructura del material lignocelulósico, generando la solubilización de la lignina y una separación de la hemicelulosa y la celulosa [29]. El efecto de los pretratamientos químicos depende del tipo de método aplicado y las características de la biomasa lignocelulósica. Los altos costos de los productos químicos y las inversiones

en equipos, suelen ser un obstáculo para la implementación de estos pretratamientos a gran escala [30].

- a) Pretratamiento alcalino: Es el método comúnmente empleado para remover la lignina y la hemicelulosa de los materiales lignocelulósicos. Durante este pretratamiento los enlaces éster de la hemicelulosa y la lignina se rompen; además se eliminan los grupos de acetato de la hemicelulosa. Lo cual permite la solubilización de la hemicelulosa y la lignina para dejar expuesta la celulosa a las enzimas. En este tipo de pretratamiento se utilizan soluciones alcalinas como NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃ y amoniaco acuoso, a bajas temperaturas y presiones comparado con otras condiciones de pretratamiento para material lignocelulósico [26,27]. La efectividad de este pretratamiento depende del contenido en la lignina, ya que una biomasa con un contenido superior al 26 %, tiende a disminuir la efectividad [29]. Este pretratamiento permite solubilizar la lignina [27], pero requiere realizar una neutralización antes de la hidrólisis enzimática y lavar la biomasa pretratada para eliminar los inhibidores formados durante el pretratamiento [31].
- b) Pretratamiento ácido: En este proceso químico se usa el H₂SO₄, HCI, H₃PO₄ y HNO₃ para solubilizar parcialmente la hemicelulosa de los materiales lignocelulósicos, y mejorar accesibilidad de las enzimas a la celulosa [21,27]. De los compuestos químicos mencionados, el H₂SO₄ es el ácido más usado en este tipo de pretratamiento. Algunos ácidos orgánicos (ácido fumárico o maleico) se usan como ácidos alternativos para mejorar la hidrólisis de la celulosa, además de reducir la producción de inhibidores [21]. El pretratamiento ácido puede llevarse a cabo a utilizando ácidos diluidos a temperaturas altas (100-200 °C) y tiempos de reacción entre 5-300 min o empleando ácidos concentrados a bajas temperaturas (menores a 60 °C) y mayores tiempos de reacción [32] . Éste último es probable que cause degradación severa de la celulosa, una alta concentración de inhibidores y corrosión grave del equipo, por lo que es menos utilizado [26–28]. Con el pretratamiento ácido se solubiliza la hemicelulosa y se obtienen altos rendimientos en la hidrolisis enzimática de la celulosa, pero se generan inhibidores de la fermentación (furanos, ácidos carboxílicos, derivados de fenol) [31,32].
- c) Deslignificación oxidativa: Durante este pretratamiento la biomasa lignocelulósica se expone a temperaturas de 170-200 °C durante 5-15 min [27], pero también se pueden

realizar a temperaturas más bajas (50-100 °C) aumentando los tiempos de reacción (1-30 h) [33]. En este pretratamiento se utilizan compuestos oxidantes como O₃, O₂, H₂O₂, ClO₂, NaClO y Cl₂ que, mediante la formación de radicales libres causan la degradación de la lignina [30] con . En este tipo de pretratamiento es importante el control de la temperatura y el pH para evitar la degradación de los carbohidratos y la formación de inhibidores como el furfural y el hidroximetilfurfural [33]. Una de las principales ventajas de este pretratamiento es la disminución en la formación de inhibidores [27], sin embargo el costo del proceso resulta ser más elevado comparado con los pretratamientos tradicionales, por lo que se emplea como coadyuvante de otros pretratamientos [30].

- d) Tratamiento con organosolventes: Este proceso requiere el uso de solventes orgánicos como etanol, metanol, etilenglicol, acetona, algunos ácidos orgánicos (ácido fórmico y ácido acético) para extraer la lignina y hacer más accesible la celulosa de los materiales lignocelulósicos [34,35]. El etanol es uno de los solventes más empleados por su baja toxicidad y fácil recuperación [30]. Se deben recuperar los solventes mediante las técnicas apropiadas de extracción y separación como la evaporación y condensación para evitar que sean inhibidores de la hidrólisis enzimática o la fermentación [27] y para reducir costos del proceso, se deben reciclar los solventes al ser de un alto precio comercial [33]. Los principales efectos del pretratamiento con organosolventes como etanol y acetona son: aumento en el área de superficie accesible de los materiales lignocelulósicos al solubilizar la lignina y solubilización de hemicelulosa [35], además de obtener lignina como un subproducto de alto valor agregado. La eliminación de lignina minimiza las cargas enzimáticas empleadas en la hidrólisis enzimática. Para aumentar la deslignificación este pretratamiento se puede combinar con ácidos como el HCl y H2SO4 a temperaturas de 185-210 °C [27]. Su principal desventaja es el elevado costo del proceso comparado con otros procesos de pretratamiento [31].
- e) Pretratamiento con líquidos iónicos: Los líquidos iónicos son sales que están en fase líquida a una temperatura tan baja como la temperatura ambiente [31]. Existen una gran variedad de líquidos iónicos con propiedades que varían de acuerdo a los cationes y aniones que los forman [30]. Este pretratamiento permite alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica solubilizando la celulosa a temperaturas inferiores a 100 °C y con la posibilidad de recuperar casi el 100 % de los líquidos iónicos. Los líquidos iónicos son

solventes con bajos puntos de fusión, altas polaridades y altas estabilidades térmicas amigables con el ambiente, que pueden recuperarse y reutilizarse [27,31], además de que pueden emplearse como solventes selectivos de la lignina o celulosa, lo que resulta en la separación de la lignina y el aumento de la accesibilidad a la celulosa bajo condiciones ambientales, evitando la formación de compuestos inhibidores. A pesar de su potencial en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, los líquidos iónicos aún son demasiados caros para emplearse en el sector industrial [31].

1.5.3 Pretratamiento fisicoquímico

En los procesos fisicoquímicos, existen efectos ocasionados por la combinación de la acción física (cambio de temperatura, presión, etc.) y la adición de sustancias químicas (empleo de ácidos, bases, solventes, etc.), que modifican estructuralmente la biomasa lignocelulósica, facilitando su aprovechamiento [29].

- a) Explosión con vapor catalizado: Es uno de los métodos fisicoquímicos más utilizados para pretratar materiales lignocelulósicos [30]. Durante este proceso la biomasa es impregnada con SO₂ o H₂SO₄ [30,34,36], y sometida a altas temperaturas (180-240 °C) por inyección de vapor a presión (1700-4500 kPa) durante un tiempo variable (desde segundos a varios minutos). El pretratamiento finaliza con una descomprensión rápida [23,28]. Durante este proceso, la lignina y la hemicelulosa pueden ser descompuestas y removidas del material lignocelulósico en diferentes grados [30]. Inhibidores como los compuestos aromáticos y los subproductos de deshidratación se forman en condiciones de explosión de vapor severas [29], lo que afecta el proceso de fermentación, por lo que se requiere un paso de lavado para la desintoxicación [30]. Es un pretratamiento efectivo para maderas duras y residuos agrícolas [36].
- **b) Pretratamiento hidrotérmico catalizado:** El pretratamiento hidrotérmico a temperaturas entre 100-220 °C degrada las hemicelulosas y aumenta la cristalinidad de las fibras de celulosa pretratadas. A temperaturas de 240 °C la celulosa se solubiliza parcialmente [37]. Se han desarrollado pretratamientos hidrotérmicos catalizados para eliminar lignina o la hemicelulosa y optimizar la recuperación de azúcares [30]. Por ejemplo, el pretratamiento hidrotérmico adicionado con H₂SO₄ permite eliminar de manera eficiente

la hemicelulosa empleando altas cargas de sólidos (20%). El pretratamiento hidrotérmico con NaOH permite remover la lignina, reducir el grado de polimerización y de cristalinidad de la celulosa. Los inhibidores se generan de acuerdo al grado de severidad en el que se realice el pretratamiento hidrotérmico. La formación de inhibidores como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural aumenta conforme aumenta la temperatura y el tiempo de pretratamiento [37]. La principal ventaja de este pretratamiento es la solubilización de la hemicelulosa y mediante compuestos catalizadores degradar la lignina, sin embargo, se requiere de equipo costoso, siendo está su principal desventaja.

- c) Proceso de explosión de fibra con amoniaco (AFEX): Este pretratamiento se lleva a cabo con amoníaco líquido, a temperatura moderada (60-90 °C) [28,30,31,34], en rangos de tiempo entre 10-60 min [31], principalmente se emplean tiempos de reacción de 30 min [28,31,33,38] a presiones entre 40 y 50 atm [31]. En este pretratamiento se reduce rápidamente la presión como en el pretratamiento de explosión de vapor [38]. Durante este proceso se pueden modificar los enlaces estructurales entre la lignina y la hemicelulosa, además de provocar la hinchazón [33] y disminuir la cristalinidad de la celulosa [34]. Este proceso es más efectivo en biomasa lignocelulósica con bajo contenido de lignina como residuos agrícolas y cultivos herbáceos, siendo poca efectiva para biomasa leñosa con alto contenido de lignina [33,34]. El amoníaco es un químico no corrosivo, no contaminantes que se debe reciclar para disminuir los costos del proceso. Una de las principales ventajas es que no genera inhibidores, por lo que no requiere de un proceso de lavado, pero su principal desventaja es el costo de operación debido al costo del amoníaco y el proceso de reciclaje [33].
- d) Pretratamiento hidrotermal con agua caliente líquida (LHW) o Termohidrólisis: En este pretratamiento el agua se aplica a presión para mantener el agua en estado líquido a temperaturas elevadas (160-249 °C) y provocar alteraciones en la estructura de la lignocelulosa [16]. En este proceso, cuando la temperatura sube a más de 170 °C, el agua actúa como un ácido y cataliza reacciones hidrolíticas [29,39], por lo que no es necesario el empleo de otros catalizadores o productos químicos, y tampoco requiere una descompresión rápida. El objetivo del agua caliente líquida es solubilizar principalmente la hemicelulosa, hacer que la celulosa sea más accesible y evitar la formación de inhibidores [40]. La alta demanda de agua y energía limitan su uso a nivel comercial [33].

- e) Pretratamiento ultrasónico en fluidos: El pretratamiento ultrasónico en fluidos (como solventes orgánicos, líquidos iónicos, agua destilada, entre otros), es una alternativa potencial a los pretratamientos convencionales de la biomasa lignocelulósica [41]. El ultrasonido de alta energía o "ultrasonido de potencia" tiene un rango de frecuencia de 16 a 100 kHz., lo que proporciona energía (en forma de ondas de sonido), para generar modificaciones en la biomasa lignocelulósica suspendida en el líquido. Las ondas ultrasónicas crean diferencias de presión dentro del fluido para mejorar los procesos físicos (mecanoacústicos) y químicos (sonoquímicos) [42]. Durante la sonicación se forman unas microburbujas de cavitación, que van creciendo hasta implosionar, y liberar energía en forma de ondas de choque que se propagan a través del fluido [43]. El colapso de las burbujas de cavitación provoca un aumento de la temperatura y la presión. La cavitación genera la ruptura de enlaces de la lignina y la hemicelulosa, generando microfracturas en la biomasa lignocelulósica. Los efectos de la presión y el calor generados por el ultrasonido de alta frecuencia (100 kHz a 1 MHz), generan radicales libres en el fluido que promueven reacciones hidrolíticas, y provocan la despolimerización de la lignina [41].
- f) Pretratamiento con CO₂ supercrítico (SC-CO₂): El método se basa en la utilización de CO₂ como fluido supercrítico (sustancias que bajo determinadas condiciones se encuentran en un estado con propiedades intermedias entre líquido y gas), es decir que se encuentra en condiciones de temperatura y presión superiores a su punto crítico [34]. El SC-CO₂ puede difundirse a través de espacios intermedios como gas y materiales disueltos como líquido. En solución acuosa, el CO₂ forma ácido carbónico, lo que favorece la hidrólisis de los polímeros. Las moléculas de CO₂ son comparables en tamaño al agua y al amoníaco y pueden penetrar de la misma manera en los pequeños poros de la lignocelulosa. Este mecanismo se ve facilitado por la alta presión. Después de la liberación explosiva de la presión de CO₂, se observa la interrupción de la estructura de celulosa y hemicelulosa, en consecuencia, aumenta el área de superficie accesible del sustrato para el ataque enzimático [16]. Este pretratamiento no causa formación de inhibidores, pero para modificar la lignina se requiere la adición de compuestos como co-solventes, por ejemplo el etanol y altos requerimientos de presión [34,38].

Como se mencionó anteriormente, durante estos tipos de pretratamiento, generalmente se requieren altas presiones y temperaturas y/o la adición de químicos y/o solventes. Estas

duras condiciones de pretratamiento conducen a la degradación de la biomasa y la generación de diferentes inhibidores enzimáticos (principalmente compuestos fenólicos) e inhibidores microbianos (ácidos débiles, derivados del furano y fenoles) (Figura 1.7), lo que limita los pasos posteriores de sacarificación y fermentación [44].

Los inhibidores se van generando cuando los diferentes compuestos de la biomasa lignocelulósica se van desdoblando a compuestos más simples. Durante los procesos de pretratamiento, cuando ocurre la ruptura de la cadena de celulosa, se obtienen las moléculas de glucosa, que pueden deshidratarse y generar compuestos inhibidores como el hidroximetilfurfural (HMF) que, bajo ciertas concentraciones de ácidos, se fragmenta originando ácido levunílico y ácido fórmico.

Cuando la hemicelulosa se degrada, se generan hexosas, que pueden deshidratarse a HMF, mientras las pentosas pueden deshidratarse, originando furfural y se puede generar ácido acético a partir de los grupos acetilo de la hemicelulosa, y otras pequeñas cantidades de ácidos (ácido glucurónico, ácido metil glucurónico y ácido galacturónico) [19], las cuales en altas concentraciones generan ácido fórmico. De la degradación de la lignina se obtienen diferentes compuestos fenólicos, como el ácido 4-hidroxibenzoico, el ácido 4-hidroxibenzaldehído, la vainillina, el ácido ferúlico, el siringaldehído y el ácido cumárico (Figura 1.7) [22]. Los compuestos inhibidores que se generen dependerán del tipo de pretratamiento que se realice, así como de la composición y del tipo de biomasa lignocelulósica.

Los efectos que causan los compuestos inhibidores generados por el proceso de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, afectan las etapas posteriores. Los derivados de furano son los principales inhibidores durante la fermentación. Mientras que los fenoles son los principales compuestos inhibidores de las enzimas hidrolíticas durante la sacarificación [22].

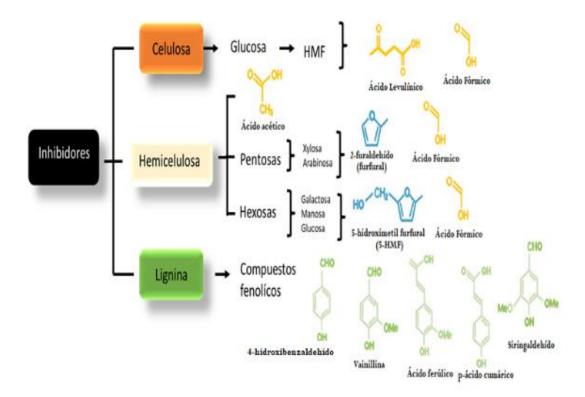


Figura 1.7. Compuestos inhibidores más comunes derivados de la lignina, celulosa, y hemicelulosa, durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica [22].

1.5.4 Pretratamiento biológico

Es un pretratamiento asociado con algunos microorganismos como los hongos y bacterias capaces de producir enzimas que pueden convertir la biomasa lignocelulósica en compuestos que sean accesibles para realizar la hidrólisis enzimática [31]. Los microorganismos como los hongos de la podredumbre parda atacan principalmente a la celulosa, mientras que los hongos de la podredumbre blanca y blanda degradan tanto a la celulosa como a la lignina.

La degradación de la lignina por hongos de la podredumbre blanca ocurre por la acción de las enzimas lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa [45]. La producción de estás enzimas se ven influidas por las fuentes de carbono y nitrógeno. Los hongos de este

tipo de podredumbre son los más efectivos para el pretratamiento biológico de la biomasa lignocelulósica [46].

Algunas especies selectivas de hongos de la podredumbre blanca secretan una variedad de compuestos no enzimáticos y de bajo peso molecular, como el ácido 3-hidroxianantranílico, el alcohol veratrílico y ácidos carboxílicos, que atacan la lignina directamente o median enzimas ligninolíticas como la polifenol oxidasa, la manganeso peroxidasa y la lacasa, mejorando la eliminación indirecta de la lignina.

Los hongos como *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phellimus pini*, *Phlebia* spp., *Pleurotus* spp., *Trametes versicolor* y *Trametes hirsuta* degradan preferentemente la lignina, mientras que los hongos, como *Hererobasidium annosum* e *Irpex lacteus* descomponen simultáneamente todos los componentes de biomasa lignocelulósica [47]. Otro tipo de pretratamiento biológico es el procedimiento enzimático, donde se emplean enzimas puras de una enzima o una mezcla de enzimas derivadas de los mismos organismos que en el pretratamiento con hongos [31].

Las enzimas ligninolíticas se pueden obtener mediante procesos biológicos de cultivo en estado sólido (estacionario) o en medios líquidos (con agitación). El proceso biológico en estado sólido para la obtención de enzimas ligninolíticas consiste en emplear un sustrato que actúe como fuente de carbono/energía y se lleva a cabo en ausencia de agua libre, mientras que, el proceso biológico en medio líquido, como su nombre lo indica requiere de una cantidad suficiente de líquido para que el sustrato empleado se encuentre sumergido [48]. Los pretratamientos biológicos pueden combinarse con otros pretratamientos como son el ácido o alcalino diluido, organosolventes o pretratamientos térmicos para aumentar los rendimientos de azúcares y reducir los tiempos de reacción [49].

Los pretratamientos biológicos se llevan bajo condiciones de baja demanda de energía, condiciones ambientales moderadas y sin ningún compuesto químico. Sin embargo, es un proceso más tardado en comparación con los otros tipos de pretratamiento. La aplicación directa de las enzimas es costosa por lo que no es un pretratamiento atractivo para realizar a escala industrial [31].

1.6 Desintoxicación empleando lacasas

Las lacasas se han usado en gran medida para disminuir la toxicidad de diferentes sustratos pretratados (Tabla 1.2). Estas enzimas catalizan la oxidación selectiva de compuestos fenólicos que generan radicales fenoxi inestables sin afectar los derivados de furano y ácidos alifáticos. Estos radicales fenoxi interactúan más entre sí, y conducen a la polimerización en compuestos aromáticos con menor capacidad inhibidora [50].

Es importante resaltar que no todos los compuestos fenólicos son susceptibles a la oxidación por lacasas, por lo que los mecanismos de acción de estás enzimas están determinados por la estructura de los diferentes compuestos fenólicos. La actividad de las lacasas hacia los fenoles se mejora por la presencia de sustituyentes donadores de electrones en el anillo y estos sustituyentes disminuyen el potencial electroquímico de los fenoles correspondientes [22].

La estructura de los fenoles, el potencial redox de las lacasas, la viscosidad del medio donde se lleva a cabo la detoxificación, el tiempo de pretratamiento y la carga enzimática son factores que afectan la eficiencia de la lacasa. La lacasa puede agregarse en cargas enzimáticas bajas o altas, dependiendo de la optimización del proceso y el tipo de material. La detoxificación se puede realizar con enzimas parcial o totalmente purificadas. Las condiciones de pH y temperatura para realizar los tratamientos de detoxificación con lacasa dependerán de la fuente de la cual provengan [22].

El alto costo de la producción de las enzimas para la desintoxificación es una de las limitantes más importantes para su aplicación a escala industrial. Por lo que un enfoque alternativo para agregar directamente la lacasa a los materiales pretratados podría ser mediante ingeniería genética, para que la levadura fermentativa produzca la lacasa. Lo anterior permitiría realizar la detoxificación y la fermentación simúltanea, reduciendo el costo y el tiempo asociado al proceso de producción de lacasa y al paso de detoxificación [22].

Tabla 1.2 Aplicación de lacasas en la desintoxicación de distintos materiales lignocelulósicos pretratados [22].

Pretratamiento	Tratamiento con lacasa	Efectos observados	Beneficios obtenidos	Referencia
Explosión de vapor en paja de trigo.	Pycnoporus cinnabarinus o Trametes villosa	Remoción de fenoles identificados para ambas lacasas (vanillina, siringaldehído, ácido ferúlico y pácido cumárico) del 93-95 %.	En el proceso de fermentación con <i>Kluyveromyces marxianus</i> CETC 10875, acorta la fase LAG y mejora los rendimientos de etanol.	80
Explosión de vapor con SO ₂ en sauce.	Trametes versicolor	Remoción de compuestos fenólicos (93-95 %), revelando un mecanismo de polimerización oxidativa por análisis SEC.	Mayor crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , aumento en su tasa de consumo de glucosa, y mayor producción y rendimiento de etanol.	81
Explosión de vapor con ácido diluido en abeto.	T. versicolor	Remoción de compuestos fenólicos (93-95 %).	Mayor rendimiento de etanol producido por <i>S. cerevisiae</i> comparado con lo obtenido después de detoxificación con cromatografía de intercambio aniónico en pH 10.	37
Explosión de vapor con agua-ácido en paja de trigo.	T. versicolor o Cariolopsis rigida	93-95 % de remoción de compuestos fenólicos.	Reducción de los efectos tóxicos sobre <i>S. cerevisiae</i> , resultando en un mayor crecimiento de las levaduras y una mejora en la producción de etanol.	76
Explosión de vapor en bagazo de caña.	T. versicolor	Aproximadamente un 80 % de compuestos fenólicos removidos.	Mejoras en el rendimiento del etanol al usar <i>S. cerevisiae en</i> hidrolizados detoxificados.	85

1.7 Hidrólisis enzimática

Proceso catalizado por celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa. El uso del pretratamiento facilita el desarrollo de esta etapa, porque dependiendo del tipo de pretratamiento la celulosa podrá encontrarse parcialmente solubilizada como en el caso del empleo de los líquidos iónicos, se podrá encontrar más expuesta al solubilizarse la hemicelulosa si se realizó un pretratamiento hidrotérmico, o se habrá degrado la lignina si se llevó a cabo un pretratamiento alcalino o biológico en la biomasa lignocelulósica. Cabe destacar que en la mayoría de los procesos existe un primordial interés por los azúcares provenientes de la celulosa, sin embargo, la tendencia actual es el aprovechamiento integral de la biomasa, y en especial de otros azúcares como las pentosas, provenientes de la hemicelulosa, por lo que se están empleando otras enzimas, que actúan sobre dichas sustancias como son las xilanasas y las xilasas [17].

1.8 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico en el que los azúcares como la glucosa (C₆H₁₂O₆), se convierten en etanol, dióxido de carbono y energía celular (en forma de moléculas de ATP) [20], como productos finales. Este proceso es llevado por levaduras, algunos tipos de bacterias y algunos otros hongos en ausencia de oxígeno [51]. La fermentación alcohólica inicia con la glucólisis, que es descomposición de los azúcares para formar moléculas de piruvato. En condiciones anaeróbicas, el piruvato puede transformarse en etanol, donde primero se convierte en una molécula intermedia llamada acetaldehído, que libera aún más CO₂, y el acetaldehído se convierte en etanol. En la fermentación alcohólica, el aceptor de electrones llamado NAD+ se reduce para formar NADH. El intercambio de electrones que ocurre en el proceso ayuda a construir el ATP [52]. La producción de etanol a partir de una molécula de glucosa se puede expresar como:

$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$$

En el proceso de fermentación, las levaduras son los microorganismos de mayor uso en la

producción de etanol, debido a su rendimiento, baja producción de inhibidores y facilidad de separación después de la fermentación. En dichos procesos se emplean levaduras de las especies *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, , que además de altas eficiencias, son capaces de trabajar a temperaturas superiores a los 40 °C [4], mientras otras especies de levaduras como *Scheffersomyces stipitis* se puede emplear a temperaturas entre 25-33 °C y las especies como *Pichia membranifaciens*, *Schizosaccharomyces pombe* se pueden emplear a temperaturas máximas de 37 °C[13].

Dos de los microorganismos, más conocidos y empleados, en la fermentación de las hexosas (azúcares de 6 carbonos como la glucosa, la galactosa y la frutosa) [4], a bioetanol son: la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Zimomonas mobilis*, sin embargo estos microorganismos, no pueden fermentar las pentosas (azúcares de 5 carbonos como xilosa, ribosa y arabinosa) derivadas de la hemicelulosa. Algunas especies como *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* y *Pachysolen tannophilus* son reconocidas por su habilidad para convertir las pentosas a etanol, pero estas bacterias son vulnerables al ambiente ácido, inhibidores y a altas concentraciones de etanol, y son de baja eficiencia comparadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [53].

1.9 Palma de coco (Cocos nucifera L.)

El cocotero o palma de coco es una especie de palmera de la familia *Arecaceae* nativa de las costas de Oceanía y Sureste de Asia, que se distribuye en regiones tropicales y subtropicales del mundo [54]. Actualmente, se distribuye en más de 80 países pertenecientes a los continentes de Asia, África, América y Oceanía, y se ha introducido por los humanos a regiones alejadas de las costas, por lo que se le encuentra plantada en jardines, parques, plantaciones y a lo largo de las carreteras en áreas con abundante luz solar y con lluvias regulares [55]. En México hay tres tipos de cocoteros en explotación: el tipo "Caribe" (que crece en toda la zona del Golfo de México y el Caribe), el "Pacífico" (variedad típica de la costa del Pacífico) y el enano "Malasia" [54]. Se distribuyen en los estados de: Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Veracruz y Puebla [56].

En el mundo se contabilizan más de once millones de hectáreas de cultivo de la palma de coco [15]. México es el octavo productor con una aportación de 1.7 % de la producción mundial. En el 2016 se tenían sembradas 127,823 ha, y actualmente se tiene la satisfacción del 96.02 % de los requerimientos nacionales con la producción interna [56], siendo Guerrero el principal estado productor con una aportación del 52 % de su superficie [15]. En la última década las incipientes exportaciones mexicanas se destinaron principalmente a Estados Unidos, Chile, Colombia y Guatemala.

Anualmente México produce más de un millón de toneladas de coco, de los cuales se generan 166, 000 toneladas de copra (principal producto cocotero) el cual se estima en más de 150 mil millones de pesos anuales (en el 2016 la producción de coco representó el 0.25 % del PIB agrícola nacional. De las toneladas de copra una vez procesada se obtienen 100, 000 toneladas de aceite [54]. Se ha estimado que el contenido de la fibra en el coco es del 50 % [57]. El fruto de la palma de coco es de gran importancia económica debido a los productos obtenidos de éste como son la copra, agua, aceite, leche, coco deshidratado, fibras y carbón de la concha [43–45]. Los frutos verdes se destinan al mercado del agua de coco, mientras que los cocos maduros se destinan al mercado del coco seco (copra, leche y aceite).

Existen residuos de cáscaras de coco verdes o maduras con diferentes composiciones dependiendo del sitio de plantación [58]. En México por cada 3,500 a 7,000 cocos se obtiene una tonelada de copra, que a su vez suministran 540 kg de aceite de coco y 380 kg de residuo. Mil cocos proporcionan 75 kg de fibra (bonote) [54]. Por lo anterior el coco es una fuente de materia prima con mucho potencial, ya que de él se pueden obtener cientos de diversos productos tanto para consumo en fresco, como industrializados, de alto valor agregado.

Para fines comerciales se han establecidos plantaciones de coco. Con el manejo adecuado en viveros en pocos meses se obtienen plantas germinadas que al año son trasplantadas favoreciendo su crecimiento al sembrarse separadas. El abonado y el riego ayudan a mantener una producción abundante. La floración y la fructificación tienen lugar continuamente, por lo que pueden obtenerse cocos maduros durante todo el año (por lo general se recolectan cada dos meses). La cantidad y el tamaño de los cocos varía de

acuerdo a la variedad cultivada y a la distancia entre las plantas. Por lo que la productividad de la plama de coco oscila entre 1000 y 1400 kg de copra por ha, aunque en cultivos comerciales, con materal genéticamente seleccionado se pueden obtener mayores rendimientos (2700 a 4000 kg de copra por ha) [54].

En un estudio realizado en 2014 por la Oficina para la Protección de la Propiedad Industrial (OPPI) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, se reportó que existen más de 8,000 patentes registradas relacionados con el uso del coco y subproductos en diversas industrias como la de cosméticos, de aceite y ácidos grasos, alimenticia, hortícola, de procesamiento del agua de coco, de fibras, de obtención de carbón activado, por mencionar algunas [15]. El cultivo de la palma de coco es fundamental para la producción de aceite de coco virgen. La demanda de aceite se ha incrementado en 10 países integrantes del TLCAN (Tratado de Libre Comercio de América del Norte) y TPP (Acuerdo Estratégico Trans-Pacífico de Asociación Económica), así como del bloque de la Unión Europea [56].

De acuerdo con las tendencias mundiales de consumo, la palma de coco tiene una gran demanda en todo el mundo por sus propiedades nutritivas y su particular sabor. En el 2030, se estima un aumento en la demanda mundial de 2, 437.72 a 2, 541.31 Mt, mientras que la producción nacional de palma de coco tiene la capacidad de incrementarse de 223.02 a 275.83 Mt [56]. Dentro de las estrategias planteadas en la Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, se considera que es posible aumentar la superficie de cultivo del cocotero, incrementar el número de empresas involucradas en la explotación del coco, así como mejorar los procesos de transformación del mismo con el fin de obtener nuevos productos con demanda internacional [15]. Al contar con una mayor producción y transformación del coco se generarían más residuos, los cuales podrían ser utilizados para producir bioetanol de segunda generación en los estados con cultivo de coco.

1.10 Pretratamientos para obtención de bioetanol a partir de cáscara de coco

El pretratamiento más empleado en la fibra de coco es el alcalino, seguido por el pretratamiento ácido. Soares *et al.* [14] realizaron un pretratamiento en cáscara de coco verde con una solución de NaOH al 1% (p/v) a 25 °C, durante una h, seguido de la hidrólisis enzimática donde obtuvieron una concentración de azúcares de 8.7 ± 0.1 % (p/v).

Goncalves *et al.* [57] obtuvieron, a partir de cáscara de coco maduro, pretratada hidrotérmicamente con NaOH al 2.5% (p/v) a 180 °C por 30 minutos, un rendimiento de etanol de 90.18 %, 91.17 % y 91.03 % en una sacarificación parcial y fermentación simultánea con *Scheffersomyces stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* respectivamente [57]. Los valores obtenidos se deben a la disminución de la lignina al emplear NaOH durante el pretratamiento, y al breve período de presacarificación que permitió la conversión de celulosa en glucosa. La disminución de la inhibición enzimática pudo deberse porque mientras se realizaba la conversión de la celulosa a glucosa, los microorganismos las iban fermentando, y al haberse degrado previamente la lignina, no se generaron tantos compuestos inhibidores [57]. También se ha reportado una productividad de etanol (0.21 g/(Lh)) a partir de la cáscara de coco verde con *S. cerevisiae* mediante sacarificación parcial y fermentación simultánea (SSSF) [59].

Además, se han realizado pretratamientos convencionales en fibras de coco verde (pretratamiento hidrotérmico, alcalino diluido, ácido diluido y con organosolventes) en condiciones presurizadas y la desintoxicación del sustrato con polietilenglicol (PEG 400), para mejorar la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) en fibras de coco verde [60]. Con la adición de PEG 400, se alcanzó un valor máximo de producción de etanol de 7.87 g/L empleando 50 % (v/v) de la fracción líquida pretratada hidrotérmicamente. La producción de etanol durante la SSF se favoreció en comparación con las pruebas a las que no se les agregó el polímero [60]. Se ha reportado 45.4 ± 2.3 g/L de azúcares fermentables de la celulosa y hemicelulosa en la fracción líquida después de un pretratamiento alcalino con NaOH (1% (p/v)) [61]. También en ese mismo estudio, se observó que después del pretratamiento, al agregar caseína, la concentración de glucosa obtenida durante la hidrólisis enzimática aumentó a 4.2 g/L, mientras que al usar PEG 4000, PEG 8000 y una mezcla de ambos, las concentraciones de glucosa fueron de 13.5 g/L, 10.6 g/L y 11. 6 g/L respectivamente [61].

Los estudios publicados, sobre cáscara de coco, se realizaron en diferentes condiciones durante todo el proceso de producción de etanol, por lo que es necesario analizar varios parámetros para definir qué procedimiento en su conjunto tiene mejores resultados. Siempre se debe tener en cuenta que el objetivo final, es obtener la mayor concentración de etanol a partir del sustrato inicial, por el precio más bajo. Se requiere de procesos donde

el consumo de energía sea bajo, se empleen menos reactivos y que el pretratamiento sea viable económicamente [58].

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, a nivel internacional se ha propuesto reducir la dependencia de los combustibles fósiles, para preservar las reservas existentes y mitigar problemas ambientales que provocan el calentamiento global. Una alternativa, es la producción de bioetanol de segunda generación (a partir de biomasa lignocelulósica), en la que la celulosa proveniente de diversos residuos, incluidos los agrícolas, es convertida en biocombustible. Por lo anterior, en los últimos años, la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica ha crecido significativamente, sin embargo, una de las limitantes del proceso es la degradación de lignina, compuesto que impide la hidrólisis completa de la celulosa y hemicelulosa para la obtención de azúcares fermentables. Por lo que es necesario realizar un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica antes de la hidrolisis enzimática. Existen diversos tipos de pretratamientos, clasificados principalmente en físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos, así como combinaciones entre éstos.

El pretratamiento es el paso más importante para la deslignificación y las siguientes etapas del proceso. Los pretratamientos, en su mayoría químicos, bajo condiciones severas pueden generar compuestos que causan inhibición de las enzimas hidrolíticas y/o de los microorganismos fermentativos, mientras que los pretratamientos biológicos permiten la degradación de la lignina y además tienen la capacidad de detoxificar la biomasa tratada, eliminando algunos compuestos inhibidores, por lo que también requieren ser estudiados ampliamente. Por lo que este trabajo se enfocó en el desarrollo de pretratamientos biológicos (en estado sólido y en medio líquido), físico (ultrasonido) y fisicoquímico (ultrasonido combinado con enzimas lacasas) en biomasa lignocelulósica, específicamente en fibra de cáscara de coco, con el propósito de incrementar la concentración de azúcares fermentables y la obtención de subproductos bajo el concepto de biorrefinería.

HIPÓTESIS

Los pretratamientos biológicos (cultivo en estado sólido y cultivo en medio líquido), físico (ultrasonido) y fisicoquímicos (ultrasonido en combinación con enzimas lacasas) sobre la fibra de la cáscara de coco verde (*Cocos nucifera* L.), permitirán su deslignificación y mejorarán la accesibilidad a la celulosa contenida en la biomasa para llevar a cabo el proceso de hidrólisis enzimática.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

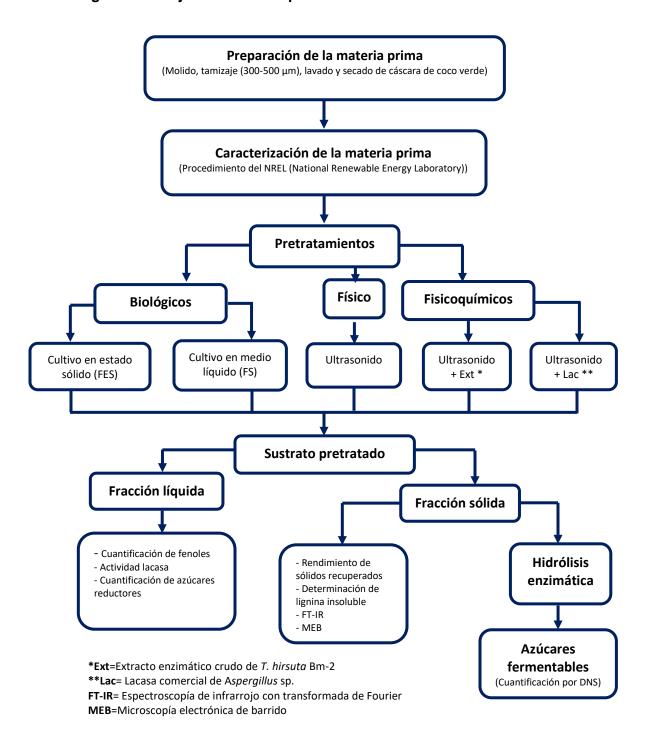
Evaluar el efecto de tres pretratamientos distintos (biológicos, físico y fisicoquímicos), en la deslignificación de la fibra de cáscara de coco verde (*Cocos nucifera*), y en el proceso de la sacarificación de las fibras pretratadas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar estructural y fisicoquímicamente la fibra de coco verde antes y después de los diferentes tipos de pretratamientos.
- 2. Evaluar el pretratamiento biológico en estado sólido y el pretratamiento biológico en medio líquido, con la cepa *T. hirsuta* Bm-2, en la deslignificación de coco verde.
- 3. Determinar el efecto de las ondas ultrasónicas en la deslignificación de la fibra de coco verde.
- 4. Evaluar el efecto de las ondas ultrasónicas combinadas con un extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2, y con la lacasa comercial de *Aspergillus* sp. en la deslignificación de la fibra de coco verde.
- 5. Establecer, a nivel laboratorio, el mejor pretratamiento para la obtención de azúcares fermentables para la producción de bioetanol a partir de la fibra de coco verde.

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diagrama de flujo del diseño experimental



2.2 Preparación de la materia prima

La fibra de coco verde se obtuvo de una empresa aceitera de coco en Bacalar, Quintana Roo (Figura 2.1). Ésta se molió con un molino (Pagani, DYCOMET, México) usando una criba de 1 mm, y se tamizó para obtener un tamaño de partícula de 500-300µm. Las fracciones obtenidas se embolsaron, etiquetaron, pesaron y almacenaron a temperatura ambiente. La fibra molida se lavó con agua destilada para reducir el contenido de cloruro de potasio y sodio, que se pueden encontrar en la cáscara del coco verde en niveles tóxicos [62], además de otros compuestos residuales no lignocelulósicos [31,48]. La fibra lavada se secó en una estufa (Serie ED, Binder ®, Tuttlingen, Alemania) a 80 °C por 5 días. La fibra seca se pesó y almacenó en bolsas herméticas a temperatura ambiente.



Figura 2.1. Fibra de cáscara de coco verde.

2.3 Caracterización de la materia prima

La caracterización de la fibra de coco verde, se realizó con base a la composición química de la biomasa lignocelulósica, mediante una hidrólisis ácida de acuerdo al protocolo de la NREL (National Renewable Energy Laboratory) [63]. La metodología se describe a continuación: a 0.5 g de fibra se añadieron 5 mL de ácido sulfúrico al 72 % (v/v), se agitó manualmente por una hora en baño María a 35 °C. Esto se realizó por triplicado. Las muestras se transfirieron a frascos de borosilicato previamente pesados y se llevó a cabo una segunda hidrólisis con ácido sulfúrico al 4 % (v/v) para lo cual se agregó agua destilada hasta alcanzar un peso de 148.7 g, los frascos fueron autoclaveados durante una hora a 121 °C [57]. Los frascos se atemperaron y pesaron nuevamente.

La separación de la fracción líquida de la sólida se realizó por filtración a vacío. El sobrenadante se recuperó para el análisis de celulosa y hemicelulosa por HPLC. La fracción sólida recuperada en el filtro (con peso conocido) se considera como lignina Klason (lignina insoluble en ácido) [57]. El contenido de la humedad de la fibra sin tratar se determinó para muestras de 1 g empleando una termobalanza (Citizen Scales MB200C, Mumbai, India). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

2.4 Microorganismo

La cepa *Trametes hirsuta* Bm-2 (Número de acceso GenBank GQ280373) aislada de madera en descomposición en Yucatán, México [64], fue empleada para los pretratamientos en este estudio (Figura 2.2). La cepa se mantuvo en placas con extracto de malta (Sigma-Aldrich, E. U. A.) (2 % p/v) y agar (DIBICO, México) (2 % p/v) en incubación a 35 °C [65].



Figura 2.2. Colonia de *Trametes hirsuta* Bm-2 de tres días de crecimiento en medio de extracto de malta agar, incubada a 35 °C.

2.5 Producción del inóculo

El inóculo de *T. hirsuta* Bm-2 se obtuvo en medio líquido YMPG (pH 4.5), cuya composición por litro es: 10.0 g de glucosa, 10.0 g de extracto de malta, 2.0 g de peptona, 2.0 g de extracto de levadura, 2.0 g de KH₂PO₄, 1.0 g MgSO₄·7H₂O, 1.0 mg de hidrocloruro de tiamina. Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio YMPG con un disco de un cm² de un cultivo de *T. hirsuta* Bm-2 de 4 días de crecimiento en extracto de malta agar. Los matraces se incubaron a 35 °C a 150 rpm. Después de 4 días, los cultivos obtenidos se homogenizaron con un agitador eléctrico estéril (T18 digital Ultra-Turrar ®, IKA ®, Staufen, Alemania) [65]. Se tomó una muestra de 1 mL del inóculo homogenizado para cuantificar la actividad lacasa como se describe en la sección 2.10.2 (Figura 2.3).



Figura 2.3. Inóculo de Trametes hirsuta Bm-2 obtenido en medio YMPG.

2.6 Obtención del extracto enzimático crudo

Una vez obtenido el inóculo, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de buffer fosfatos 60 mM (pH 6) se agregó salvado de trigo al 3 % (p/v) [65]. Los matraces se inocularon con tres mililitros del inóculo homogenizado, y se incubaron a 35 °C por 7 días, al cabo de los cuales el medio de cultivo se filtró y centrífugo por 15 minutos a 3500 rpm y 10 °C (Figura 2.4). Se tomó una muestra para medir la actividad lacasa como se describe en la sección 2.12.2.



Figura 2.4. Extracto enzimático crudo de *Trametes hirsuta* Bm-2 obtenido en buffer fosfatos adicionado con salvado de trigo al 3 % (p/v).

2.7 Pretratamientos biológicos

2.7.1 Pretratamiento biológico en estado sólido

En este pretratamiento se utilizó, el medio de Rodríguez-Couto (pH 5) (2 g de glucosa, 15 g de extracto de malta, 0.9 de (NH₄)₂SO₄, 2 g de KH₂PO₄, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 0.1 g de CaCl₂·2H₂O, 0.5 mL de hidrocloruro de tiamina, 1000 mL de agua destilada) que contiene todos los nutrimentos necesarios para el crecimiento del hongo. En matraces Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 5 g de fibra de coco verde (tamaño de partícula 300-500 μm) y 27 mL de medio Rodríguez-Couto, se esterilizaron y posteriormente se inocularon con 5 mL de inóculo homogenizado de *T. hirsuta* Bm-2. Los matraces se incubaron sin agitación durante 7, 14, 21 y 28 días a 35 °C [66]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los matraces control (sin inoculación de hongo) se prepararon e incubaron junto con los matraces inoculados.

Una vez terminado el tiempo de pretratamiento se añadieron 50 mL de buffer acetato (pH 4.5) a cada matraz, se agitaron a 150 rpm durante una hora, se filtraron y la fracción líquida se centrifugó a 3500 rpm, a 10 °C durante 15 minutos, el sobrenadante se almacenó a 4 °C. El residuo sólido se separó de la masa miceliar (para la mayoría de los tiempos de

incubación fue posible diferenciar un aglomerado blanco, formado durante la agitación de los matraces con el buffer acetato, que se retiró cuidadosamente al filtrar), y se secó a 80 °C por 72 horas. Las muestras secas se pesaron y almacenaron a temperatura ambiente, en bolsas herméticas debidamente etiquetas, para su posterior hidrólisis enzimática.

2.7.2 Pretratamiento biológico en medio líquido

Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL a los que se agregaron 5 g de fibra de coco verde (tamaño de partícula 300-500 µm) y 83 mL de medio Rodríguez-Couto (pH 5), se esterilizaron y posteriormente se inocularon con 5 mL de inóculo de *T. hirsuta* Bm-2. Los matraces inoculados y matraces control (no inoculados) se dejaron en agitación a 150 rpm durante 7, 14, 21 y 28 días a 35 °C [66]. Al finalizar cada uno de los tiempos del tratamiento se midió el pH. Se separó la fracción líquida de la sólida por filtración. La fracción líquida se centrífugo a 3500 rpm a 10 °C durante 15 min y posteriormente se almacenó a 4 ° C. La fracción sólida se separó cuidadosamente en micelio y fibra (manualmente se retiraron los pequeños aglomerados blancos durante la filtración). Los sólidos recuperados se secaron a 80 °C por 72 horas, se pesaron y almacenaron a temperatura ambiente en bolsas herméticas debidamente etiquetadas, para luego realizar la hidrólisis enzimática. Se tomaron muestras de la fracción líquida y sólida para su posterior análisis. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

2.8 Pretratamiento físico con ultrasonido

El pretratamiento con ondas ultrasónicas se aplicó a una suspensión de fibra de coco verde (con tamaño de partícula de 300-500 μm) al 5 % (p/v) en buffer de acetato de sodio (pH 4.8, 0.1 M) contenida en doble bolsa de plástico con cierre hermético (marca Ziploc, México), la que se colocó en un baño ultrasónico de acero inoxidable con capacidad de un galón (Cole-Parmer ® modelo 08895-14, E.U.A). La sonicación se realizó a 42 kHz de frecuencia, 100 W de potencia y a 45 °C por una hora. Al finalizar el pretratamiento, se midió el pH y se filtró la suspensión para separar la fracción sólida de la líquida. La fracción líquida se almacenó a 4 °C. La fracción sólida se secó a 80 °C por 72 h, se pesó y se guardó en una bolsa hermética, debidamente etiquetada, y se almacenó a temperatura ambiente hasta realizar la hidrólisis enzimática. Se tomaron muestras, antes y después del tratamiento, de la

fracción sólida y líquida para su posterior análisis [67]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El control se realizó con la fibra de coco en buffer acetato de sodio (pH 4.8, 0.1 M) sin sonicar.

2.9 Pretratamientos fisicoquímicos

2.9.1 Ultrasonido más extracto enzimático crudo de T. hirsuta Bm-2

Este pretratamiento se llevó a cabo en una suspensión al 5 % (p/v) de fibra de coco verde en buffer acetato de sodio (pH 4.8, 0.1 m) en doble bolsa de plástico con cierre hermético. A dicha suspensión se agregó 1 mL del extracto enzimático crudo (con actividad lacasa de 1470 U/mL) por cada gramo de sustrato, y se sónico por una hora a 45 °C, a 42 kHz de frecuencia, y 100 W de potencia [67]. Finalizado el pretratamiento se realizó el mismo procedimiento llevado a cabo en la sección 2.8. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El control se realizó con la fibra de coco en buffer acetato de sodio (pH 4.8, 0.1 M) sonicado sin la adición de la enzima.

2.9.2 Ultrasonido más enzima comercial de Aspergillus sp.

En esta prueba se determinó la cantidad equivalente en mL, para obtener una actividad de 1470 U/mL, de la enzima comercial Lacasa de *Aspergillus* sp. (EC 420-150-4, Sigma-Aldrich, E. U. A). El pretratamiento se llevó a cabo en una suspensión de fibra de coco verde al 5 % (p/v) en buffer acetato de sodio (pH 4.8, 0.1 m) colocada en doble bolsa con cierre hermético a la que se agregó la enzima correspondiente. La suspensión se sónico por una hora a 42 kHz de frecuencia, 100 W de potencia y a 45 °C [67]. Finalizado el pretratamiento, la suspensión se filtró para separar las fracciones líquida y sólida. La líquida se almacenó a 4 °C, mientras que la sólida se secó a 80 °C por 72 h. La muestra seca se pesó y almacenó a temperatura ambiente, en una bolsa debidamente etiquetada, para luego realizar la hidrólisis enzimática. Se tomaron muestras antes y después del pretratamiento para su posterior análisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El control se realizó con la fibra de coco en buffer acetato de sodio (pH 4.8, 0.1 M) sonicado sin la adición de la enzima.

2.10 Análisis de la fracción líquida

2.10.1 Cuantificación de fenoles

La concentración de compuestos fenólicos después de los diferentes pretratamientos se determinó mediante la reducción del reactivo Folin-Ciocalteau [68]. La reacción se realizó con 20 μ L de muestra, a la que se añadieron 1580 μ L de agua destilada y 100 μ L de reactivo Folin Ciolcateau (10 % v/v). Se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente (28 ± 2 °C), inmediatamente se adicionaron 300 μ L de Na₂CO₃ al 7.5 % (p/v) y se incubó a 40 °C en oscuridad durante 30 min. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 765 nm. El ácido gálico se utilizó como estándar y los resultados obtenidos se expresaron en mg de ácido gálico/mL [65].

2.10.2 Cuantificación de la actividad lacasa

La actividad lacasa, de las muestras, tomadas para analizar, se midieron a 40 °C usando 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). La reacción se realizó con 100 μ L de buffer acetato de sodio (pH 4.5, 1 M), 770 μ L de agua destilada, y 30 μ L de muestra. Las reacciones se preincubaron 5 min a 40 °C, e inmediatamente se les adicionaron 100 μ L de ABTS 5 mM, y se incubaron durante 20 min a 40 °C. Las lecturas de la absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 420 nm (Emax = 36,000 L· mol $^{-1}$ · cm $^{-1}$) [69]. Una unidad de enzima (U) es definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto en las condiciones de prueba. La concentración de la actividad lacasa se expresó en U· mL $^{-1}$ [65].

2.10.3 Cuantificación de azúcares reductores

La concentración de los azúcares reductores en las muestras provenientes de los diferentes pretratamientos y de la sacarificación enzimática fue analizada por el método del ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) de acuerdo a Miller [70]. Se realizó la preparación de una solución con la siguiente composición: 14 g/L (NaOH), 100 g/L de tartrato de sodio y potasio, 5 g/L de fenol cristalino, 5.9 g/L de meta bisulfito de sodio, y 7.5 g/L de DNS (acido-3,5- dinitro salicílico) en aproximadamente 600 mL de agua destilada, los reactivos fueron disueltos en

el orden citado, el DNS se agregó lentamente y se aforó a un litro. El reactivo se almacenó

en un frasco ámbar y se dejó en reposo por 24 horas.

Las reacciones se llevaron a cabo con 1 mL de muestra, se les adicionó 1.5 mL de la

solución de DNS, se agitaron y se calentaron a baño María durante 5 min. Las muestras se

enfriaron en agua a temperatura ambiente y se les agregaron 7.5 mL de agua destilada, se

agitaron y se realizaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. La

concentración se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar

de glucosa realizada previamente. La concentración se expresó en g/L.

2.11 Análisis de la fracción sólida

La eficacia de los pretratamientos se evaluó mediante el rendimiento de los sólidos

recuperados [71]. A continuación, se presenta la fórmula con la que se realizaron los

cálculos:

 R_{SR} (%) = $\frac{F_P}{F_S}$ x 100

Donde:

R_{SR}: Rendimiento de sólidos recuperados después de los tratamientos en %

F_p: Peso de la fibra pretratada en g

F_s: Peso de la fibra sin pretratar en g

2.11.1 Porcentaje de deslignificación

Para evaluar la eficacia de los pretratamientos, en la deslignificación de la fibra de coco

verde, se determinaron los porcentajes de la remoción de la lignina, estimando su reducción

como porcentaje con respecto a la muestra control [72]. Los cálculos se realizaron con base

a la siguiente fórmula:

% deslignificación = $\frac{L_{\textit{Ki sustrato sin pretratar}} - L_{\textit{Ki sustrato pretratado}}}{L_{\textit{Ki sustrato sin pretratar}}} \ge 100$

43

Donde:

% deslignificación: Disminución de lignina después de los pretratamientos en %

L_{Ki}: Lignina Klason insoluble en %

2.11.2 Determinación de lignina insoluble

Después de cada pretratamiento se tomaron muestras a las que se les realizó una hidrólisis ácida como se describió en la sección 2.3. Los filtros (con pesos conocidos) con la lignina

retenida se lavaron con agua destilada, se puso a secar a 80 °C a peso constante, por un

mínimo de 8 horas. Después de mantenerse a peso constante, los filtros con la lignina

insoluble, se pusieron en un desecador, y una vez atemperados se pesaron. La lignina

insoluble se determinó según el procedimiento descrito por Gouveia et al. [73], donde el

porcentaje de la lignina insoluble se calculó en relación con el peso de las muestras secas

iniciales de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% L_{Ki} = \frac{P_K - P_C}{P_i} \times 100$$

Donde:

L_{Ki}: Lignina Klason insoluble en %

P_K: Peso de lignina insoluble seca en g

P_c: Peso de cenizas en g

Pi: Peso de muestra seca inicial en g

2.11.2.1 Determinación de cenizas totales

Se marcaron y se pusieron a secar, a peso constante, crisoles de porcelana a una

temperatura de 105 °C por 24 horas. Se colocaron en un desecador por 1 h. Se pesaron

los crisoles en una balanza analítica, y se registraron los pesos. El contenido de cenizas

totales se estimó a partir de 1 g (peso seco) de fibra de coco verde. La fibra para estas

pruebas se secó a 80 °C por 24 horas, previo a su uso. Los crisoles con la fibra de coco se

colocaron en una mufla con rampa de calentamiento a 550 °C por 4 horas. Transcurrido

ese tiempo, se dejó bajar la temperatura de la mufla, para sacar y colocar los crisoles en un

44

desecador por 1 h. Los crisoles con las muestras se pesaron a temperatura ambiente [57]. Para determinar el porcentaje de cenizas se empleó la siguiente fórmula [73]:

% cenizas =
$$\frac{P_c}{P_i}$$
 x 100

Donde:

% cenizas: Cenizas totales en %

P_c: Peso de cenizas en g ([peso del crisol + cenizas] – peso del crisol)

Pi: Peso de muestra base seca en g

2.11.3 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras tomadas del sustrato sin tratar y después de los diferentes pretratamientos, se caracterizaron con base a los cambios en los grupos funcionales mediante la técnica de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR por sus siglas en inglés), utilizando el quipo Bruker Optics TENSOR II (FTIR Spectrometer, Alemania) con punta de cristal de diamante. Las condiciones de análisis fueron en un rango de 500-4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹ con 32 escaneos. Se realizó una compensación por CO₂ atmosférico, una corrección del ATR de diamante usado y de la línea base.

2.11.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El estudio de la estructura microscópica de la fibra sin tratar y los cambios sufridos por efecto de los pretratamientos se realizaron mediante observación en un microscopio electrónico de barrido (MEB, modelo JSM-6360LV, JEOL, Tokio, Japón). Las muestras se montaron sobre un soporte metálico usando cinta adhesiva de doble cara, se recubrieron con una capa de oro de 15 nm y posteriormente se observaron a 20 kV [74].

2.12 Sacarificación

La hidrólisis enzimática se realizó en matraces Erlenmeyer que contenían 25 mL de buffer citrato de sodio (pH 4.8, 50 mM) y 1 g (4 % p/v) de fibra de coco verde (en base seca) a los

que se les agregaron 10 FPU de un cóctel enzimático comercial de celulasas y hemicelulsas (Cellic CTec3 de Novozymes, Dinamarca) por gramo de sustrato [75]. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo a 50 °C en una incubadora con una agitación de 150 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de proceso [59]. La separación de la fase líquida de la fracción sólida se realizó por filtración. En la fracción líquida se determinó el contenido de azúcares reductores por el método DNS de Miller [70].

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la materia prima

Después de la molienda y del tamizado de los seis kilos de fibra de coco verde se obtuvieron varias fracciones con diferente tamaño de partícula: menores a 300 µm (32.52 %) µm (1.62 %); en el rango de 300-500 µm (65. 86 %); mayores a 500. El tamaño de partícula de la fibra de coco verde, propuesto para realizar los pretratamientos, fue el de mayor porcentaje (Figura 3.1), lo que permitió aprovechar la mayor cantidad de fibra sin tener que volver a molerla o tamizarla, ayudando a reducir el consumo de energía. El rango del tamaño de partícula que se empleó en los pretratamientos, está estandarizado en el protocolo de la NREL [63], y se tienen reportes de caracterizaciones de la fibra de coco basados en este protocolo [57,60].



Figura 3.1. Fibra de cáscara de *Cocos nucifera* L. con tamaño de partícula de $300-500~\mu m$ obtenida después de molerla y tamizarla.

El tamaño de partícula es uno de los factores que influye en los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica y, en consecuencia, también en los rendimientos obtenidos después de la sacarificación. Con tamaños de partícula mayores a 1 mm, se han reportado rendimientos de glucosa entre 55 y 58 % [76], mientras que con los tamaños de partícula menores a 0.5 mm se han obtenido rendimientos de glucosa del 90% [57]. Esto respalda la evidencia que la reducción del tamaño de partícula aumenta el área de superficie específica, y posteriormente, la accesibilidad de la celulosa a las enzimas [34].

3.1.1 Composición estructural de la fibra

Para determinar la composición química de la fibra de coco verde, se siguió el protocolo de la NREL [63]. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.1, conjuntamente con los resultados de otros estudios, donde han caracterizado la fibra de la cáscara de coco en términos de porcentaje de lignina, hemicelulosa y celulosa.

Tabla 3.1. Composición química de la fibra de coco reportada en distintos trabajos.

Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Referencia
11.36	33.31	En este estudio
3-12	23-43	[62]
29.14	33.23	[59]
26.50	32.88	[77]
27.81	32.18	[57]
ND	29.70	[73]
23.48	25.61	[60]
12.26	24.70	[78]
	11.36 3-12 29.14 26.50 27.81 ND 23.48	11.36 33.31 3-12 23-43 29.14 33.23 26.50 32.88 27.81 32.18 ND 29.70 23.48 25.61

ND: No disponible. La composición se representa en % de peso sobre el peso seco de las muestras.

Se pudo observar que la composición química (celulosa, hemicelulosa y lignina), de la fibra de la cáscara de coco (Tabla 3.1), se encuentra en los rangos reportados por Carrijo et al. [62]. El alto porcentaje de lignina, presente en el coco verde (36.97 %), explica su resistencia, durabilidad (la cáscara de coco tarda aproximadamente ocho años en degradarse) [79], y recalcitrancia [62]. Valores altos de lignina en la cáscara de coco, han

sido reportados también por Nogueira et. al. [60], Goncalves et al. [77], Albuquerque et al. [79], y Cabral et. al [78]. Lo anterior permite considerar, a la fibra de coco, para obtención de productos potenciales de mayor valor agregado en un proceso de biorrefinería, a través de aplicaciones adicionales a partir de la lignina [34].

La fibra de coco verde también presentó un alto contenido de celulosa (33.31 %), lo cual es una característica importante para la producción de etanol de 2G [78], debido a que es una fuente potencial de azúcares fermentables [60]. El porcentaje obtenido de celulosa en la fibra de coco verde se encontró cercano al contenido de celulosa del rastrojo de maíz (34.80 %) [71], pero por debajo del contenido de celulosa, de otros residuos lignocelulósicos, como por ejemplo, del bagazo de caña de azúcar (43.17 % de celulosa) [80], y la paja de trigo (44.45 %) [81], que han sido utilizados, como sustrato en la producción de bioetanol, de segunda generación

La variación obtenida, en los porcentajes de la composición química de la fibra de coco, puede deberse a la actividad para la cual se destinó el fruto y de la que derivaron los residuos de la cáscara de coco, por ejemplo: los frutos destinados para extracción de aceite de coco, requieren una edad de maduración del fruto de 10 a 11 meses. La cáscara de estos frutos, tiene mayor contenido de lignina que los frutos que se comercializan para el consumo del agua de coco natural, con una edad de maduración de 6 a 8 meses [82]. Los porcentajes obtenidos también se ven influidos por las condiciones geográficas y climáticas del lugar, de donde se obtuvieron los residuos.

3.2 Pretratamientos biológicos

3.2.1 Pretratamiento biológico en estado sólido

En la Figura 3.2, se puede observar que la cepa de *T. hirsuta* B-m2, colonizó toda la superficie del sustrato. Después de siete días de incubación en estado estacionario a 35 °C, se observó la producción de una secreción de coloración amarilla (Figura 3.2b), la cual puede ser asociada al metabolismo del hongo. A los 14 días de pretratamiento se observó, sobre la superficie, el aumento de la secreción líquida amarilla (Figura 3.2c), a diferencia de los tiempos de incubación, 21 y 28 días, donde el líquido secretado, presentó una

coloración más tenue (Figura 3.2d y e). Estos cambios en la coloración de los líquidos secretados pudieran estar asociados a las diferentes reacciones de despolimerización del tejido vegetal y a la producción de extractos enzimáticos extracelulares liberados por el microorganismo.

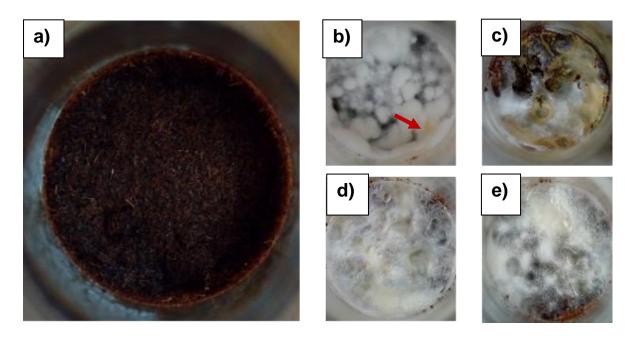


Figura 3.2. Fibra de coco verde en el pretratamiento biológico en estado sólido a diferentes tiempos de incubación. **a)** Control (0 días); **b)** 7 días; **c)** 14 días; **d)** 21 días; **e)** 28 días.

En la Figura 3.3, se puede observar que en la fracción líquida de la fibra sin inocular (muestra control) presentó una concentración de fenoles inicial de 0.23 ± 0.02 mg • mL⁻¹. Para las muestras pretratadas, al séptimo día, se observó la mayor concentración de fenoles, de casi el doble de la inicial (0.41 ± 0.02 mg • mL⁻¹), para posteriormente disminuir paulatinamente hasta una concentración de fenoles menor al 0.1 mg • mL⁻¹, a los 28 días de pretratamiento. La baja concentración de fenoles iniciales, pudieron ser consumidos por el hongo, para generar la actividad lacasa que se obtuvo a los 7 días de pretratamiento (462.04 ± 3.96 U • mL⁻¹), y a su vez las lacasas producidas, actuaron sobre la lignina, despolimerizando este compuesto, liberando fenoles que pudieron servir como mediadores

para la enzima lacasa, y actuaron sobre compuestos no fenólicos para generar la deslignificación del sustrato [22].

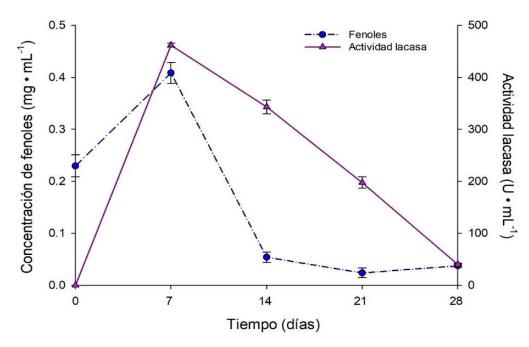


Figura 3.3. Concentración de fenoles en mg de ácido gálico • mL⁻¹ y actividad lacasa obtenidos con el pretratamiento biológico en estado sólido a diferentes tiempos de incubación.

Durante los distintos tiempos del pretratamiento biológico en estado sólido, la actividad lacasa fue disminuyendo hasta obtenerse $40.08 \pm 2.52 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, a los 28 días de incubación (Figura 3.3). El comportamiento de la actividad lacasa mostró una tendencia similar al reportado por Shang *et al.* [83], quienes observaron actividades de lacasa bajas entre los días 0 al día 4 de pretratamiento, y luego de 8 días de pretratamiento registraron la mayor actividad lacasa (720 U • mL⁻¹) la cual fue disminuyendo gradualmente. En diversos estudios, se ha comprobado que la cantidad y / o composición de complejos enzimáticos producidos por microorganismos se ven afectados principalmente por el tipo y concentración de la fuente de carbono, así como por las condiciones de cultivo [76,77].

En la Figura 3.4, se muestran los cambios ocurridos en la fibra de coco, luego de 7 días de pretratamiento biológico en estado sólido. La fibra sin tratar se observó lisa y rígida, como si estuviera cubierta por una capa de cera (Figura 3.4a), mientras que la fibra pretratada, mostró daños asociados a su biodegradación (mayor porosidad y apariencia rugosa), debido a las enzimas extracelulares secretadas por *T. hirsuta*, lo cual también ha sido observado por Ebrahimi *et al.* [84] al tratar fibra de coco con glicerol acuoso durante 30 minutos. Las rupturas y áreas porosas en las fibras de coco verde (Figura 3.4b), también han sido observadas por Albuquerque et al. [79], después de un tratamiento a una presión de 300 MPa y 22 ± 1 °C, quienes reportan que ese efecto puede deberse a la presión hidrostática, ya que se rompen los enlaces de hidrógeno, generando las modificaciones en la estructura, antes descritas [79].

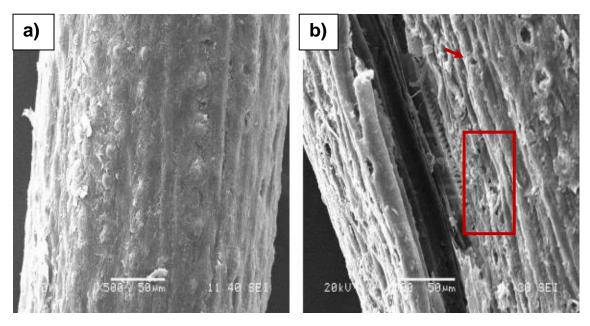


Figura 3.4. Cambios físicos en la fibra de coco verde después del pretratamiento en estado sólido. **a)** Control (fibra sin inocular); **b)** 7 días.

La aparición de pequeños agujeros, en la fibra pretratada (señalados en rojo en la Figura 3.4b), son de mayor tamaño que los observados por Brígida *et al.* [82], cuando pretrataron fibra de coco verde con H₂O₂. También son similares a lo reportado por Goncalves *et al.* [59], cuando pretrataron la fibra de coco verde, por autohidrólisis empleando una temperatura de 200 °C durante 50 min. En dicho estudio las imágenes mostraron un incremento en la porosidad de la superficie, así como separación entre las fibras [59].

Aunque se lograron ver cambios en la estructura física de la fibra, no se lograron apreciar tantos, lo que hubiera permitido una mejora en la sacarificación de la fibra de coco.

Los daños observados en el pretratamiento de la cáscara de coco verde con *T. hirsuta* Bm-2 (Figura 3.4b), a los 7 días, resultaron ser distintos al compararlos con el tratamiento llevado a cabo por Sun *et al.* [66], en el rastrojo de maíz para el mismo tiempo de cultivo. La aparición de los pequeños poros, rupturas y áreas erosionadas como consecuencia del tratamiento biológico, se mostraron después de 14 días de pretratamiento. El sistema de enzimas para deslignificación depende de la cepa, el sustrato y las condiciones de cultivo. Aunque la lacasa puede desempeñar un papel central, no siempre está enzima será responsable del proceso de deslignificación [66].

3.2.2 Pretratamiento biológico en medio líquido

En el pretratamiento en medio líquido, se pudo observar la formación de pequeños pellets (Figura 3.5), los cuales fueron aumentando en cantidad con respecto al tiempo (Figura 3.3b-d), también se observó que estos no envuelven totalmente a la fibra, una parte se unió al micelio y otra quedó libre.

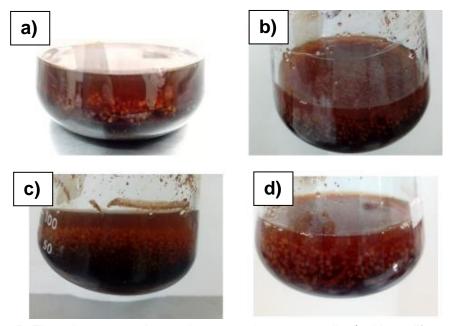


Figura 3. 5. Fibra de coco verde en el pretratamiento en medio líquido a diferentes tiempos de incubación. a) 7 días; b) 14 días, c) 21 días; d) 28 días.

En la Figura 3.6, se puede observar que la concentración inicial de fenoles (0.23 ± 0.02 mg • mL-1) disminuyó desde los siete días de pretratamiento, a una concentración de 0.1 mg • mL-1 en todos los demás tiempos de incubación. Está disminución en el contenido de fenoles a los 7 días de cultivo, permitió un incremento en la actividad lacasa (4,512.34 ± 98.14 U • mL-1) para este tiempo de pretratamiento. Debida a la alta actividad lacasa, los fenoles liberados, durante la despolimerización de la lignina, pudieron actuar como mediadores para la enzima lacasa, y permitir así que estos actúen sobre compuestos más complejos presentes en la lignina, generando una mayor deslignificación del sustrato. La rápida disminución de la actividad lacasa, a partir del día 7 de pretratamiento, puede estar asociada a la presencia de inhibidores que aumentan con el tiempo de pretratamiento [67].

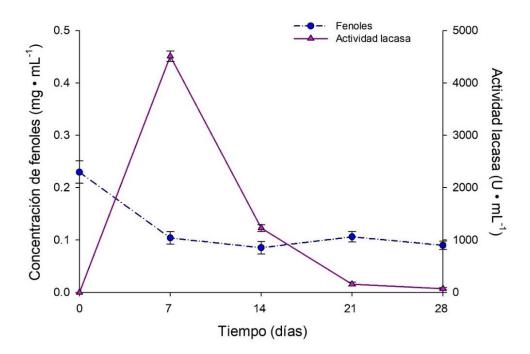


Figura 3.6. Concentración de fenoles en mg de ácido gálico • mL⁻¹ y actividad lacasa en U • mL⁻¹ obtenidos con el pretratamiento biológico en medio líquido a diferentes tiempos de incubación.

La actividad lacasa obtenida con el pretratamiento biológico en medio líquido, fue similar a la actividad reportada por Ancona *et al.* [65], quienes registraron 4,081.2 U • mL⁻¹ como máxima, después de 11 días en cultivo en medio líquido, a partir de la cepa *T. hirsuta* Bm-

2 utilizando como sustrato salvado de trigo. La concentración de fenoles totales, en dicho estudio, registró un comportamiento con fluctuaciones en las concentraciones (2.18-3.46 mg • mL⁻¹), reportándose la máxima concentración de fenoles a las 72 h. Lo observado se atribuyó a un factor dinámico del cultivo fúngico, en el cual el hongo simultáneamente liberó fenoles de la lignina y estos fueron usados como inductores y/o fuentes de carbono.

La rapidez con la cual estos eventos ocurren, puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y estado fisiológico del organismo [65]. Tovar-Herrera [85], menciona que el día óptimo para recuperar los sobrenadantes, del cultivo en medio líquido, es a los 5 días de incubación o en el tiempo que se haya registrado la mayor actividad enzimática. En diversos estudios, se ha comprobado que la cantidad y composición de complejos enzimáticos producidos por microorganismos se ven afectados principalmente por el tipo y concentración de la fuente de carbono [76,77], así como por las condiciones de cultivo [86].

En la Figura 3.7, se pueden observar los cambios físicos de la fibra de coco verde, después del pretratamiento biológico en medio líquido por siete días. La superficie de la fibra sin tratar (Figura 3.7a) era lisa y rígida, como si estuviera cubierta por una capa de cera. A los siete días de biodegradación en el cultivo en medio líquido, la superficie exterior de las fibras, se volvió rugosa debido a las enzimas extracelulares secretadas por *T. hirsuta*. La fibra pretratada biológicamente en medio líquido, mostró mayor daño superficial a los siete días de pretratamiento, como resultado de la alta actividad lacasa, obtenida para ese tiempo de tratamiento (Figura 3.6), en comparación con la fibra pretratada en estado sólido (Figura 3.4b)

Daños similares, a los observados en el pretratamiento biológico con *T. hirsuta* Bm-2, han sido reportados por Ebrahimi *et al.* [84], al pretratar fibra de coco con glicerol acuoso durante 30 minutos. Los pequeños orificios observados en la superficie de la fibra pretratada (señalados con rojo en la Figura 3.7b) son similares a los orificios que genera el H₂O₂ al pretratar coco verde [82].

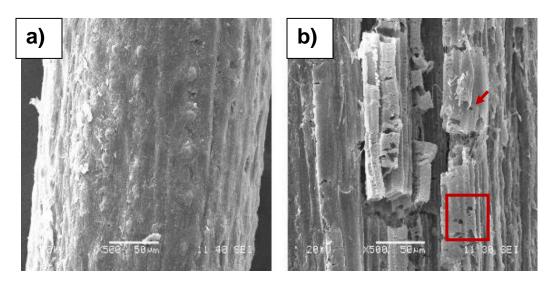


Figura 3.7. Cambios estructurales de la fibra de coco verde después del pretratamiento en medio líquido con *Trametes hirsuta* Bm-2.

Después de los pretratamientos se realizó la cuantificación de azúcares reductores, para corroborar que durante el proceso no se liberaron azúcares como se muestra en la tabla 3.2, por lo tanto, los azúcares fermentables obtenidos durante la sacarificación fueron obtenidos directamente de esa etapa.

Tabla 3.2. Concentración de azúcares después de los pretratamientos biológicos.

Tiempo (días)	Azúcares reductores
0	0.58 g/L de glucosa
7	
14	
21	
28	
0	0.58 g/L de glucosa
7	
14	
21	
28	
	0 7 14 21 28 0 7 14 21

3.2.3 Análisis de la deslignificación

En este trabajo se pudo observar que la cantidad de los sólidos recuperados, al final del tiempo de los pretratamientos biológicos, fue inversamente proporcional al tiempo de cultivo, debido a que a mayor tiempo menor cantidad de sólidos se recuperó. Está pérdida de biomasa se relaciona con el crecimiento del micelio de *T. hirsuta* Bm-2, debido a que mientras se observa una disminución del sustrato, se puede ver el aumento en la cantidad de micelio recuperado (Figura 3.8). La pérdida de peso del sustrato se atribuye a la degradación no selectiva y rápida de los componentes orgánicos por los hongos ligninolíticos [87]. A los 28 días de pretratamiento, la separación entre la fibra y el micelio ya no fue posible, por lo que sólo se presentan los resultados hasta la tercera semana en el Figura 3.8.

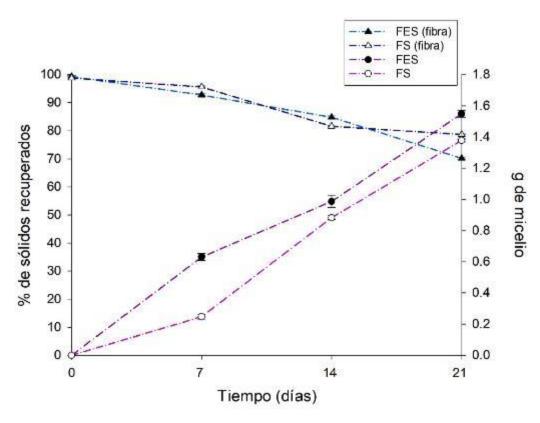


Figura 3.8. Comparación entre el % de sólidos recuperados después de los pretratamientos biológicos y el crecimiento de *Trametes hirsuta* Bm-2 en los diferentes tiempos de incubación (0, 7, 14 y 21 días).

Los sólidos recuperados, en el pretratamiento biológico en estado sólido, fueron del 92.75 \pm 0.44 al 70.16 \pm 0.41 % y con el pretratamiento en medio líquido se registraron del 95.63 \pm 0.36 al 78.70 \pm 0.17 % (Figura 3.8). Estos valores son mayores a los sólidos recuperados después de pretratamientos hidrótermicos bajo condiciones más agresivas. La severidad del pretratamiento, influye en la recuperación de los sólidos pretratados. Goncalves et al. [57], después de realizar pretratamientos hidrotérmicos catalizados con NaOH sobre fibra de coco, reportaron 60.52 \pm 1.86 % de sólidos recuperados una temperatura de 160 °C, 10 min y a una concentración al 1 % para el NaOH, mientras que, a una temperatura de 200 °C, 50 min y una concentración al 4 % NaOH registraron 21.64 \pm 0.39 % de sólidos recuperados.

Los resultados de la cantidad de sólidos recuperados después del pretratamiento biológico en estado sólido, con 7 días de pretratamiento, fueron similares a los sólidos recuperados después de pretratar la fibra de coco con glicerol acuoso (94.3 % (130 °C, 30 min) y 93.8 % (130 °C, 60 min)) [84]. Los sólidos recuperados del pretratamiento biológico con 28 días de cultivo estacionario, fueron similares a los sólidos recuperados (74.31 \pm 0.20 % y 77.45 \pm 1.13 %) después de una autohidrólisis para pretratar la cáscara de coco verde, a temperaturas de 200 y 180 °C respectivamente, durante 50 min [59] y a los sólidos recuperados (78.3 %) del pretratamiento en la fibra de coco con HCI (130 °C, 15 min).

Con el pretratamiento biológico en estado sólido, se obtuvo una reducción del sustrato del 29.84 % y con el pretratamiento en medio líquido del 21.3 %, después de 28 días de pretratamiento. Lo anterior coincide, con el trabajo donde se evaluaron diferentes cepas de hongos ligninolíticos, en pretratamientos biológicos en estado sólido, empleando diversos sustratos y tamaños de partícula. En dicho estudio, se reportó una reducción de los sólidos pretratados biológicamente, entre 28.57 y 30.07 %, para un tamaño de partícula de 0.50 mm, mientras que a un mayor tamaño (10 mm) la reducción del sustrato fue de 12.50 y 19.29 % después de 30 días de incubación [87]. Lo anterior reitera que el tamaño de partícula, influye de manera positiva, es decir a menor tamaño de partícula ocurre una mejor biodegradación del sustrato.

El pretratamiento biológico en estado sólido, permitió una disminución de la lignina, que fue directamente proporcional al tiempo de pretratamiento, obteniéndose el menor porcentaje de deslignificación (30.96 \pm 0.20 %) a los 7 días y la mayor deslignificación a los 28 días (37.77 \pm 0.07 %) (Tabla 3.3). Con el pretratamiento en medio líquido se registraron valores de 29.86 \pm 0.06 y 43.44 \pm 0.10 %, para el de menor y mayor deslignificación respectivamente. La reducción de lignina, al aumentar el tiempo de exposición en el pretratamiento, ha sido reportado por Goncalves *et al.* [59].

Los porcentajes de lignina obtenidos en ambos tratamientos $(22.95 \pm 0.07 \% y 20.85 \pm 0.10)$ (Tabla 3.3), son comparables a los reportados por Goncalves et al. [57] en un pretratamiento de cáscara de coco maduro a una temperatura de 160 °C con NaOH al 1 y 4 % por 10 min, los valores de lignina obtenidos en ambas condiciones fueron de 22.95 \pm 0.10 y 20.20 0.23 % respectivamente, en dicho trabajo la reducción de lignina incrementó linealmente, con el

incremento en las condiciones del pretratamiento, tomando en cuenta la concentración alcalina, la temperatura y el tiempo de reacción [57].

Tabla 3.3. Reducción del contenido de lignina en los diferentes tiempos de los pretratamientos biológicos.

Tratamiento	Tiempo (días)	Lignina Klason (%)	Deslignificación (%)
Pretratamiento biológico en estado sólido	0	36.87 ± 0.10	0
	7	25.46 ± 0.20	30.96 ± 0.20
	14	24.02 ± 0.63	34.85 ± 0.63
	21	23.21 ± 0.08	37.04 ± 0.08
	28	22.95 ± 0.07	37.77 ± 0.07
	0	36.87 ± 0.10	0
	7	25.86 ± 0.06	29.86 ± 0.06
Pretratamiento biológico en medio	14	25.25 ± 0.12	31.52 ± 0.12
líquido	21	23.42 ± 0.11	36.48 ± 0.11
	28	20.85 ± 0.10	43.44 0.10

La deslignificación obtenida con el pretratamiento biológico en estado sólido (37.77 \pm 0.07 %) se ha reportado al pretratar la fibra de la cáscara de coco con glicerol acuoso (37.7 %) y en combinación de éste con HCl (37.6 %) a una temperatura de 130 °C durante 30 minutos. Mientras, la deslignificación obtenida en el pretratamiento en medio líquido (43.44 \pm 0.10 %), fue cercana a la deslignificación de la fibra de coco con una solución acuosa de glicerol a 130 °C por 60 min [84].

Las variaciones en la deslignificación, observadas con diferentes sustratos, podrían deberse al contenido de este compuesto en la biomasa inicial [87], y a las condiciones del

tratamiento, como ocurrió por ejemplo en un estudio al pretratar una biomasa lignocelulósica con 21 % de lignina inicial, después de un pretratamiento alcalino este disminuyó a 19.64 % [71], mientras otra biomasa que contenía un 25.02 % logró bajar a 2.72 % al someterse a una temperatura de 200 °C, durante 50 min empleando NaOH a una concentración del 4 % [57].

3.2.4 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

El análisis de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (Figura 3.9), se realizó con el propósito de obtener información de los grupos funcionales presentes en la fibra de coco verde sin tratar, y compararlos con la fibra pretratada para los tiempos de incubación que presentaron mayor actividad lacasa, y explicar mejor los daños que se observaron en las micrografías. En el espectro para el control se observó una banda a una longitud de 3340 cm⁻¹, la cual se encuentra entre el rango de banda para grupos OH alifáticos y fenólicos (3396-3381 cm⁻¹) [57], está banda mostró una disminución en su intensidad a los 7 días del pretratamiento biológico en estado sólido.

En la Figura 3.9, se pueden observar picos a 2942 y 2896 cm⁻¹, ambos se encuentran asociados a bandas de estiramiento de CH de grupos metilo y metileno (2962-2874 cm⁻¹) [57]. Para las fibras de ambos pretratamientos biológicos, se observaron en menor intensidad respecto a la fibra sin tratar. Este comportamiento también se observó para el pico a 1728 cm⁻¹, 1165 y 895 cm⁻¹ (1164 y 897 cm⁻¹) los cuales están asociados a la hemicelulosa [77].

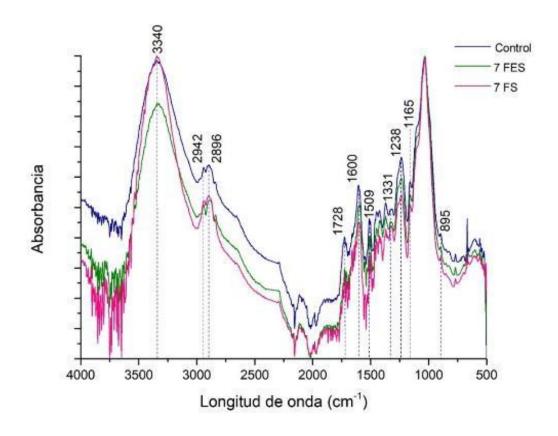


Figura 3.9. Espectros FT-IR de las fibras de coco verde sin tratar y pretratadas biológicamente, a los 7 días.

A una longitud de 1600 cm⁻¹ apareció un pico, el cual corresponde a las vibraciones C-C del anillo aromático del fenilpropano [88]. Para el tratamiento en cultivo en medio líquido se observó este pico en menor intensidad comparado con la muestra control y el tratamiento biológico en estado sólido (Figura 3.9), lo cual también ocurrió para el pico que se observó a 1509 cm⁻¹. Este pico se encuentra dentro de las longitudes de onda reportadas para la lignina (1510 cm⁻¹) [89,90]. Las reducciones en la intensidad de las fibras tratadas indican la ruptura de enlaces de este compuesto, lo cual concuerda con la remoción de la lignina después de los tratamientos (Tabla 3).

El pico que se observó a una longitud de onda de 1331 cm⁻¹ corresponde al estiramiento de CO del anillo de siringilo [48,89], el cual disminuyó para las fibras pretratadas. La presencia

de un pico a 1238 cm⁻¹ se relaciona con ésteres, éteres y grupos fenólicos atribuidos principalmente a la presencia de ceras en el tejido epidérmico de la biomasa lignocelulósica, la disminución en la intensidad observada después de los pretratamientos representa la eliminación de esas ceras [66,79], lo cual se corrobora con lo observado en las micrografías realizadas en este trabajo.

3.3 Efecto de los pretratamientos físico y fisicoquímicos

La concentración de fenoles para la muestra control fue de 0.23 ± 0.02 mg • mL⁻¹, la cual aumentó a 1.08 mg • mL⁻¹ ± 0.04 al sonicarse el sustrato durante una hora, mientras que al emplear las ondas ultrasónicas en combinación con un extracto crudo de lacasas de *T. hirsuta* Bm-2, se obtuvo una concentración de fenoles de 0.49 ± 0.03 mg • mL⁻¹. El pretratamiento combinado de ultrasonido más lacasa comercial registró una concentración de fenoles de 0.74 ± 0.06 mg • mL⁻¹ (Figura 3.10).

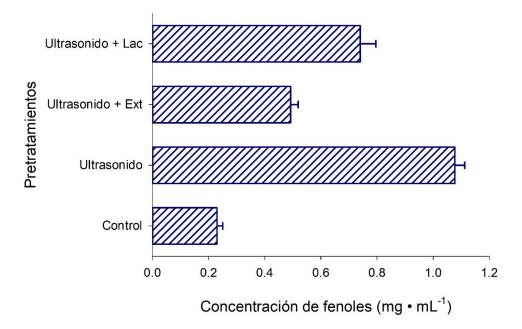


Figura 3. 10. Concentración de fenoles, en mg de ácido gálico • mL⁻¹, después de los pretratamientos físico y fisicoquímicos.

La mayor cantidad de fenoles se registró al pretratar la biomasa lignoceluósica con el ultrasonido, sin embargo, la disminución de estos compuestos fenólicos cuando se emplearon las ondas ultrasónicas combinadas con enzimas lacasas, pudo deberse al factor dinámico de las lacasas que consiste, en emplear fenoles de la lignina como mediadores, para actuar sobre compuestos no fenólicos, lo cual explicaría la mayor deslignificación cuando se empleó el ultrasonido en combinación con enzimas. Una disminución en el contenido de lignina al combinarse el ultrasonido con lacasa ya ha sido reportado en un trabajo donde se evaluaron distintos tratamientos en biomasa lignocelulósica [67].

Con respecto a la actividad de la enzima lacasa en los tratamientos donde se utilizó, se obtuvo una actividad inicial promedio de 68.98 ± 2.58 U • mL⁻¹, transcurrido el tiempo de sonicación, dicha actividad se mantuvo con el extracto crudo (65.59 U • mL⁻¹), mientras para la enzima comercial se registró una actividad de 59.10 ± 1.41 U • mL⁻¹ (Figura 3.11). No se realizó cuantificación de la actividad lacasa para el pretratamiento con solo ultrasonido, por lo que no se incluye en la Figura 3.11.

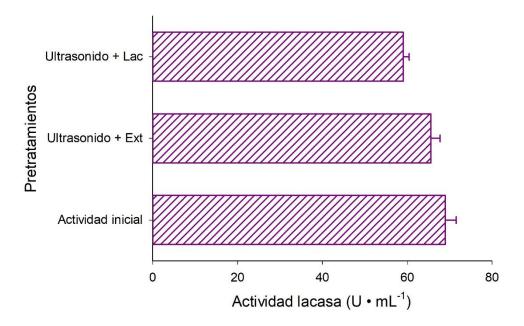


Figura 3.11. Actividad lacasa en U • mL-1 en la fracción líquida de los pretratamientos fisicoquímicos.

En la Figura 3.12, se muestran los cambios sufridos por la fibra, después del pretratamiento en medio líquido durante 7 días. La fibra sin tratar se puede observar uniforme y lisa (Figura 3.12a), después de los pretratamiento con ultrasonido, ya sea solo o en combinación con enzimas lacasas, se observaron modificaciones en la estructura de las fibras, que comparadas con las micrografías de los pretratamientos biológicos (Figuras 3.4 y 3.7), los primeros presentaron mayores daños físicos generados por efecto de la cavitación producida por las ondas ultrasónicas.

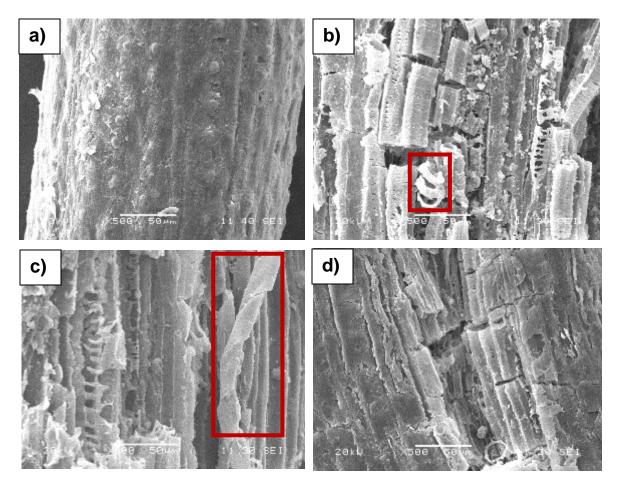


Figura 3.12. Micrografías de fibra de cáscara de coco verde después de los pretratamientos físico y fisicoquímicos. **a)** Control (fibra sin tratar); **b)** Ultrasonido; **c)** Ultrasonido combinado con extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2; **d)** Ultrasonido combinado con lacasa comercial de *Aspergillus* sp.

En las fibras pretratadas solo con ultrasonido, se observaron grietas, rupturas, y unas estructuras tipo anillos que se están separando entre sí (Figura 3.12b), modificaciones similares han sido observadas al pretratar cáscara de coco maduro con Alk-H₂O₂ [77], también el enrollamiento observado en la fibra de coco verde tratada con ultrasonido combinado con el extracto crudo (Figura 3.12c) se observó en el tratamiento de la fibra de coco maduro con Alk-H₂O₂ antes mencionado. Al comparar el cambio en las estructuras pretratadas fisicoquímicamente con las pretratadas biológicamente, se puede observar que la aparición de los pequeños poros observados en los pretratamientos biológiccos no se encontraron tan numerosos en los pretratamientos empleando ultrasonido.

Las estructuras tipo anillo que se observaron en los pretratamientos con ultrasonido, son similares a las reportadas en bambú después de haber sido tratado con un consorcio fungíco [83]. Aunque se observó el aumento en la fragmentación de la biomasa pretratada como efecto físico generado por el ultrasonido, no se logró observar las áreas claras que indican la erosión de la superficie debido a la reacción de oxidación de la lacasa [67]. La diferencia existente puede deberse al contenido inicial de lignina del material lignocelulósico [67].

Al realizarse la cuantificación de azúcares reductores, se obtuvo para la muestra control (muestra sin sonicar), una concentración de 0.58 g • L-1, después de los pretratamientos fisicoquímicos la concentración disminuyó a 0.14 g • L-1 (Figura 3.13). Lo disminución de los azúcares al emplear ultrasonido ha sido reportado por Montoro *et al.* [91], quienes mencionan que los resultados obtenidos podrían explicarse por la presencia de reacciones de recombinación de la lignina y de degradación y condensación de azúcares durante el tratamiento con ultrasonido. En dicho trabajo se observó que la recuperación de azúcares fermentables alcanzó valores más elevados cuando no se aplicó ultrasonido.

Bussemaker y Zhang [42], mencionan que la aplicación de ultrasonido no siempre es beneficiosa ya que, además de favorecer la separación y despolimerización de polisacáridos, también puede conducir a la degradación y condensación de los azúcares, lo que genera como consecuencia la pérdida de hidratos de carbono y una disminución de los rendimientos del proceso [91].

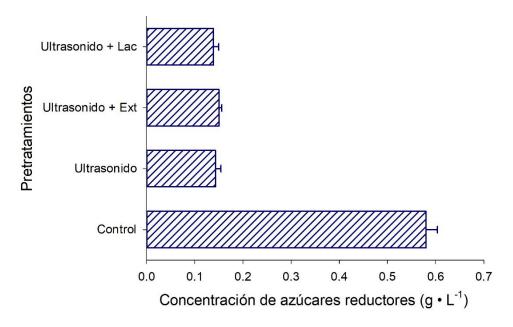


Figura 3.13. Concentración de azúcares reductores en g equivalentes de glucosa • L-1 obtenida a partir de las fibras de coco pretratadas física y fisicoquímicamente.

3.3.1 Análisis de la deslignificación

Después del pretratamiento solamente con ultrasonido, se obtuvo 31.25 ± 0.12 % de lignina insoluble en ácido, mientras que para los tratamientos con ultrasonido combinado con lacasa (extracto crudo y comercial), se obtuvieron valores de 29.32 ± 0.05 y 29.21 ± 0.05 % (Tabla 3.4). Lo que nos dio una reducción de la lignina inicial de 15.25 ± 0.12 , 20.48 ± 0.05 y 20.77 ± 0.05 % respectivamente.

Tabla 3.4. Reducción del contenido de lignina en los pretratamientos físico y fisicoquímicos.

Tratamiento	Lignina Klason (%)	Deslignificación (%)
Control	36.87 ± 0.10	0
Ultrasonido	31.25 ± 0.12	15.25 ± 0.12
Ultrasonido + Ext	29.32 ± 0.05	20.48 ± 0.05
Ultrasonido + Lac	29.21 ± 0.05	20.77 ± 0.05

Nagula *et al.* [67], reportaron un porcentaje de deslignificación similar (18 %) para deslignificación de biomasa lignocelulósica empleando ultrasonido, se coincidió con dicho trabajo en que fue el tratamiento donde menor reducción de lignina se obtuvo de los pretratamientos evaluados. Dentro de los tratamientos que se llevaron a cabo en ese estudio, con el uso del ultrasonido combinado con enzimas lacasas, se obtuvo un 75 % de deslignificación [67].

Cabe mencionar, que las condiciones en las que se llevó a cabo el tratamiento con ultrasonido, en este presente trabajo, no fueron con agitación como lo emplearon en el trabajo de Nagula et al. [67], donde usaron un agitador de vidrio unido a un motor en lo alto para generar 300 rpm durante dos horas, mientras que en el ultrasonido combinado con lacasa el pretratamiento fue por 6 h. Lo anterior podría ser una respuesta al porque no se obtuvo el aumento en la deslignificación como se reportó para dicho trabajo.

El porcentaje de deslignificación obtenido con el pretratamiento fisicoquímico (Tabla 3.4) fue menor al compararse con el pretratamiento biológico con *T. hirsuta* Bm-2, donde se logró hasta un 43 % de disminución en la lignina al pretratar la fibra de coco verde en medio líquido (Tabla 3.2). Sin embargo, ya se ha reportado un porcentaje similar en la deslignificación (19.98 %) de la cáscara de coco. En dicho trabajo, la fibra fue tratada con NaOH al 4 % durante 10 min a 160 °C [57]. Otro estudio menciona que al pretratar fibra de cáscara de coco empleando glicerol acuoso con HCl, se obtuvo una pérdida del 24.3 % de lignina [84].

Los valores obtenidos para la deslignificación con el uso del ultrasonido fueron más altos que los valores reportados en un estudio donde se pretrato biomasa lignocelulósica con *T. hirsuta* yj9 en un pretratamiento biológico en estado sólido por 7 días, en dicho trabajo se reportó una deslignificación del 14.95 ± 1.68 % [66]. Cuando se compararon los resultados obtenidos con los pretratamientos físico, fisicoquímicos (Tabla 3.4) y biológicos en la deslignificación, de fibra de coco verde en el presente trabajo, los pretratamientos biológicos registraron los valores más altos (Tabla 3.2). Aunque con el pretratamiento físico empleando ondas ultrasónicas, se obtuvo mayor concentración de fenoles, comparado con las concentraciones obtenidas en los demás pretratamientos evaluados, no debemos olvidar que la lignina está compuesta de compuestos fenólicos y no fenólicos, y por la

cantidad de lignina contenida en las fibras de coco, se requiere o bien pretratamientos más agresivos, o el empleo de las enzimas ligninolíticas que usen los fenoles liberados, para favorecer la despolimerización de la lignina en las fibras de coco [92]. No todos los compuestos fenólicos son susceptibles a la oxidación de las enzimas lacasas. Menos del 20 % de los compuestos fenólicos en la lignina pueden ser oxidados de manera directa por las lacasas [49].

3.3.2 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

El análisis de los espectros FT- IR para la fibra de coco verde sin tratar y después de los tratamientos empleando ultrasonido, ya sea solo o en combinación con lacasas de un extracto crudo o de enzimas comerciales (Figura 3.14), se realizó con el propósito de obtener información de los grupos funcionales y compararlos para observar cambios sufridos en la intensidad en caso de haberlos después de los pretratamientos.

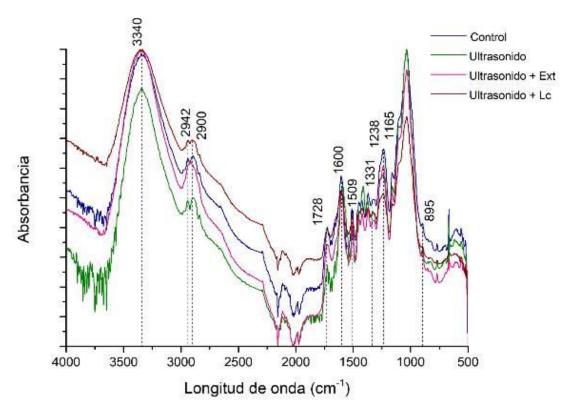


Figura 3.14. Espectros FT-IR de las fibras sin tratar y las fibras pretratadas con ultrasonido, ultrasonido combinado con un extracto crudo enzimático de enzima lacasa y ultrasonido combinado con lacasa comercial.

En el espectro para la fibra sin tratar se observó una banda a una longitud de 3340 cm⁻¹, la cual se encuentra entre el rango de banda para grupos OH alifáticos y fenólicos (3396 – 3381 cm⁻¹) [57], la cual no se modificó para la fibra tratada con ultrasonido combinado con lacasas de un extracto crudo de *T. hirsuta*, sin embargo hay una disminución en la intensidad de este pico para la fibra tratada solamente con ultrasonido lo cual corrobora el aumento en la cantidad de fenoles observado (Figura 3.10).

Para los picos que aparecen a 2942 y 2896 cm⁻¹, asociados al estiramiento de CH de grupos metilo y metileno (2962-2874 cm⁻¹) [57], se puede observar que las fibras tratadas solamente con ultrasonido y ultrasonido con extracto crudo tienen una disminución en la intensidad, mientras que para la fibra tratada con ultrasonido y la enzima comercial tiene un incremento en la intensidad.

También se observó que para el pico que aparece a 1728 cm⁻¹, asociado a la hemicelulosa [77], tuvo una disminución en su intensidad para todas las fibras pretratadas. Este comportamiento también se observó para el pico a una longitud de onda de 1600 cm⁻¹, el cual corresponde a las vibraciones C-C del anillo aromático del fenilpropano [88], y para el pico a 1509 cm⁻¹, el cual se encuentra dentro de las longitudes de onda reportadas para la lignina (1510 cm⁻¹) [89,90].

El pico que se observó a una longitud de onda de 1331 cm⁻¹ corresponde al estiramiento de CO del anillo de siringilo [48,89], el cual disminuyó para las fibras pretratadas, lo cual también ocurrió para la intensidad del pico que aparece a 1238 cm⁻¹, relacionado con ésteres, éteres y grupos fenólicos atribuidos principalmente a la presencia de ceras en el tejido epidérmico de la biomasa lignocelulósica, la disminución en la intensidad observada después de los pretratamientos representa la eliminación de esas ceras [66,79], como ocurrió también para los pretratamientos biológicos realizados en este estudio, lo cual también se observó para los picos a 1165 y 895 cm⁻¹, los cuales son característicos de la hemicelulosa (1164, 897 cm⁻¹) [77]; para todas las fibras pretratadas, los picos anteriores, se observaron en menor intensidad comparados con la fibra sin tratar.

3.4 Sacarificación de los pretratamientos biológicos

En la Figura 3.15, se muestran las concentraciones obtenidas después de la sacarificación. Las mayores concentraciones de azúcares fermentables, después de 72 horas de hidrólisis enzimática, se obtuvieron con el pretratamiento biológico en medio líquido, con las fibras pretratadas a los 7 y 14 días (9.57 ± 0.15 y 8.37 ± 0.08 g • L-1 respectivamente), aumentando más del doble de la concentración con respecto al de la fibra sin tratar (3.84 g • L-1) (Figura 15b). Mientras que para los mismos tiempos de pretratamiento en estado sólido (7 y 14 días), se obtuvieron concentraciones similares a las de la fibra sin tratar 3.46 y 3.49 g • L-1 (Figura 15a) Con las fibras pretratadas después de 14 días, en ambos pretratamientos biológicos, se obtuvo una menor concentración de azúcares.

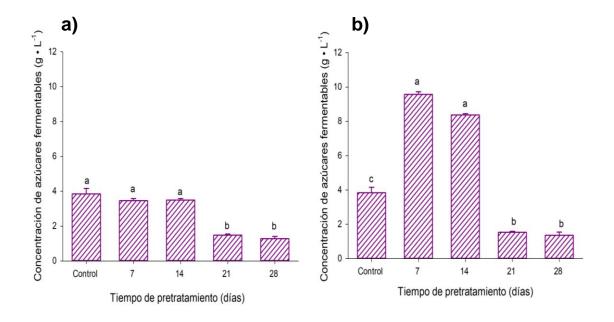


Figura 3.15. Concentración de azúcares fermentables de los pretratamientos biológicos con *Trametes hirsuta* Bm-2 después de la hidrólisis enzimática. **a)** En estado sólido, **b)** en medio líquido. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tiempos de incubación (P<0.05, Prueba

Los resultados obtenidos en la concentración de azúcares fermentables, de la fibra pretratada biológicamente en medio líquido, indican que éste permite una mayor accesibilidad a la celulosa, como resultado de la alta actividad lacasa, que promovió la despolimerización de la lignina mediante el empleo de los fenoles liberados en la deslignificación. Las lacasas también pudieron detoxificar la biomasa, ayudando a la mejora de la sacarificación después del pretratamiento. La disminución de las concentraciones de azúcares fermentables, a mayores tiempos de pretratamiento, puede asociarse a la pérdida de carbohidratos durante el proceso de pretratamiento o a la liberación de compuestos inhibidores de la lignina aún presente en la fibra de coco.

La concentración de azúcares con el pretratamiento biológico en medio líquido, fue similar a la concentración reportada con un pretratamiento alcalino al 1% de NaOH (p/v) por Soares *et al.* [14], quienes obtuvieron una concentración de azúcares de 8.7 ± 0.1 % (p/v). La mejora en la concentración de glucosa durante la hidrólisis ha sido reportada por Bolivar-Telleria [61], quién reportó una concentración de 13 g • L⁻¹ con 0.5 g de polietilenglicol • g⁻¹ de biomasa. Mientras que para los controles la concentración de glucosa obtenida fue de 3 a 6 g • L⁻¹. Lo cual sugiere que después del pretratamiento en fibra de coco, debería llevarse a cabo una detoxificación para eliminar los inhibidores generados en el pretratamiento.

3.5 Sacarificación de los pretratamientos físico y fisicoquímicos

Con los pretratamientos físico y fisicoquímicos, al no haber una buena deslignificación durante la hidrólisis enzimática, pudieron existir compuestos inhibidores, como por ejemplo fenoles derivados de la lignina aún presentes en la biomasa, los cuales inhibieron las enzimas hidrolíticas, durante este proceso. La vainillina y el siringaldehído inhiben las celulasas, en particular las B-glucosidasas, mientras que el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico las desactivan. La conversión diferente que se realiza con los distintos pretratamientos, incluso si se inicia la hidrólisis enzimática con una cantidad de lignina similar, no siempre darán los mismos resultados. Existen otros factores como la composición de la lignina, que deben tomarse en cuenta además del contenido de lignina después del pretratamiento [61].

CONCLUSIONES

La fibra de coco verde es una fuente potencial para la producción de bioetanol de segunda generación, está constituida por 33.31 % de celulosa, 11.36 % de hemicelulosa y 36.97 % de lignina.

La mayor deslignificación de la fibra de coco verde en los pretratamientos biológicos con *T. hirsuta* Bm-2 se obtuvo a los 28 días de pretratamiento. En cultivo en medio líquido se alcanzó una deslignificación de 43.44 %, mientras que la deslignificación con el pretratamiento biológico en estado sólido fue de 37.77%.

Las ondas ultrasónicas provocan daños físicos en la estructura de la fibra, sin embargo, no se tuvo una despolimerización adecuada de la lignina. Con el uso de solo ultrasonido se obtiene una deslignificación de 15.25 % en la fibra de coco verde. Usando el ultrasonido en combinación con lacasas de un extracto crudo de *T. hirsuta*, la deslignificación fue de 20.48 % y con lacasa comercial fue de 20.77 %. Este grado de deslignificación no es suficiente para que se lleve a cabo la sacarificación.

El cultivo en medio líquido fue el mejor pretratamiento, a nivel laboratorio, para la deslignificación de fibra de coco verde. Con este pretratamiento se obtuvo la mayor deslignificación, además de la obtención de extractos crudos con alta actividad lacasa, lo cual permitió obtener una mayor concentración de azúcares fermentables durante el proceso de hidrólisis enzimática.

BILIOGRAFÍA

- García-Bustamante, C.A., Masera-Cerutti, O. (2016) Estado del arte de la bioenergía en México, Red Temática de Bioenergía (RTB) del CONACYT, México.
- 2. Ruiz, H.A., Martínez, A., Vermerris, W. (2016) Bioenergy potential, energy crops, and biofuel production in Mexico, Bioenergy Res. 9, 981–984.
- 3. Montiel, C., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Bárzana, E. (2016) Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion-saccharification process, Bioenergy Res. *9*, 1005–1014.
- 4. Sánchez Riaño, A.M., Gutiérrez Morales, A.I., Muñoz Hernández, J.A., Rivera Barrero, C.A. (2010) Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos, Tumbaga *5*, 61–91.
- 5. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE), Javier, R. (2007) Energía de la biomasa, IDAE, España.
- 6. Cámara de Diputados México del H. Congreso de la Unión (2013) Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética. D. Of. la Fed., 1–16.
- 7. Orencio-Trejo, M., De la Torre-Zavala, S., Rodriuez-Garcia, A., Avilés-Arnaut, H., Gastelum-Arellanez, A. (2016) Assessing the performance of bacterial cellulases: the use of *Bacillus* and *Paenibacillus* strains as enzyme sources for lignocellulose saccharification, Bioenergy Res. *9*, 1023–1033.
- 8. Orencio-Trejo, M., Torres-Granados, J., Rangel-Lara, A., Beltrán-Guerrero, E., García-Aguilar, S., Moss-Acosta, C., Valenzuela-Soto, H., De la Torre-Zavala, S., Gastelum-Arellanez, A., Martinez, A., *et al.* (2016) Cellulase and xylanase production by the mexican strain *Talaromyces stollii* LV186 and its application in the saccharification of pretreated corn and sorghum stover, Bioenergy Res. *9*, 1034–1045.
- Moheno de la Cruz, M.G. (2013) Uso de un hidrolizado de cáscaras de naranjatoronja y dos cepas de levadura para la obtención de bioetanol. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, México.
- Guarnizo Franco, A., Martínez Yépes, P.N., Valencia Sánchez, H.A. (2009) Biomass and cellulose pretreatments for saccharification, Sci. Tech. 15, 284–289.
- 11. Carrillo-Nieves, D., Ruiz, H.A., Aguilar, C.N., Ilyina, A., Parra-Saldivar, R., Torres,

- J.A., Martínez Hernández, J.L. (2017) Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues, Bioresour. Technol. *239*, 430–436.
- 12. Ko, J.K., Bak, J.S., Jung, M.W., Lee, H.J., Choi, I.G., Kim, T.H., Kim, K.H. (2009) Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes, Bioresour. Technol. *100*, 4374–4380.
- 13. Oke, M.A., Mohamad Annuar, M.S., Simarani, K. (2016) Mixed feedstock approach to lignocellulosic ethanol production—Prospects and limitations, Bioenergy Res. *9*, 1189–1203. http://dx.doi.org/10.1007/s12155-016-9765-8.
- 14. Soares, J., Demeke, M.M., Foulquié-Moreno, M.R., Van de Velde, M., Verplaetse, A., Ribeiro Fernandes, A.A., Thevelein, J.M., Bueno Fernandes, P.M. (2016) Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production, Bioresour. Technol. 216, 744–753. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.105.
- 15. Sánchez Teyer, L.F. (2016) Coco, industria con futuro | Mundo Ejecutivo. Available at: http://mundoejecutivo.com.mx/economia-negocios/2016/05/19/coco-industria-futuro Consultado: 14 de noviembre de 2017.
- García Martín, J.F., Sánchez Villasclaras, S., Bravo Rodríguez, V. (2010) Producción de bioetanol a partir del residuo de la poda de olivo, Veritas, Curbet Comunicació Gráfica, España.
- 17. Abril González, A.J., Navarro Camba, E.A. (2012) Etanol a partir de biomasa lignocelulósica, Aleta Ediciones, España.
- 18. Drapcho, C.M., Nhuan, N.P., Walker, T.H. (2008) Biofuels engineering process technology 1st ed. McGraw-Hill Edducation, Estados Unidos.
- Zumárraga Pech, J.A. (2012) Efecto de los pretratamientos hidrotérmicos en la composición química y la sacarificación del bagazo de *Agave tequilana*, Tesis de Maestría, CICY, México.
- Uicab Ballote, F.A. (2011) Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática del bagazo de henequén. Estudio de los azúcares liberados en el proceso. Tesis de Maestría, CICY, Mexico.
- 21. Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G. (2016) Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches, Renew. Sustain. Energy Rev. *66*, 751–774.

- http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038.
- Fillat, Ú., Ibarra, D., Eugenio, M., Moreno, A., Tomás-Pejó, E., Martín-Sampedro, R.
 (2017) Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: A review, Fermentation 3, 1–17.
- 23. Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, Energy Convers. Manag. *52*, 858–875. http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013.
- 24. Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K.Y., Olabi, A.G. (2017) Pretreatment techniques used in biogas production from grass, Renew. Sustain. Energy Rev. *68*, 1193–1204. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.02.022.
- 25. Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G. (2017) Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress, Renew. Sustain. Energy Rev. *71*, 475–501. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, Bioresour. Technol. *96*, 673–686.
- 27. Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2011) Pretreatment technologies for lignocellulose to bioethanol conversion. En Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes, Elsevier Sciencie, España, pp. 149–176.
- 28. Singh, Y.D., Satapathy, K.B. (2018) Conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol: An overview with a focus on pretreatment, Int. J. Eng. Technol. *15*, 17–43.
- 29. Serrato Sabogal, J.H. (2018) Revisión del estado del arte de los diferentes tipos de pretratamiento usados en residuos de poda para ser aprovechado posteriormente. Tesis de Licenciatura, Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- 30. Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2015) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials, Bioresour. Technol. *199*, 49–58. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061.
- 31. Peral, C. (2016) Biomass Pretreatment Strategies (technologies, environmental performance, economic considerations, industrial Implementation). En: Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products: The Food, Feed, Fibre, Fuel (4F) Economy, P. Poltronieri and O. D'Urso, eds. Elsevier Inc., Estados Unidos, pp. 125–160. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803622-8.00005-7.

- 32. Oriez, V., Peydecastaing, J., Pontalier, P.Y. (2019) Lignocellulosic biomass fractionation by mineral acids and resulting extract purification processes: Conditions, yields, and purities, Molecules *24*.
- Arenas-Cárdenas, P., Lóze-López, A., Moeller-Chávez, G.E., León-Becerril, E.
 (2017) Current pretreatments of lignocellulosic residues in the production of bioethanol, Waste and Biomass Valorization 8, 161–181.
- 34. Alvira, P., Tomás-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010) Petreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, Bioresour. Technol. *101*, 4851–4861.
- 35. Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. (2009) Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysi, Microbiol. Biotecchnology *82*, 815–827.
- 36. Piñeros-Castro, Y., Velasco, G.A., Proaños, J., Cortes, W., and Ballesteros, I. (2011) Producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión con vapor, Rev. Ion *24*, 23–28.
- 37. Sun, S., Cao, X., Sun, S., Xu, F., Song, X., Sun, R.-C., Jones, G.L. (2014) Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation, Biotechnol. Biofuels 7, 1–12.
- 38. Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, Ind. Eng. Chem. Res. *48*, 3713–3729.
- 39. Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J., Spiess, A.C. (2009) High-throughput screening for ionic liquids dissolving lignocellulose, Bioresour. Technol. *100*, 2580–2587.
- 40. Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, Bioresour. Technol. *96*, 1986–1993.
- 41. Ur Rehman, M.S., Kim, I., Chisti, Y., Han, J. I. (2013) Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic biomass, Energy Educ. Sci. Technol. Part A Energy Sci. Res. *30*, 1391–1410.
- 42. Bussemaker, M.J., Zhang, D. (2013) Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications, Ind. Eng. Chem. Res. *52*, 3563–3580.

- 43. Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T., Lambert, A. (2009) Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound, J. Biobased Mater. Bioenergy 3, 1–7.
- Moreno, A.D., Alvira, P., Ibarra, D., Tomás-Pejó, E. (2017) Production of ethanol from lignocellulosic biomass. En: Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources, Springer Nature, Singapore, pp. 375–410.
- 45. Kumar, R., Wyman, C.E. (2009) Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. Biotechnol. Prog. 25, 302–314.
- 46. Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, Bioresour. Technol. 83, 1–11.
- 47. Mohanram, S., Rajan, K., Carrier, D.J., Nain, L., Arora, A. (2015) Insights into biological delignification of rice straw by *Trametes hirsuta* and *Myrothecium roridum* and comparison of saccharification yields with dilute acid pretreatment, Biomass and Bioenergy 76, 54–60.
- 48. Akpinar, M., Ozturk Urek, R. (2017) Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization, 3 Biotech 7.
- 49. Martín-Sampedro, R., Fillat, Ú., Ibarra, D., Eugenio, M.E. (2015) Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*, Bioresour. Technol. *196*, 383–390.
- 50. Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, Á., Martínez, Á.T., Martínez, M.J. (2009) Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol, Bioresour. Technol. *100*, 6378–6384.
- 51. Matei, F., Kosseva, M.R. (2017) Microbiology of fruit wine production. En Science and Technology of Fruit Wine Production, M. R. Kosseva, V. K. Joshi, and P. s. Panesar, eds., Elsevier Inc, United Kingdom, pp. 73–103. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800850-8.00002-8.
- Malakar, S., Paul, S.K., Jolvis Pou, K.R. (2020) Biotechnological interventions in beverage production. En Biotechnological progress and beverage consumption, A. M. Grumezescu, A. M. Holban, eds. Elsevier Inc., India, pp. 1–37. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00001-1.
- 53. Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H. (2016) Second

- generation bioethanol production: A critical review, Renew. Sustain. Energy Rev. *66*, 631–653.
- 54. Granados-Sánchez, D., López-Ríos, G.F. (2002) Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L .) en México, Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient. *8*, 39–48.
- 55. CABI (2020). Cocos nucifera (coconut). Invasive Species Compend. https://www.cabi.org/isc/datasheet/11788 Consultado: 10 de abril de 2020.
- 56. SAGARPA (2017). Agrícola Nacional. Planeación agrícola Nac. 2017-2030, 1–14.
- 57. Gonçalves, F.A., Ruiz, H.A., Silvino dos Santos, E., Teixeira, J.A., Ribeiro de Macedo, G. (2016) Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept, Renew. Energy *94*, 353–365.
- 58. Bolivar-Telleria, M., Turbay, C., Favarato, L., Carneiro, T., S. de Biasi, R., Fernandes, A.A.R., Santos, A.M.C., Fernandes, P.M.B. (2018) Second-generation bioethanol from coconut husk, Biomed Res. Int. *2018*, 1–20.
- Gonçalves, F.A., Ruiz, H.A., Silvino dos Santos, E., Teixeira, J.A., Ribeiro de Macedo,
 G. (2015) Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis, Ind. Crops Prod. 77, 1–12.
- 60. Nogueira, C. da C., de Araújo Padilha, C.E., de Jesus, A.A., de Santana Souza, D.F., de Assis, C.F., de Sousa Junior, F.C., Santos, E.S. (2019) Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers, Ind. Crops Prod. 130, 259–266.
- 61. Bolivar Telleria, M. (2019) Reduction of the enzime loading for hyfrolysis of alkaline pretreated green coconut husk. Tesis de Maestría, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.
- 62. Carrijo, O.A., Setti de Liz, R., Makishima, N. (2002) Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola, Hortic. Bras. *20*, 533–535.
- 63. Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Nrel, J.W. (2008) Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples, Natl. Renew. Energy Lab., 3–5.
- 64. Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Rojas-Herrera, R., Cortes-Velazquez, Alberto; Rivera-Muñoz, G., Solis-Pereira, S. (2011) New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorizatio, African J. Biotechnol. *10*, 10134–

10142.

- 65. Ancona-Escalante, W., Tapia-Tussell, R., Pool-Yam, L., Can-Cauich, A., Lizama-Uc, G., Solís-Pereira, S. (2018) Laccase-mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. 3 Biotech 8, 298. http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1323-y.
- 66. Sun, F. hui, Li, J., Yuan, Y. xiang, Yan, Z. ying, Liu, X. feng (2011) Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover, Int. Biodeterior. Biodegrad. *65*, 931–938.
- 67. Nagula, K.N., Pandit, A.B. (2015) Process intensification of delignification and enzymatic hydrolysis of delignified cellulosic biomass using various process intensification techniques including cavitation, Bioresour. Technol. *213*, 162–168. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.152.
- 68. Singleton, V.L., Rossi, J.A.J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Am. J. Enol. Vitic. *16*, 144.
- 69. Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacís, R., Solís-Pereira, S. (2015) Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. Molecules *20*, 15147–15157.
- 70. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. *31*, 426–428.
- 71. Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., Wang, H. (2018) Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production, Fuel *221*, 21–27. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.088.
- 72. Giacobbe, S., Pezzella, C., Lettera, V., Sannia, G., Piscitelli, A. (2018) Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization, Bioresour. Technol. *265*, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.108.
- 73. Gouveia, E.R., Nascimento, R.T. do, Souto-Maior, A.M., Rocha, G.J. de M. (2009) Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana de açúcar, Quim. Nova 32, 1500–1503.
- 74. Tapia-Tussell, R., Avila-Arias, J., Maldonado, J.D., Valero, D., Olguin-Maciel, E., Pérez-Brito, D., Alzate-Gaviria, L. (2018) Biological pretreatment of mexican caribbean macroalgae consortiums using Bm-2 strain (*Trametes hirsuta*) and its enzymatic broth to improve biomethane potential, Energies *11*, 11.

- 75. Waghmare, P.R., Khandare, R. V., Jeon, B.-H., Govindwar, S.P. (2018) Enzymatic hydrolysis of biologically pretreated sorghum husk for bioethanol production, Biofuel Res. J. *19*, 846–853.
- 76. Monavari, S., Galbe, M., Zacchi, G. (2009) Impact of impregnation time and chip size on sugar yield in pretreatment of softwood for ethanol production, Bioresour. Technol. 100, 6312–6316. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.097.
- 77. Gonçalves, F.A., Ruiz, H.A., Nogueira, C. da C., Santos, E.S. dos, Teixeira, J.A., de Macedo, G.R. (2014) Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. Fuel *131*, 66–76.
- 78. Cabral, M.M.S., Abud, A.K. de S., Silva, C.E. de F., Garcia Almeida, R.M.R. (2016) Bioethanol production from coconut husk fiber, Ciência Rural *46*, 1872–1877. http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151331.
- Albuquerque, E.D., Goncalves Torres, F.A., Fibeiro Fernandes, A.A., Fernandes,
 P.M.B. (2016) Combined effects of high hydrostatic pressure and specific fungal cellulase improve coconut husk hydrolysis, Process Biochem. *51*, 1767–1775.
- 80. Santucci, B.S., Maziero, P., Rabelo, S.C., Curvelo, A.A.S., Pimenta, M.T.B. (2015). Autohydrolysis of hemicelluloses from sugarcane bagasse during hydrothermal pretreatment: a kinetic assessment, Bioenergy Res. *8*, 1778–1787.
- 81. Molina-Guerrero, C.E., de la Rosa, G., Castillo-Michel, H., Sánchez, A., García-Castañeda, C., Hernández-Rayas, A., Valdez-Vazquez, I., Suarez-Vázquez, S. (2018) Physicochemical characterization of wheat straw during a continuous pretreatment process, Chem. Eng. Technol. *41*, 1350.
- 82. Brígida, A.I.S., Calado, V.M.A., Gonçalves, L.R.B., Coelho, M.A.Z. (2010) Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber, Carbohydr. Polym. *79*, 832–838. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.005.
- 83. Zhang, J.G., Li, Q.L., and Wei, Z.J. (2017). Degradation of bamboo-shoot shell powder by a fungal consortium: Changes in chemical composition and physical structure, Int. Biodeterior. Biodegrad. *116*, 205–210.
- 84. Ebrahimi, M., Caparanga, A.R., Ordono, E.E., Villaflores, O.B. (2017) Evaluation of organosolv pretreatment on the enzymatic digestibility of coconut coir fibers and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation, Renew. Energy, 41–48. http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.011.

- 85. Tovar Herrera, O.E. (2013) Evaluación de un material lignocelulósico para la producción de celulasas , xilanasas y lacasas por basidiomicetos del noreste de México. Tesis de Maestría, Universidad de Nuevo León, México.
- 86. Nozaki, K., Seki, T., Matsui, K., Mizuno, M., Kanda, T., Amano, Y. (2007) Structure and characteristics of an endo-β-1,4-glucanase, isolated from *Trametes hirsuta*, with high degradation to crystalline cellulose, Biosci. Biotechnol. Biochem. *71*, 2375–2382.
- 87. Shankarappa, T.H., Geeta, G.S., Narotham Prasad, B.D., Doddagoudar, C.K., Alagawadi, A.R. (2015) Biological pretreatment of agroresidues with lignolytic fungi for delignification and recovery of cellulose and hemicellulose, Int. J. Curr. Micriobiology Appl. Sci. *4*, 22–30.
- 88. Asoka Panamgama, L., Peramune, P. (2018) Coconut coir pith lignin: A physicochemical and thermal characterization, Int. J. Biol. Macromol. *113*, 1149–1157. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.012.
- 89. Rastogi, M., Shrivastava, S. (2017) Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes, Renew. Sustain. Energy Rev. 80, 330–340. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225.
- 90. Mendu, V., Harman-Ware, A.E., Crocker, M., Jae, J., Stork, J., Morton III, S., Placido, A., Huber, G., Debolt, S. (2011) Identification and thermochemical analysis of high-lignin feedstocks for biofuel and biochemical production, Biotechnol. Biofuels *4*, 1–13.
- 91. Montoro, M.L., Herrero, M.L., Mamaní, A., Sardella, M.F., Vallejo, M.D., Deiana, A.C. (2016) Efectos de pretratamiento ácido y ultrasonido sobre la biodisponibilidad de azúcares para la producción de bioetanol a partir de melón. En: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 25-29 Octubre, Ceará, Brasil.
- 92. Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass An overview, Bioresour. Technol. *199*, 76–82. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030.