



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GENERACIÓN A PARTIR DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES DE PIÑA (*Ananas comosus* L.)

Tesis que presenta

M.C. RUBÍ DEL ROSARIO CHABLÉ VILLACIS

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS EN ENERGIA RENOVABLE

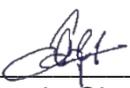
Mérida, Yucatán, México

2022



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: 

Rubí del Rosario Chablé Villacis

Mérida, Yucatán, México, a 08 de diciembre de 2021

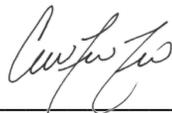
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGIA RENOVABLE*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Rubí del Rosario Chablé Villacis titulado **“Producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos agroindustriales de piña (*Ananas comosus* L.)”**, fue realizado en la Unidad de Energía Renovable, en el Laboratorio de bioreactores ERU19, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Raúl Tapia Tussell, perteneciente al programa de Posgrado en Ciencias en Energía Renovable de este Centro y Dr. Héctor Arturo Ruiz Leza, perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 08 de diciembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada con el No. 297333 para poder realizar los estudios de posgrado.

Al Laboratorio de Biorreactores ERU 19, del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por facilitarme lo necesario para desarrollar gran parte de la experimentación incluida en esta investigación.

Al Laboratorio de Biorefinería (Biorefinery Group), la Facultad de Ciencias Químicas del Universidad Autónoma de Coahuila, por permitirme realizar una estancia muy satisfactoria para el proyecto.

A Laboratorio de Micromicetes y Levaduras, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, por proporcionarme las herramientas para la obtención de resultados que se integraron al proyecto.

A mi Director de tesis, el Dr. Raúl Tapia Tussell, asesoría y orientación en el desarrollo del proyecto, por incluirme en su grupo de trabajo, involucrarme y brindarme oportunidad de aprendizaje con otras áreas de investigación, por su tolerancia y paciencia, pero sobre todo por apoyarme como un padre durante toda mi etapa de estudiante.

Al mi Co-director de tesis, el Dr. Héctor Ruíz Leza, por orientarme y asesorarme para lograr los objetivos del trabajo, por sus enseñanzas y cuestionamientos que me han ayudado a crecer un poco más, por su gran paciencia, sobre todo por aceptarme y cobijarme en su grupo de trabajo y por ser una excelente persona.

A mi asesora interna, la Dra. Daisy Pérez Brito por sus revisiones y comentarios para nutrir el proyecto, pero sobre todo por impulsarme desde mis inicios en este ámbito.

A mi asesora externa, la Dra. Sara Solís Pereira por proporcionarme la información adecuada para el cultivo de las cepas empleadas en este trabajo y por sus consejos y aportaciones durante mi evaluación.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria, por sus aportaciones en la revisión del documento y dejarme involucrar en los proyectos de su laboratorio.

A la Dra. Isaura España Gamboa por sus aportaciones en la revisión del documento de tesis.

Al M.C. Jorge Domínguez, por facilitarme los materiales y equipos del laboratorio ERU20, y por su apoyo en la obtención de los espectros de infrarrojo.

A la I.Q. Tanit Toledano Thompson, por auxiliarme en la obtención de las micrografías usadas para discusión de este trabajo.

A la Lic. Julia Gonzales Montilla, por su apoyo administrativo para la solicitud y realización de las estancias académicas que se llevaron a cabo durante el posgrado.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras por su recibimiento en su laboratorio, asesoría y orientación sobre temas de su pericia.

A la Dra. Rosa María Leal Bautista, por su apoyo durante la extensión de mi posgrado.

A la Dra. Rosa María Rodríguez Jasso, sus comentarios, cuestiones, intercambio de ideas y brindarme la oportunidad de incluirme en eventos bajo su coordinación durante mi estancia académica con el Biorefinery Group.

Al Dr. Edgar Olguin Maciel por concederme parte de su tiempo para las discusiones de este trabajo.

A las chicas del Laboratorio de Micromicetes y Levaduras: Xochitlali, Karlita y Angie por facilitarme los materiales, equipos, tips, y por hacer más amena y relajada mi breve e intensa estancia.

Al Biorefinery Group: Arely, Anahí, Marcela, Rafael, Anusuiya, Karla Daniela, Elizabeth y Magdali por auxiliarme en el manejo y dominio de equipos, técnicas del laboratorio, enseñarme lo que es ser, convivir y trabajar como un grupo unido, el intercambio de ideas y hacer más agradable la estancia.

A todos y cada uno de los compañeros de los laboratorios ERU19 y ERU20 con los que coincidí durante este trayecto ya que todos me han dejado una enseñanza.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	viii
ABSTRACT.	ix
ABSTRACT.	ix
INTRODUCCIÓN.	1
CAPITULO 1.	2
ANTECEDENTES	2
1.1. CULTIVO DE PIÑA.....	2
1.1.1. PRINCIPALES PRODUCTORES	4
1.1.2. DISPOSICIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL CULTIVO DE PIÑA ..	5
1.2. BIOMASA LIGNOCELULOSICA.....	6
1.3. BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	8
1.4. PRETRATAMIENTOS PARA BIOMASA LIGNOCELULOSICA	9
1.4.1. PRETRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS	12
1.4.2. PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	14
1.5. MICROORGANISMOS AUTOCTONOS	17
1.6. JUSTIFICACIÓN	19
1.7. HIPÓTESIS	20
1.8. OBJETIVOS	21
1.9. DISEÑO EXPERIMENTAL	22
CAPITULO 2.	23
MATERIALES Y METODOS	23
2.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (RESIDUOS DE HOJAS DE PIÑA)	23
2.2. ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA	23

2.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS.....	23
2.3.1. ACTIVIDAD LACASA EN PLACA.....	24
2.3.2. ACTIVIDAD CELULASA EN PLACA	25
2.3.3. PRUEBAS FERMENTATIVAS.....	25
2.4. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	25
2.4.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO	25
2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FT-IR)	26
2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	26
2.5. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	27
2.5.1. MICROORGANISMOS	27
2.5.2. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	27
2.5.3. CUANTIFICACION DE FENOLES.....	28
2.5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA	28
2.5.5. DETERMINACIÓN DE DESLIGNIFICACIÓN	28
2.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS SÓLIDOS PRETRATADOS.....	29
2.6.1 CUANTIFICACIÓN AZÚCARES REDUCTORES	29
2.6.3 CARACTERIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	30
2.7. PRETRATAMIENTO HIDROTÉRMICO	30
2.7.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS	31
2.7.2. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LOS SÓLIDOS PRETRATADOS.....	31
2.7.3. HIDROLISIS ENZIMÁTICA ASISTIDA DE LOS SÓLIDOS PRETRATADOS.....	32
CAPITULO 3.	33
RESULTADOS.....	33
3.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA	33
3.2. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD LACASA Y CELULASA DE LAS CEPAS <i>Trametes hirsuta</i>	38
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS.....	39

3.4. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	40
3.4.1. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LAS BIOMASAS PRETRATADAS EN FES	50
3.5. PRETRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS	56
3.5.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA PRETRATADA.....	62
CONCLUSIONES.....	69
PERSPECTIVAS.....	70
BIBLIOGRAFÍA	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales países productores, datos más recientes reportados en FAOSTAT [12]... 4	4
Tabla 1.2. Ventajas y desventajas que presentan los pretratamientos para materiales lignocelulósicos [47]..... 11	11
Tabla 2.1. Identidad de los microorganismos evaluados en fermentación en estado sólidos..... 27	27
Tabla 3.1. Aislamientos obtenidos de los residuos de piña, agrupados con respecto a los medios de cultivo utilizados..... 34	34
Tabla 3.2. Resultados de las pruebas fermentativas de las levaduras con diferentes fuentes de carbono..... 37	37
Tabla 3.3. Caracterización composicional de los residuos de hojas de piña (% p/p) en base seca. 40	40
Tabla 3.4. Porcentaje de deslignificación de RHP después de 21 días de FES a 27 °C y 35 °C con cepas de <i>T. hirsuta</i> . Fue usado un análisis ANOVA para determinar las diferencias significativas $p < 0.05$ 45	45
Tabla 3.5. Caracterización composicional de RHP sin tratar y RHP pretratado en FES con las cepas de <i>T. hirsuta</i> a 35°C. Los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina están calculados en base seca total (% p/p)..... 46	46
Tabla 3.6. Concentración de azúcares reductores (g/g de biomasa) de biomasa sin tratar y sólidos pretratados en FES a 35°C con cepas de <i>T. hirsuta</i> 53	53
Tabla 3.7. Porcentaje de carbohidratos obtenidos en la hidrólisis enzimática asistida con extractos enzimáticos crudos en base a los azúcares reductores totales (% p/p)..... 54	54
Tabla 3.8. Caracterización fisicoquímica de la fracción sólida y líquida recuperada después de los pretratamientos hidrotérmicos..... 57	57
Tabla 3.9. Rendimientos de azúcares reductores (g/g de biomasa), a partir de la biomasa sin tratar y sólidos pretratados con autohidrólisis a 180 °C/25min ([logRo]= 3.93)..... 63	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Cultivar de piña, Cárdenas, Tabasco, México, (Fotografía tomada por el grupo de bioetanol, UER-CICY 2018).....	3
Figura 1.2. Alternativas de productos a partir de hojas de piña: a) hileras y b) platos [22].	6
Figura 1.3. Composición del material lignocelulósico [28].	7
Figura 1.4. Mejoramiento de la accesibilidad por efecto de los pretratamientos [46].	10
Figura 1.5. Inhibidores generados por degradación del material lignocelulósico [63].	14
Figura 1.6. Cambios estructurales en la biomasa lignocelulósica por efecto de una degradación simultánea en pretratamiento biológico [71].	16
Figura 1.7. Diagrama de experimentación.	22
Figura 2.1. Pretratamientos hidrotérmicos, a) reactor presurizado con control de temperatura, b) hidrolizado recuperado, c) separación de las fracciones sólida y líquida para caracterización.	30
Figura 3.1. Aislamiento (arriba) y purificación de la microbiota (abajo). Aislados de bacterias en medio PCA (a) y medio WLA (b), levaduras y hongos filamentosos en medio RBA (c) y medio WLA (d).	33
Figura 3.2. Determinación de actividad lacasa (medio de cultivo con ABTS) y celulasa (medio de cultivo con CMC) de aislados bacterianos.	34
Figura 3.3. Observación en microscopio de células de las levaduras aisladas del RHP, en objetivo de 100x: a) Presencia de células en pares y gemación multipolar, b) células apiculadas, c) células globosas e individuales y d) pseudomicelio.	36
Figura 3.4. Clasificación de los morfotipos de las levaduras aisladas en medio de cultivo WLA.	36
Figura 3.5. Determinación de actividad lacasa (medio de cultivo con ABTS) y celulasa (medio de cultivo con CMC) mediante pruebas cualitativas de a) <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2, b) <i>Trametes hirsuta</i> AHB-6 y c) <i>Trametes hirsuta</i> RT-1.	39
Figura 3.6. Fermentación en estado sólido con cepas de <i>T. hirsuta</i> a 27 °C y 35 °C durante 21 días.....	41
Figura 3.7. Actividad lacasa producida en FES de RHP con <i>T. hirsuta</i> Bm-2 (FES 2), <i>T. hirsuta</i> AHB-6 (FES 6) y <i>T. hirsuta</i> RT-1 (FES 1) a una temperatura de incubación de 27 °C durante 21 días. Los datos graficados son las medias \pm desviación estándar de las tres mediciones (n = 3).	42

Figura 3.8. Actividad lacasa producida en FES de RHP con <i>T. hirsuta</i> Bm-2 (FES 2), <i>T. hirsuta</i> AHB-6 (FES 6) y <i>T. hirsuta</i> RT-1 (FES 1) a 35 °C durante 21 días. Los datos graficados son las medias \pm desviación estándar de las tres mediciones (n = 3).....	43
Figura 3.9. Espectros FT-IR de la biomasa RHP sin tratar (a) y las biomásas pretratadas en FES a 35 °C con <i>T. hirsuta</i> Bm-2 (b), <i>T. hirsuta</i> AHB-6 (c) y <i>T. hirsuta</i> RT-1 (d).....	47
Figura 3.10. Micrografías de RHP sin tratar (a, a') y RHP pretratadas en FES a 35 °C con <i>T. hirsuta</i> Bm-2 (b, b'), <i>T. hirsuta</i> AHB-6 (c, c') and <i>T. hirsuta</i> RT-1 (d, d'). Donde a', b', c' y d' corresponden a magnificaciones (MEB-X 1,500 y MEB-X 1,700) de los efectos más relevantes.	49
Figura 3.11. Rendimientos de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática, o sacarificación. Donde, Blanco es el control absoluto sin enzimas, Control es RHP sin tratar y, FES2, FES6 y FES1 son las biomásas pretratadas en FES con <i>T. hirsuta</i> Bm-2, <i>T. hirsuta</i> AHB-6, y <i>T. hirsuta</i> RT-1, respectivamente.....	51
Figura 3.12. Rendimiento de azúcares en la hidrólisis enzimática, o sacarificación, de RHP sin tratar: hidrólisis enzimática convencional (control) e hidrólisis enzimática asistida con extractos enzimáticos de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 (E2), <i>T. hirsuta</i> AHB-6 (E6), y <i>T. hirsuta</i> RT-1 (E1).	52
Figura 3.13. Rendimiento de la hidrólisis enzimática asistida de las biomásas pretratadas en FES con sus respectivos extractos enzimáticos: <i>T. hirsuta</i> Bm-2 (FES E2), <i>T. hirsuta</i> AHB-6 (FES E6), and <i>T. hirsuta</i> RT-1 (FES E1).....	54
Figura 3.14. Residuos de hojas de piña sumergidos en agua, a) antes del pretratamiento hidrotérmico y b) después del pretratamiento hidrotérmico 180 °C/ 25min ([logRo]= 3.93)....	59
Figura 3.15. Micrografías de RHP sin tratar (a) y biomásas de los pretratamientos hidrotérmicos: b) menos severo ([logRo]= 3.63), c) bajo las condiciones de 180 °C/25min ([logRo]= 3.93) y d) el más severo [logRo]= 4.12.	60
Figura 3.16. Espectros FT-IR de RHP sin tratar (a) y biomásas de los pretratamientos hidrotérmicos: b) menos severo ([logRo]= 3.63), c) el más severo ([logRo]= 4.12) y d) bajo las condiciones de 180 °C/25min ([logRo]= 3.93).....	61
Figura 3.17. Rendimientos de la hidrólisis enzimática con cargas de sólidos de 1 y 3 % (p/v) de RHP pretratadas con autohidrólisis. El blanco es en control absoluto y el control es RHP sin tratar, ambos con una carga de sólidos del 1 % (p/v).....	63
Figura 3.18. Rendimientos de hidrólisis enzimática asistida con cargas de sólidos de 1% (p/v) de la biomasa pretratada. Donde, C3 E1 pre, C3 E1 y C3 E1 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de <i>T. hirsuta</i> RT-1 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.	64

Figura 3.19. Comportamiento de la liberación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática asistida. Donde C3 E1 pre, C3 E1 y C3 E1 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de <i>T. hirsuta</i> RT-1 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.	65
Figura 3.20. Rendimientos de hidrólisis enzimática asistida con cargas de sólidos de 1% (p/v) de la biomasa pretratada. Donde, C3 E6 pre, C3 E6 y C3 E6 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de <i>T. hirsuta</i> AHB-6 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.	66
Figura 3.21. Comportamiento de la liberación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática asistida. Donde C3 E6 pre, C3 E6 y C3 E6 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de <i>T. hirsuta</i> AHB-6 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.	67

RESUMEN

Los desechos del cultivo de piña generan contaminación en campo y costos de disposición para los productores, sin embargo, por su alto contenido de holocelulosa, son fuente potencial de carbono para la producción de bioetanol. Debido a que es una biomasa lignocelulósica, es necesario la aplicación de pretratamientos efectivos para acceder a los azúcares fermentables. En este trabajo, se evaluaron tres cepas de *T. hirsuta* en fermentación en estado sólido (FES) a 27 y 35 °C, como pretratamiento biológico y una tecnología de alta presión como pretratamiento fisicoquímico a temperaturas de 160, 170 y 180 °C con régimen isotérmico de 10, 25 y 40 min respectivamente (hidrotérmico). Los pretratamientos provocaron en la biomasa cambios composicionales y estructurales, que se analizaron por microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de infrarrojo. La biomasa pretratada fue expuesta a una hidrólisis enzimática convencional, e hidrólisis enzimática asistida con extractos de *T. hirsuta*. Como resultado de la FES a 27 °C se produjo extracto enzimático con actividad lacasa de 6513.8 U/mL y a 35 °C una mayor tasa de deslignificación (28%). En la hidrólisis enzimática convencional se alcanzó un rendimiento de conversión de 90.8% de la holocelulosa, mientras que en la hidrólisis enzimática asistida fue posible hidrolizar el 100%. En los pretratamientos hidrotérmicos, se obtuvo una biomasa con 56% de celulosa a las condiciones de 180 °C con 25 min de residencia, los hidrolizados recuperados de esta fase contenían oligosacáridos derivados de la hemicelulosa específicamente xilooligosacáridos, así como furfurales, hidroximetil furfural, ácido fórmico, ácido levulínico y compuestos fenólicos con valor comercial. La hidrólisis enzimática convencional obtuvo un rendimiento del 100% con 0.56 g azúcares reductores por gramo de biomasa hidrolizada, mientras que, la hidrólisis enzimática asistida se logró este mismo desempeño en 12 h de reacción. La fermentación en estado sólido es un proceso económico y eficiente para la producción de azúcares fermentables, en comparación con los procesos hidrotérmicos, sin embargo, estos últimos pueden reducir en gran medida los tiempos de obtención de carbohidratos y recuperar compuestos de valor agregado como los furfurales, bajo el concepto de biorrefinería.

ABSTRACT

Pineapple crop waste generates contamination in the field and disposal costs for producers; however, due to its high holocellulose content, it is a potential source of carbon for bioethanol production. Because it is a lignocellulosic biomass, it is necessary to apply effective pretreatments to access fermentable sugars. In this work, three strains of *T. hirsuta* were evaluated in solid state fermentation (SSF) at 27 and 35 °C as biological pretreatment and a high pressure technology as physicochemical pretreatment at temperatures of 160, 170 and 180 °C with isothermal regime of 10, 25 and 40 min, respectively (hydrothermal). The pretreatments caused compositional and structural changes in the biomass, which were analyzed by scanning electron microscopy and infrared spectroscopy. The pretreated biomass was exposed to conventional enzymatic hydrolysis, and enzymatic hydrolysis assisted with *T. hirsuta* extracts. As a result of SSF at 27 °C, enzymatic extract with laccase activity of 6513.8 U/mL was produced and at 35 °C a higher delignification rate (28%). In conventional enzymatic hydrolysis, a conversion yield of 90.8% of holocellulose was achieved, while in enzyme-assisted hydrolysis it was possible to hydrolyze 100%. In the hydrothermal pretreatments, a biomass with 56% cellulose was obtained at 180 °C with 25 min residence time; the hydrolysates recovered from this phase contained oligosaccharides derived from hemicellulose, specifically xylooligosaccharides, as well as furfurals, hydroxymethyl furfural, formic acid, levulinic acid and phenolic compounds with commercial value. Conventional enzymatic hydrolysis obtained a yield of 100% with 0.56 g reducing sugars per gram of hydrolyzed biomass, while assisted enzymatic hydrolysis achieved the same performance in 12 h of reaction. Solid-state fermentation is an economical and efficient process for the production of fermentable sugars, compared to hydrothermal processes; however, the latter can greatly reduce the time to obtain carbohydrates and recover value-added compounds such as furfurans, under the biorefinery concept.

INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles son un recurso finito que, con el curso de los años, va disminuyendo por la creciente demanda causada por el incremento demográfico, además, la quema de los combustibles fósiles ha contribuido considerablemente al cambio climático, por lo que existe una necesidad de reducir los impactos ambientales. El desarrollo de energías alternativas se ha convertido en un desafío importante para México y otros países que se han comprometido en el acuerdo de París para reducir los gases de efecto invernadero, y garantizar el acceso a energía sostenible, con lo que se promueve a la producción y uso de biocombustibles [1,2]. El bioetanol, es una alternativa que hace frente a los combustibles fósiles, sin embargo, las materias primas más aprovechadas para este fin, son los cultivos alimenticios. En este sentido, se han impulsado fuentes alternativas que no compitan con el ámbito alimentario, como la biomasa lignocelulósica (producción de etanol de segunda generación). En el caso específico de México, durante los últimos años se ha incentivado a la investigación y desarrollo de proyectos enfocados a los biocombustibles de segunda generación (2G), apostando al uso de biomasa lignocelulósica. Algunas de las distintas alternativas para ser usadas como residuos de cultivos son: el agave, rastrojo de sorgo, y residuos del cultivo de piña [3], siendo éste último la materia prima de interés en éste trabajo.

La mayoría de las industrias agroalimentarias emplean la quema o descomposición a la intemperie de los residuos lignocelulósicos, estas condiciones inadecuadas provocan un problemas de contaminación del aire y suelo, e incluso facilitar el desarrollo de un foco de infección para los cultivos, sin embargo, al ser materia prima accesible, el aprovechamiento para la producción de biocombustibles contribuye a la mitigación de estos problemas [4]. En la industria de la piña, los residuos de su cosecha representan el 80% de la masa total de la planta ya que solo los frutos son valorados. En México, se producen aproximadamente 875,830 toneladas de piña (frutas), es decir, que se generan aproximadamente 4 millones de Ton de residuos. Debido a su alto contenido de holocelulosa (62,17% p/p) [5] es una materia prima prometedora para recuperación de azúcares fermentables y producción de bioetanol de segunda generación [6], sin embargo, la composición heterogénea de la biomasa lignocelulósica en sí, hace que sea necesario recurrir a pretratamientos adecuados para mejorar la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática. En este enfoque, en este presente trabajo, se evaluaron pretratamientos de menor demanda de recursos: la fermentación en estado sólido con cepas de *Trametes hirsuta* e hidrotérmicos (con diferentes condiciones de operación), para la recuperación de azúcares fermentables de los residuos de hojas de piña, con el fin último de producir bioetanol 2G.

CAPITULO 1.

ANTECEDENTES

1.1. CULTIVO DE PIÑA

La especie *Ananas comosus* L. de la familia *Bromeliaceae*, mejor conocida con el nombre común de piña, es una planta nativa de Sudamérica, en Brasil y Paraguay, y que con la llegada de los españoles fue distribuida hasta Europa [7].

La planta adulta tiene una altura y ancho promedio de 1 y 2 m, respectivamente (Figura 1). Puede crecer en suelos arenosos, con rangos de temperatura de 18 a 45 °C, en altitudes de nivel del mar hasta 800 m y con pH de 5.5 a 6 preferentemente [8]. Para el establecimiento de cultivos se recomiendan zonas donde las lluvias sean moderadas durante todo el año. La demanda hídrica solo es exigente en los primeros meses de crecimiento, ya que las hojas tienen una forma cóncava que permite a la planta recoger agua [7], y la cutícula gruesa, que permite almacenar agua en el tejido. Una característica de gran relevancia es que, gracias al metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) este cultivo aporta un notable ahorro económico de agua [9].

Aunque existen diferencias entre variedades, una planta puede producir desde 50 hasta 200 flores durante todo su ciclo de vida, por cada flor se desarrolla un fruto y la fructificación puede ocurrir entre los 12-36 meses de edad de la planta [7,9]. La piña, es una fruta exótica con alto contenido de fibra, es dulce y jugosa, razón por la cual el 70% del consumo del fruto es en fresco, sin embargo, su tamaño y propiedades organolépticas son distintas para cada variedad. Puede considerarse como una de las frutas más útiles para la obtención de compuestos de valor agregado como antioxidantes, ácidos orgánicos, bromelina y compuestos fenólicos [10].

El fruto tiene forma oblonga, pulpa de color amarillo dorado, una piel gruesa y prominente, la cual se torna de color verde a amarillo cuando alcanza la madurez, algunas variedades pueden presentar tonalidades de verde-amarillo o mezcla de amarillo con morado [7], y pueden llegar hasta pesar 2.5 kg dependiendo de la variedad.



Figura 1.1. Cultivar de piña, Cárdenas, Tabasco, México, (Fotografía tomada por el grupo de bioetanol, UER-CICY 2018)

Al término del desarrollo del fruto, el ápice del brote queda en la parte superior del fruto (corona), la manipulación del fruto durante la cosecha es por medio de esta corona, de modo que este material, solo puede ser aprovechado después para el desarrollo de nuevas plantas [7]. Entre las prácticas del cultivo, para la plantación se utiliza la propagación de forma vegetativa, como se mencionó antes utilizando la corona, brotes de tallo o brotes laterales. La fertilización se realiza cuatro veces durante todo el ciclo vegetativo con fórmulas a base de nitrógeno, fósforo y potasio, el exceso de riego y humedad debe evitarse para disminuir la tendencia a enfermedades fitopatógenas [7].

Finalmente, los productores de piña, hacen planes de cosecha muy estrictos para la obtención de frutos de buena calidad, ellos recurren a la constante poda y eliminación de hojas demasiado viejas, al término de cosecha la planta madre es retirada [11]. Algunos productores practican el desmonte después de una segunda cosecha, fructificación por rebrote, sin embargo esto puede representar desventajas en la productividad al ocurrir pérdida de uniformidad, sincronización del cultivo y una baja calidad del fruto [9], por lo que es más recurrente realizar una sola cosecha por cultivo.

Esta operación del desmonte es completada con el arado y revolviendo el suelo, con el objetivo de destruir los residuos de la cosecha anterior y recuperar el lecho de siembra, incluso en ocasiones se recurre a la quema y mezcla de productos comerciales para descartar la persistencia de plagas y fitopatógenos [7]. Estas prácticas del manejo de cultivo generan grandes

cantidades de residuos acumulados para el productor, que representan entre 75-80% de cada planta [11].

1.1.1. PRINCIPALES PRODUCTORES

La piña es el segundo fruto tropical más consumido, después del mango, debido a sus beneficios y propiedades organolépticas [9]. Por lo que la producción total global del fruto es de aproximadamente 28,252,400 Ton, según lo reportado por la FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database) [12]. En la Tabla 1.1, se observan los principales países productores a nivel mundial, encontrándose en primer lugar Costa Rica con 3,209,700 toneladas, seguido de Filipinas y Tailandia.

Tabla 1.1. Principales países productores, datos más recientes reportados en FAOSTAT [12].

Posición	País	Producción de piña (miles de Ton., 2018)
1	Costa Rica	3 209.7
2	Filipinas	2 717.4
3	Tailandia	2 349.6
4	China	2 203.9
5	Brasil	2 077.2
6	Indonesia	1 830.1
7	India	1 802.4
8	Nigeria	1 718.7
9	Colombia	1 293.0
10	México	1 002.4

México se ha mantenido entre los 10 principales productores, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural ha reportado un incremento en la producción de un 16.2% para el año 2020, con respecto a lo obtenido en 2018 [13].

Actualmente, se encuentra en la 9na posición con una producción de 1,209,000 Ton, a nivel nacional. Dos terceras partes de esta producción provienen del estado de Veracruz, y el resto, de los estados de Oaxaca, Tabasco, Nayarit y Jalisco [13]. Es decir, que en México se generan aproximadamente 967,200 toneladas de residuos al año.

1.1.2. DISPOSICIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL CULTIVO DE PIÑA

El fruto de la piña es lo que se comercializa, mientras que del 75-80% del cultivo al término de la cosecha se consideran residuos. En campo, estos desechos generalmente se eliminan por combustión o descomposición a la intemperie, lo que provoca la aparición de problemas ambientales del aire y suelo, además la exposición a cielo abierto en campo, propicia un foco de infección para el desarrollo de problemas fitosanitarios [7,14,15].

Del procesamiento industrial del fruto también se generan residuos (aprox. 25% del fruto), corazón, piel y corona, los cuales se han estudiado generando propuestas de aprovechamiento, por ejemplo, la cáscara es aprovechada para la obtención de enzimas (Bromelina), fuente de fibra, antioxidantes y como sustrato para la obtención de productos antimicrobianos [10,16–18]. Aunque, la cantidad de estos residuos no son relevantes con respecto al volumen total del cultivo, por otro lado, las hojas (pencas) que son desechadas en campo, pueden representar una materia prima accesible por la cantidad que se genera.

Una de las propuestas es la recuperación de la fibra, con la cual se busca la sustitución de la fibra de vidrio y fibra sintética en la industria, con un proceso físico, sencillo y económico se pueden obtener productos burdos. Sin embargo, para un refinamiento, son necesarios los procesos fisicoquímicos, para destinar la fibra a la industria textil (Figura 1.2a) con una calidad comparada a los hilos de algodón, es necesario el empleo de soluciones álcali como carbonatos, ácidos e incluso temperaturas superiores a 100 °C, lo que representa un incremento económico en el proceso [8,14].

Por su parte, Laftah y Rahaman [19], obtuvieron papel a partir de residuos de hojas de piña, con propiedades térmicas y físicas, mejores que las hojas de papel comerciales, esto lo lograron evaluando tratamientos con acetona y agua como método de deslignificación, con exposición de hasta 28 días y con tiempos variables de calentamientos a 118 °C y 80 kPa. En la Figura 1.2b, se observa un plato biodegradable elaborado con papel de hojas de piña. Entre las características del papel fibroso para envasado de alimentos se señala la resistencia y permeabilidad, por lo que la obtención de este tipo de producto presenta otros retos. Lewkittayakorn y col. [20], exploraron otros complementos para alcanzar este objetivo, como el alginato, quitosano, goma laca y cera de abejas, lo que observaron es que si bien se obtiene una mejor biodegradación al emplear cera de abeja como recubrimiento biológico, la resistencia al desgarró es alcanzada con variaciones de mezclas de los compuestos antes mencionados.

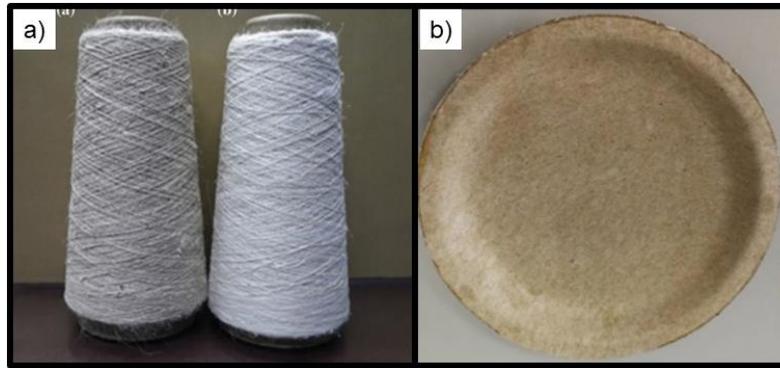


Figura 1.2. Alternativas de productos a partir de hojas de piña: a) hileras y b) platos [20].

El composteo o reincorporación al suelo, ha sido muchas veces la primera alternativa de aprovechamiento sobre los desechos en campo por ser la vía más fácil. En el caso de los desechos en campo del cultivo de piña, se ha evaluado que en el composteo, si bien tiene características que lo posicionan como buen sustrato de suelo, también carece de componentes que son esenciales para complementar la demanda requerida como el nitrógeno [15].

Cassellis y col. [21], al hacer una comparación entre los residuos de la corona y las hojas del cultivo (bracteales) observaron que una similitud en el contenido fibra, carbohidratos y ácidos grasos.

Lo anterior sugiere que, dadas las características los residuos de hojas de piña, pueden ser destinados para fines similares a los residuos de la corona. Otros autores reportan contenidos considerables de holocelulosa (62-78%) en base seca [5,22,23]; dado este conocimiento y al ser asequible, es posible su aprovechamiento como materia prima para la producción de biocombustible, aun siendo una biomasa lignocelulósica, ya que existen procesos amigables con el ambiente para facilitar la digestibilidad de la biomasa, a fin de contribuir con la demanda energética [23].

1.2. BIOMASA LIGNOCELULOSICA

La biomasa lignocelulósica es la biomasa vegetal compuesta por tres principales biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. La proporción de estos biopolímeros varía dependiendo de la especie vegetal y de otros factores como las condiciones de desarrollo. La lignocelulosa se considera uno de los recursos con mayor abundancia en la tierra, no sólo por los cultivos bioenergéticos, sino porque dentro de las fuentes de esta biomasa, se encuentran residuos de cultivos en general, forestales o bosques, residuos sólidos urbanos, lodos de la industria de papel e incluso en abonos animales, por lo que es importante conocer su composición [24].

El ordenamiento de los biopolímeros puede observarse en la Figura 1.3, este empaquetamiento está conformado por el envolvimiento de los polisacáridos por la lignina.

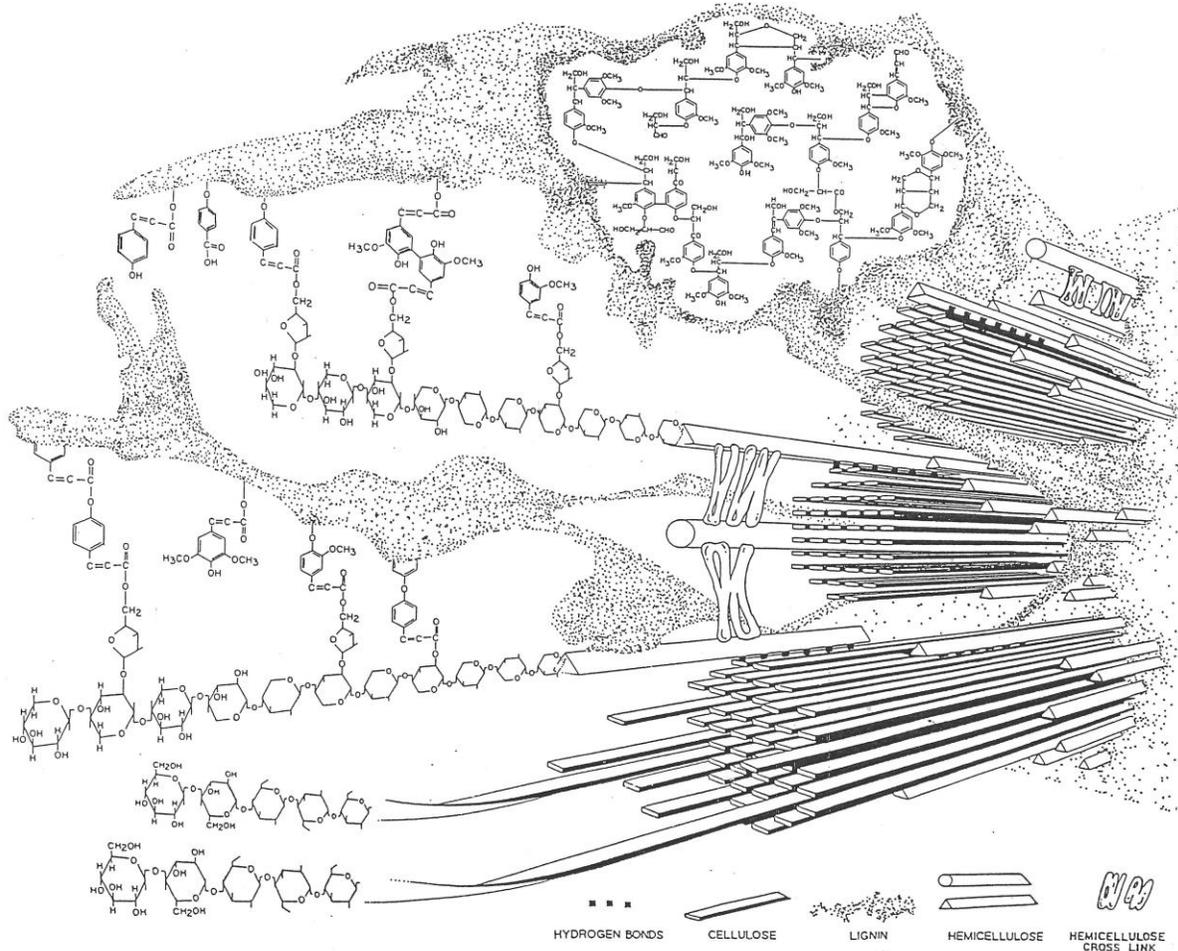


Figura 1.3. Composición del material lignocelulósico [25].

La celulosa, es la principal fuente de carbohidratos presentes en la lignocelulosa, es el polisacárido más abundante de todo el material (aprox. el 36-42%). Es un homopolímero de glucano, monómeros de D-glucosa se unen en los enlaces β -1,4 glucosídicos formando cadenas que, se encuentran fuertemente unidas por enlaces de puente de hidrógeno hasta formar microfibrillas, las microfibrillas al estar ordenadas linealmente unas con otras, conforman los túbulos de la celulosa [26,27]. Al estar fuertemente unidas entre sí y ordenadas, las microfibrillas, conforman la región cristalina de la celulosa, la cual es insoluble en agua y hace al polímero menos susceptible a la hidrólisis enzimática [28,29]. Una pequeña fracción de la celulosa se denomina amorfa, pues, tiene una densidad de empaquetamiento más baja y es de fácil degradación en comparación con la región cristalina [27].

A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es un heteropolímero de carbohidratos, de hexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa), pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), aunque el xilano es el principal componente las hemicelulosas, también tienen uniones con grupos acetilo y metilo [27]. La proporción de los monómeros de 5 y 6 carbonos varía, dependiendo de la naturaleza del material vegetal, por ejemplo la madera blanda (coníferas) contiene menos xilano y más manano [27,30], mientras que la madera dura (de hoja caduca) se caracteriza por contener del 15-35% de glucuronoxilano [30,31]. La organización de la hemicelulosa es ramificada y menos lineal que la celulosa, lo que permite su entrelazamiento con ésta, al mismo tiempo estos dos biopolímeros están envueltos por la lignina, lo que le confiere mayor resistencia a la biomasa lignocelulósica. La lignina es un heteropolímero de compuestos aromáticos, es altamente ramificado, los tres principales precursores de lignina son alcohol coumaril, coniferil y sinapyl, aunque también puede ser común encontrar guayacol y syringol y varían proporcionalmente dependiendo del tejido vegetal [32]. Los fenoles se encuentran unidos por enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, lo que provoca que esta estructura sea la más rígida y resistente a los diferentes tipos de hidrólisis.

Una de sus principales funciones, es brindarle protección de los carbohidratos antes mencionados y soporte para el tejido vegetal vascular. El material lignocelulósico es altamente recalcitrante, debido a la presencia de la lignina, el grado de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización de los polisacáridos, área de superficie y contenido de humedad [4,33].

Debido a la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica, para mejorar los rendimientos de producción y liberación de carbohidratos para su uso como sustrato, es recomendable el empleo de pretratamientos biológicos y fisicoquímicos, así como combinar pretratamientos e hidrólisis. Esto permitiría una viabilidad económica en la producción de bioetanol, debido a que aceleraría la conversión de monómeros de azúcar en los productos finales, esto mejorará el rendimiento de la fermentación [34].

1.3. BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

El Bioetanol es una alternativa energética prometedora, en la actualidad los principales productores lo obtienen de maíz (E.U.A) y caña de azúcar (Brasil). Probablemente sea el biocombustible más exitoso porque tiene muchas formas utilizables (calor, energía, electricidad o combustible para vehículos) [35] sin embargo, esto representa una gran desventaja por la competencia con el sector alimenticio.

En la actualidad existe gran inclinación a favor del bioetanol de segunda generación y el uso de biomasa lignocelulósica, como los residuos agroindustriales, forestales o urbanos, por la disponibilidad de la materia prima, por su contenido energético. Además, en términos de sustentabilidad, son sumamente viables a escala industrial, debido al aprovechamiento de desechos de industriales y de los residuos agrícolas [35–37].

Se estima que, en las próximas décadas, la lignocelulosa será la fuente de energía renovable más significativa como alternativa sustituyente a los combustibles fósiles. Esta magnificación puede incluir beneficios adicionales como la creación de nuevos mercados para productos agrícolas, generación de empleos y desarrollo de nuevos productos que encaminen hacia una economía circular [35,36].

No obstante, todavía hay algunos desafíos que obstaculizan la implementación del bioetanol en algunos mercados. El mejoramiento, desarrollo y selección de pretratamientos, el mejoramiento de la hidrólisis enzimática y fermentación permitirá un mejor rendimiento de biotransformación del material lignocelulósico, así mismo, los residuos generados durante los procesos de producción de bioetanol pueden convertirse en un producto de valor agregado [38,39].

Basado en las tecnologías integrales como las biorrefinerías, se puede obtener un bioproceso eficiente, donde se explotan económicamente muchos productos secundarios, lo que facilitaría una producción comercial de bioetanol lignocelulósico [40]. No obstante, la estructura recalcitrante del material lignocelulósico requiere un procesamiento de alto costo, lo que provoca que estas tecnologías no sean económicamente alcanzables. Aunque la conversión de biomasa a etanol tiene cuatro pasos principales: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación. El principal cuello de botella para el uso de residuos lignocelulósicos es qué, debido a su composición heterogénea, es necesaria la selección de tratamientos eficientes que nos permitan disminuir la recalcitrancia de la biomasa, y que, además, permita el alcance a la meta actual, que es la producción sustentable de etanol carburante bajo el concepto de biorrefinería

1.4. PRETRATAMIENTOS PARA BIOMASA LIGNOCELULOSICA

Un estudio sobre la optimización económica de una biorrefinería de segunda generación a gran escala, en un entorno simulado, demostró que ocurre una mejora cuando se basa en modelos de optimización de los pretratamiento e hidrólisis enzimática [41]. En consecuencia, los pretratamientos, son el paso crucial para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Un pretratamiento efectivo implica muchas cuestiones desde el aspecto

económico, mayor accesibilidad a la celulosa (Figura 1.4) remoción de lignina, evitar formación de inhibidores, menor pérdida de azúcares, entre otros [42].

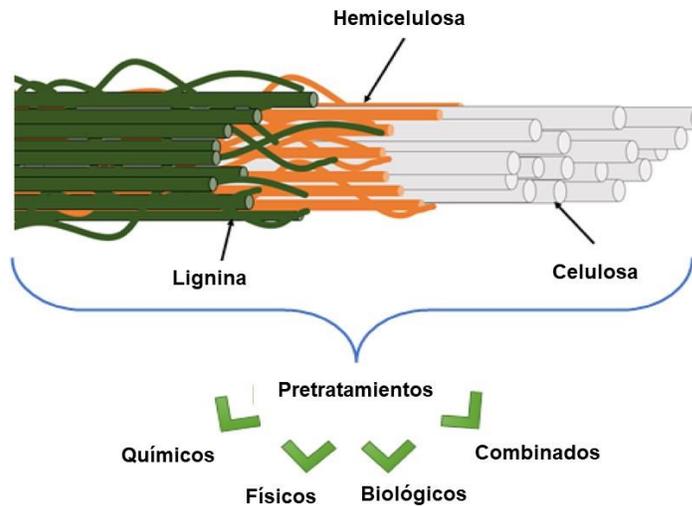


Figura 1.4. Mejoramiento de la accesibilidad por efecto de los pretratamientos [43].

Chen y col. [44], realizaron una comparación entre pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. Las ventajas y desventajas de este análisis, se encuentran en la Tabla 1.2, con lo que plantean perspectivas para la disminución de las desventajas, como la combinación de los pretratamientos, así como la búsqueda de nuevas alternativas interdisciplinarias. Aunque esta comparación es general, los diferentes pretratamientos tienen modos diferentes de interactuar con los componentes de la lignocelulosa, debido a que varían sus propiedades físicas y químicas; por tanto, la eficacia del ultrasonido como pretratamiento no será menor para maderas blandas o frondosas en comparación con residuos sólidos urbanos [43,45].

Es importante considerar otros factores además de la naturaleza de la biomasa, como la concentración de la solución que se utilizará, los tiempos de exposición y temperatura para los pretratamientos químicos, así como las especies o consorcios microbianos a emplear en los tratamientos biológicos, por mencionar algunos. Estos factores afectan el grado de degradación de biomasa y juegan un papel clave en los cambios fisicoquímicos de la estructura de la biomasa lignocelulósica [24,46].

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas que presentan los pretratamientos para materiales lignocelulósicos [44].

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Físico	<p>Reducción del tamaño de partículas</p> <p>Operación simple, eficiente en energía, corto tiempo</p> <p>Facilita la accesibilidad y la reactividad de la celulosa</p> <p>Reduce el grado de polimerización de la celulosa</p> <p>Permite la descomposición de la celulosa</p>	<p>No elimina la lignina y las hemicelulosas.</p> <p>Requiere alto consumo de energía, por tanto, altos costos.</p> <p>Baja productividad</p>
Químico	<p>Alta eficiencia en la conversión de azúcar</p> <p>Proceso rápido</p> <p>Algunos de estos pretratamientos requieren de temperatura ambiente</p> <p>Desintegran y eliminan la lignina</p> <p>Se pueden extraer la lignina, celulosa y hemicelulosas puras.</p>	<p>Algunos compuestos son altamente tóxicos y corrosivos para los equipos</p> <p>Alta temperatura y presión.</p> <p>Generación de inhibidores para el proceso de fermentación</p> <p>Alto costo</p> <p>Efectos negativos en el medioambiente</p>
Fisicoquímico	<p>Solubilización de hemicelulosas.</p> <p>Accesibilidad a la superficie de la celulosa</p> <p>Ausencia de formación de sustancias de inhibición</p> <p>Elimina efectiva de la lignina,</p>	<p>Alta temperatura y presión</p> <p>Costos elevados</p> <p>No son eficientes en materiales con alto contenido de lignina</p> <p>Baja eficiencia.</p>
Biológico	<p>Degrada la lignina</p> <p>Degrada los enlaces de hemicelulosa y celulosa, liberando los azúcares fermentables.</p> <p>No se forman compuestos inhibidores para el proceso de fermentación.</p> <p>Consumo bajo de energía</p>	<p>Baja tasa de hidrólisis</p>

Al elegir un pretratamiento, se busca principalmente, mejorar la digestibilidad de la celulosa para la etapa de hidrólisis enzimática (con celulasas) [44]. De este modo, es posible la disminución de hasta el 25% en la carga de enzimas celulasas comerciales, con respecto al recomendado por el

fabricante, y mejor aún, la recuperación de tanto las hexosas como de las pentosas fermentables [40]. Entre los pretratamientos más amigables con el ambiente se encuentran los biológicos, sin embargo, dentro de los pretratamientos fisicoquímicos con estas características y de los más eficientes podemos encontrar los hidrotérmicos, que se describen a continuación.

1.4.1. PRETRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS

Los pretratamientos hidrotérmicos, como su nombre lo indica, se basan únicamente en el empleo de agua a temperaturas y presiones elevadas, lo que provoca una modificación estructural en el material, dependiendo de las condiciones que se establezcan en el proceso.

Bajo este fundamento, se encuentra la explosión de vapor, que es uno de los más utilizados, el proceso ocurre en dos etapas, la primera llamada autohidrólisis y la segunda, descompresión. Este pretratamiento consiste en exponer la biomasa a alta presión saturada con vapor de agua (0.7 y 4.8 MPa), a temperaturas de 160 a 240 °C, en un reactor presurizado durante un tiempo, desde unos pocos segundos a varios minutos; posteriormente, el vapor se expulsa del reactor, provocando una descompresión y el enfriamiento del material. En la primera etapa se solubiliza la hemicelulosa, mientras que en la segunda se fracciona y modifica la lignina [47].

Dependiendo de la agresividad del proceso, puede provocar desde agrietamiento de las fibras, hasta el rompimiento de los puentes de hidrógeno de la celulosa, facilitando su capacidad de adsorción y su susceptibilidad a las celulasas [44]; por ejemplo, Cherian y col. [48], sometieron hojas de piña a una presión de 20 lbf/in² en un autoclave como reactor por una hora, para después ser descomprimido obteniendo como resultado el aislamiento de la celulosa. Este pretratamiento es eficiente, ya que permite la modificación suficiente de la biomasa para su empleo, para la producción de bioetanol a nivel industrial [40].

Una alternativa reciente es el uso de microondas, esto permite un calentamiento volumétrico, focalizado y más rápido en comparación con el calentamiento convencional, lo que favorece a la disminución de la demanda energética [49,50], se ha demostrado que este pretratamiento facilita la solubilización de la hemicelulosa, permitiendo que en la fracción sólida recuperada sea más fácil acceder a la celulosa en la etapa de hidrólisis enzimática [50]. Dado que las microondas generan oscilaciones moleculares y provocan colisiones intermoleculares, los efectos pueden ser distintos entre una biomasa a otra, por lo que la homogeneidad pudiera verse afectada, aunque, generalmente, las modificaciones estructurales son suficientes para la digestibilidad de la celulosa [51,52].

Nabarlantz y col. [53] demostraron que la autohidrólisis en alta presión, fue un proceso eficiente para la recuperación de xilosas o derivados de la hemicelulosa, a partir de cáscaras de nuez, con 55% más de recuperación de xilosa con respecto a xilano comercial. En este sentido, la implementación de la autohidrólisis, al igual que los pretratamientos hidrotérmicos antes mencionados, solubiliza la hemicelulosa y facilita la digestibilidad de la biomasa, así como la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática.

Durante el proceso de autohidrólisis ocurren una serie de reacciones descritas por Ruiz y col. [54]: A altas temperaturas (150 – 230 °C) los enlaces entre los átomos de hidrógeno del agua comienzan a debilitarse, permitiendo una autoionización, es decir la formación de iones hidronio (H_3O^+) e hidroxilo (OH^-) que actuarían como catalizadores. La reacción entre los iones hidronios y grupos acetilos de la biomasa lignocelulósica (hemicelulosa) promueve la formación de ácidos orgánicos, de este modo ocurre una hidrólisis ácida de la biomasa con los ácidos orgánicos generados a partir de sí misma y el agua, razón por la que se denomina autohidrólisis.

Con el proceso de autohidrólisis a altas presiones, es posible retirar hasta el 65% de la hemicelulosa de bagazo de caña de azúcar, incrementando así la proporción porcentual de la celulosa de 41.38 % a 60.3%, con un pretratamiento a 190 °C por 10 min [55], mientras que en salvado de trigo es posible incrementar casi el doble la fracción porcentual de celulosa, de 37.4% a 63.7%, bajo unas condiciones de 180 °C durante 30 min [56]. Con las condiciones adecuadas, en *Sargassum* sp. se logró incrementar el porcentaje de glucano de 10.4% obtenido de una biomasa sin tratar, hasta 32.3% al término de la autohidrólisis, siendo esta un material más recalcitrante que los materiales vegetales antes mencionados [57].

La degradación de los polímeros de la lignocelulosa puede causar la formación de otros compuestos, si bien en la autohidrólisis generalmente se recuperan los monómeros u oligómeros de la hemicelulosa y ácidos orgánicos, éstos pueden ser degradados a otros compuestos como los furfurales (Figura 1.5) [58]. Los furfurales, los ácidos orgánicos y los compuestos fenólicos, que pudieran derivarse de la degradación de la lignina, son señalados como inhibidores, debido a que la presencia de estos afecta de manera significativa a las celulasas durante la hidrólisis enzimática [58,59].

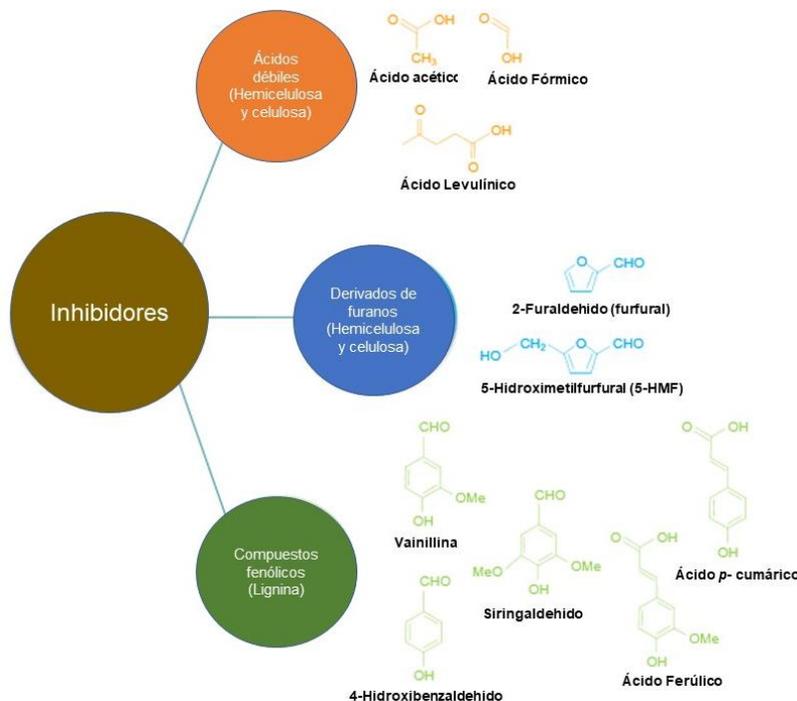


Figura 1.5. Inhibidores generados por degradación del material lignocelulósico [58].

La temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, la relación sustrato/agua son factores importantes en la autohidrólisis. Estos pueden ser diferentes de una biomasa a otra, por lo que conocer las condiciones adecuadas puede facilitar la recuperación de los productos deseados [54]. La temperatura y el tiempo de residencia, nos facilitan calcular el índice de severidad, que expresa la intensidad del pretratamiento, una vez definidas las condiciones adecuadas, este factor puede facilitar la dimensionalidad para el escalamiento del proceso [60]. Aunque lo principal es favorecer la digestibilidad de la celulosa presente en los sólidos recuperados, los compuestos solubilizados pueden ser reconocidos como compuestos de valor agregado, por sus características antioxidantes e inhibitorias. Pueden emplearse como antimicrobianos, aditivos en la industria alimentaria e incluso el licor completo puede ser un sustrato de microorganismos como *Rhodospiridium toruloides* para la producción de ácidos grasos [61,62].

1.4.2. PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

El aprovechamiento de residuos postcosecha (lignocelulósicos) tiene como principal cuello de botella su composición heterogénea, aunque existen diversas técnicas para reducir su recalcitrancia. Desafortunadamente, en ocasiones estos procesos implican reacciones

secundarias que generan compuestos que, de no ser removidos adecuadamente, son contraproducentes según el destino establecido para la biomasa. Cuando el enfoque va dirigido hacia la recuperación de azúcares fermentables y producción de bioetanol, la presencia de estos derivados inhibe la actividad de las enzimas celulasas y el funcionamiento de las levaduras [58]. A la eliminación de estos compuestos, como los furanos y los compuestos fenólicos residuales, en una biomasa con el objetivo de disminuir sus efectos inhibidores en la sacarificación, se le denomina desintoxicación. En comparación con los procesos de desintoxicación fisicoquímicos, los métodos biológicos tienen menor demanda energética, puede exentarse de adición química y generalmente son bajo condiciones asequibles [63,64]. El proceso de desintoxicación biológica puede llevarse a cabo con microorganismos ligninolíticos o sus enzimas, y debido a su eficiencia pueden ser considerados como pretratamientos de la biomasa lignocelulósica, lo que limita la formación de los compuestos inhibidores como ocurre con los pretratamientos fisicoquímicos. Los sistemas microbianos ligninolíticos, además de facilitar la digestibilidad de la biomasa, permiten la bioconversión de sus biopolímeros en compuestos o productos de valor agregado debido a su batería enzimática [58,63].

Los hongos ligninolíticos, son los microorganismos más conocidos por su capacidad ligninolítica y se clasifican en tres principales grupos: los de la pudrición blanca, los de la pudrición café y los de la pudrición suave.

Los hongos de la podredumbre suave, tienen una batería enzimática más robusta, entre ligninolíticas y celulolíticas, con una capacidad de degradación simultánea (Figura 1.6), en esta clasificación se encuentran hongos fitopatógenos, los cuales pueden provocar grandes pérdidas de los cultivos, pero que también tienen gran potencial biotecnológico, como *Aspergillus niger* que es empleado industrialmente para la producción de celulasas [27,65,66].

A diferencia de los hongos de la podredumbre blanda, los hongos de la podredumbre café y de la podredumbre blanca generalmente no se hospedan en tejidos vivos. Una de las características distintivas entre los hongos de podredumbre blanca y los de la podredumbre café es que los primeros requieren de una colonización completa de la biomasa lignocelulósica para degradar la lignina, hemicelulosa y lignina, mientras que los hongos de la podredumbre café solo requieren una modificación de la lignina para degradar completamente la celulosa y la lignina. Entre las especies pertenecientes de estos grupos de hongos existe variabilidad en el desempeño de sus baterías enzimáticas, especies que degradan selectivamente (un biopolímero a la vez), especies de degradación simultánea y de ambas dependiendo de las condiciones ambientales [27,65,66].

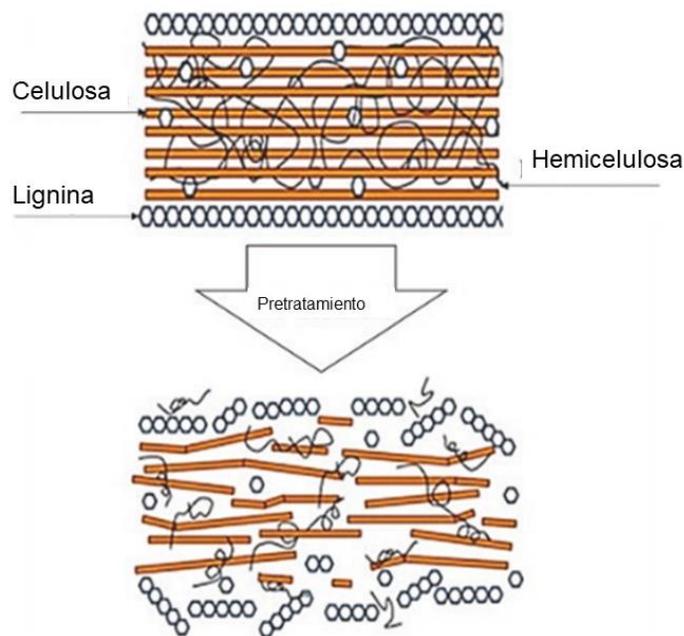


Figura 1.6. Cambios estructurales en la biomasa lignocelulósica por efecto de una degradación simultánea en pretratamiento biológico [66].

Los sistemas microbianos ligninolíticos, contienen una batería enzimática, entre las enzimas que producen se puede señalar la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y las lacasas. Las lacasas son enzimas del grupo de oxidorreductasas, que actúan sobre los enlaces conjugados de los compuestos fenólicos, o no fenólicos con ayuda de un mediador, presentes en la lignina. Las enzimas manganeso y lignino peroxidasas, requieren de peróxido de hidrógeno para catalizar la reacción de oxidación de la lignina, mientras que las lacasas utilizan oxígeno molecular, lo que las hace más atractivas a nivel industrial [58,63,63].

La despolimerización de la lignina con pretratamientos biológicos, tiene un gran alcance en el desarrollo de productos de valor agregado en la industria cosmética, como la vainillina y el ácido ferúlico, además, se ha comprobado que los compuestos fenólicos recuperados pueden fungir como mediadores de la enzima lacasa proveniente de *Trametes hirsuta*, por lo que puede economizar procesos que lo requieran [68,69].

Además de las enzimas ligninolíticas, los hongos, principalmente los de degradación simultánea, producen enzimas que despolimerizan la celulosa como las endo-glucanasas (1,4-β-D-glucan-4-glucanohidrolasa), que hidroliza enlaces internos-1,4-glucosídicos al azar en la cadena de celulosa; las exo glucanasas 1,4-β-D-glucano hidrolasa que hidroliza a lo largo de la cadena de celulosa y la 1,4-β-D glucano celobiohidrolasa (CBH) que permiten obtener unidades de celobiosa

de los extremos; y β -glucosidasa (BGL o β -glucosidasa glucohidrolasa) que hidroliza finalmente la celobiosa a glucosa. Estas enzimas actúan sinérgicamente por naturaleza. Las endo glucanasas ocasionan hidrólisis aleatoria en enlaces internos de las regiones amorfas de la celulosa, propiciando nuevas cadenas de oligosacáridos, a diferencia de las exo glucanasas, que permiten la hidrólisis de una sección microcristalina de la celulosa [27,7]. La sacarificación de la celulosa es un paso primordial en la producción de bioetanol, en este sentido, es necesario el desarrollos de bioprocesos que permitan recuperar los carbohidratos con un bajo impacto ambiental y costos económicos [71,72].

Existen factores que afectan el grado de degradación de la biomasa, desde las condiciones del medio, pH, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, cristalinidad de la celulosa, componentes orgánicos e inorgánicos, hasta los factores biológicos, las especies de microorganismos, consorcios microbianos, su interacción y competencia, etc. [24,46]. Algunos trabajos sugieren que la combinación de tratamientos biológico-físicoquímicos puede proporcionar mejores rendimientos y disminución de tiempos en la hidrólisis enzimática [68], mientras que otra de las metas a alcanzar con los pretratamientos biológicos, es el empleo de microorganismos adaptados a las condiciones de la biomasa, capaces de producir las enzimas tolerantes a las variaciones de temperatura y otras condiciones climáticas de los procesos [66].

1.5. MICROORGANISMOS AUTOCTONOS

Existen especies de hongos, como *Ganoderma applanatum*, que es un hongo de la podredumbre blanca, con un sistema enzimático ligninolítico de lacasa y manganeso peroxidasa, eficientes en técnicas de cultivo sumergido [73], y *Trametes hirsuta*, con amplia aplicación en procesos de biorremediación y decoloración de efluentes textiles [74]. Sin embargo, las capacidades y desempeños se ven muchas veces marcadas por el origen del aislamiento.

Para alcanzar una mejora en la producción de extractos enzimáticos y eficiencia de la hidrólisis enzimática, es necesaria la búsqueda de hongos y/o enzimas con estabilidad térmica, de pH (3 a 7) y de fácil adaptación, ya que esto permitiría una mejora de la eficiencia, reducción de costos y consumo energético en las etapas de bioconversión de la biomasa lignocelulósica a biocombustibles. [66]. Por ejemplo, algunas especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* han sido reconocidos por su producción de celulasas de alta termoestabilidad y/o actividad en un amplio espectro, con buen desempeño en su actividad en el desdoblamiento de la celulosa soluble y cristalina en tiempos relativamente cortos [34].

Levaduras autóctonas *Candida tropicalis* y *Schizosaccharomyces pombe* demostraron la capacidad de producir bioetanol de manera efectiva y suficiente a partir de desechos agrícolas de las cáscaras del arroz, del camote y la yuca, debido a que los microorganismos se encontraban estrechamente relacionados con las condiciones fisicoquímicas de los sustratos, lo que permitió un mejor monitoreo y control [75].

Por esta razón, es importante obtener cepas mejor adaptadas a los sistemas de la biomasa lignocelulósica de interés, así como que estén involucradas en rutas metabólicas de la síntesis de biocombustibles, para desarrollar sobreproducción de cepas modificadas con mayor resistencia a los inhibidores [34].

1.6. JUSTIFICACIÓN

El incremento en la demanda energética, ha provocado la necesidad de recurrir a fuentes alternas no limitadas, para la obtención de combustibles y que no interfieran con el ámbito alimenticio. Los residuos agroindustriales son una alternativa adecuada para este fin, debido a su abundancia y poco uso, además representan un problema de contaminación debido a su falta de aprovechamiento y al manejo inadecuado. Los residuos agroindustriales de piña, pueden ser considerados una materia prima relevante para la producción de bioetanol hidratado, por su alto contenido de carbohidratos (aproximadamente 60 % de todo el material), por ello, es importante implementar tecnologías de conversión eficientes. Es necesario evaluar pretratamientos que permitan acceder a los azúcares fermentables, disminuyendo la producción de compuestos inhibidores. Entre los pretratamientos destacan los biológicos, por ser amigables con el ambiente y los fisicoquímicos, por su alta eficiencia. De ahí la necesidad de evaluar diferentes pretratamientos de deslignificación para residuos de piña, con el fin de poder seleccionar el de mayor potencial, para hacer más eficiente la producción de bioetanol de segunda generación a partir de dichos residuos.

1.7. HIPÓTESIS

Los residuos agroindustriales de *Ananas comosus* L. (piña) son fuente potencial para la producción de bioetanol de segunda generación por su contenido de celulosa y hemicelulosa, por lo que se requieren pretratamientos adecuados para hacer los sólidos más susceptibles a la hidrólisis enzimática y liberar los azúcares fermentables.

1.8. OBJETIVOS

Desarrollar un proceso para la producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos agroindustriales de *Ananas comosus* L. (piña).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente la biomasa lignocelulósica de los residuos hoja de piña.
- Aislar y caracterizar cualitativamente microorganismos autóctonos de la biomasa.
- Evaluar pretratamientos de fermentación en estado sólido para la deslignificación de la materia prima.
- Obtener extractos crudos enzimáticos de los microorganismos autóctonos a partir de la fermentación en estado sólido y evaluar su desempeño en la hidrólisis enzimática de la biomasa.
- Evaluar pretratamientos hidrotérmicos para facilitar la susceptibilidad en la hidrólisis enzimática
- Caracterizar la composición la biomasa lignocelulósica pretratada y determinar los cambios estructurales.
- Someter a hidrólisis enzimática convencional e hidrólisis enzimática asistida la biomasa pretratada.

1.9. DISEÑO EXPERIMENTAL

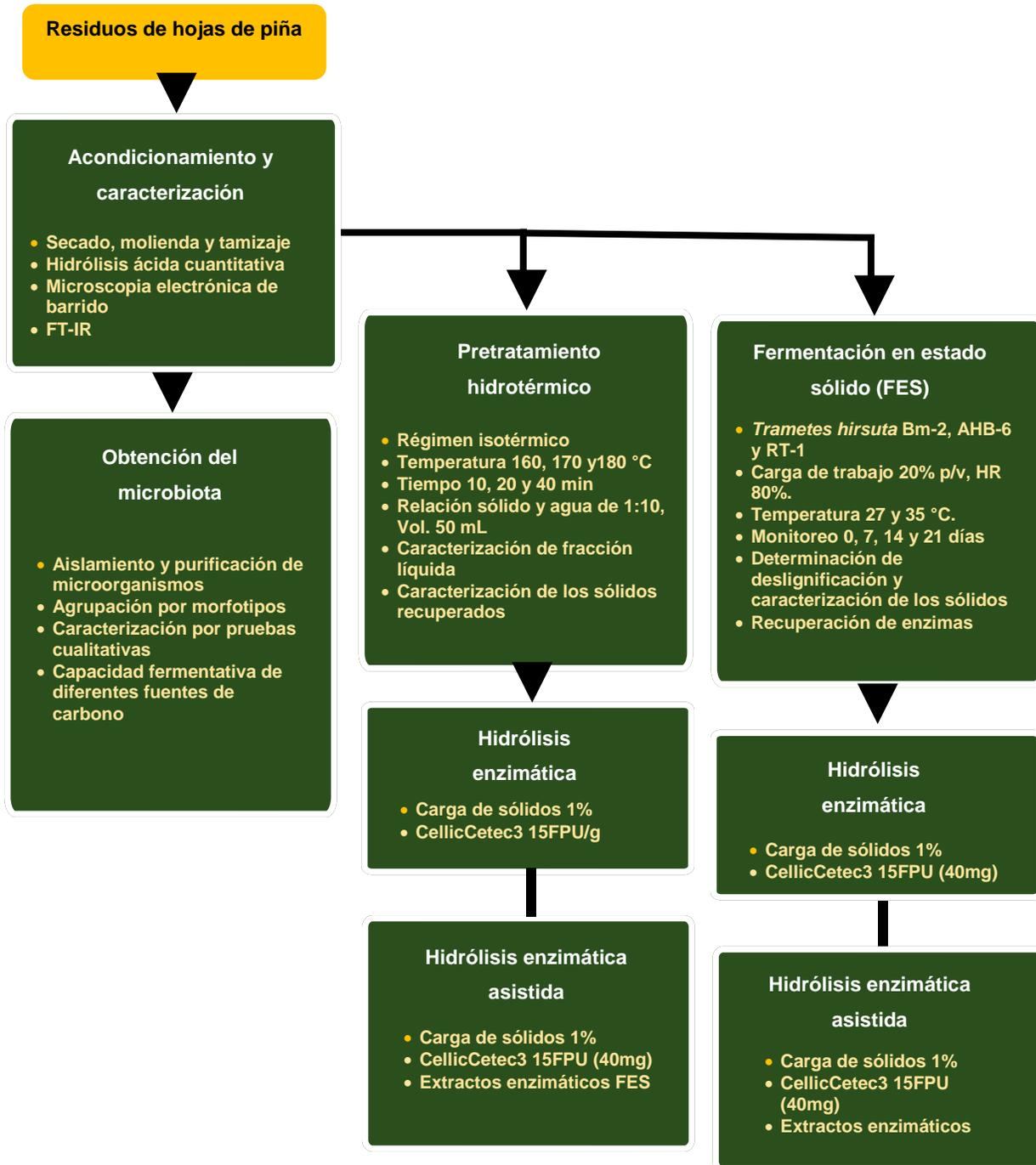


Figura 1.7. Diagrama de experimentación.

CAPITULO 2.

MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (RESIDUOS DE HOJAS DE PIÑA)

A partir del cultivo de *Ananas comosus* L. var. “cabezona” se obtuvieron los residuos de hojas de piña (RHP), que fueron colectados después de la cosecha del ciclo agrícola 2017-2018, en una parcela ubicada en Tecominoacan, municipio de Huimanguillo, Tabasco, México (17°54'N 93°33'O).

2.2. ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Las muestras, que consistían en hojas de 70-100 cm de largo, fueron seccionadas en segmentos de aproximadamente 25 cm de largo y secadas en un horno de convección (Binder, Fed model 115®, Tuttingen, Alemania) a 90 °C, durante 3 días. La materia prima seca se molió utilizando un molino (Marca Pulvex, Mod: Pulvex Mini 100, México) y se fraccionó en tamices, con tamaño de poro de 2.0 mm, 1.0 mm, 500 µm y 300 µm respectivamente [5]. El tamaño de partícula seleccionada fue de 300- 500 µm.

La biomasa se lavó con agua purificada hasta obtener 0 °Brix para evitar la influencia de los azúcares en los pretratamientos. La biomasa húmeda se almacenó a 4 °C hasta su uso.

2.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS

El material vegetal se lavó con agua corriente para eliminar residuos de campo, a continuación, para desinfectar la superficie del tejido, se sumergió en una solución de hipoclorito sodio comercial en agua al 25% (v/v) durante un minuto, y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Se seccionó el tejido bajo condiciones asépticas, para facilitar la maceración. La maceración se realizó en una licuadora utilizando 100 mL agua peptonada (ver Anexo 1) para 10 g de tejido fresco, a continuación, la muestra homogeneizada se dejó reposar por 30 min a 27 °C, posteriormente se realizaron diluciones seriadas (hasta 10⁻⁴). Las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ se inocularon por expansión con varilla de vidrio sobre medios de cultivos diferenciales (cajas Petri, 100 x 15 mm). Para facilitar la diferenciación entre hongos filamentosos, levaduras y bacterias,

se emplearon los medios de cultivo Wallenstein Agar (WLA), Rosa de Bengala Agar (RBA) y Plate Count Agar (PCA) con antimicrobianos, cuya preparación se señala en el Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4.

La purificación de los microorganismos se hizo mediante dos subcultivos, una vez observada la morfología, un primer subcultivo en los medios empleados en aislamiento, las bacterias y levaduras por estría cruzada, y los hongos filamentosos por transferencia de crecimiento micelial, respectivamente.

El segundo subcultivo se realizó en medio de cultivo MRS (De Man Rogosa & Sharpe) para bacterias, mientras que los hongos filamentosos y levaduras fueron subcultivados en medio GELPA (Anexo 5 y Anexo 6). Los hongos filamentosos se subcultivaron por transferencia de punta de hifa, mientras que las bacterias y levaduras fueron subcultivados tomando crecimiento microbiano con un palillo de dientes estéril y se depositó en los medios de cultivo antes mencionados, para propiciar la formación de una sola colonia definida. Los aislamientos y subcultivos fueron incubados a 32 °C, por 24 h en oscuridad.

Una vez que se obtuvieron colonias definidas, se agruparon con respecto a sus características morfológicas: color, elevación, anillos concéntricos, tipo de bordes, etc. También fue descrita la morfología celular de las levaduras observando en microscopio las preparaciones celulares (“frotis” en KOH 3%, p/v).

2.3.1. ACTIVIDAD LACASA EN PLACA

El método basado en la oxidación del sustrato ABTS (2,2'-ácido azino bis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) se utilizó para detectar la actividad lacasa en placa. En una placa Petri (100 x 10 mm) con medio de cultivo EMA (Ver Anexo 7), con una concentración final de 5 mM de ABTS, se inoculó un disco de crecimiento micelial de 1 cm de diámetro, proveniente de un cultivo madre en medio EMA, y se incubó en oscuridad, a una temperatura de 35 °C durante 4 días.

Por otro lado, para la determinación cualitativa de actividad lacasa en bacterias, se realizó inoculando en la parte central del medio de cultivo (MRS con ABTS 5mM) con un palillo de dientes para la formación de una colonia definida, a partir de un cultivo madre en MRS de 24 h de edad. La producción de la lacasa extracelular se consideró positiva al observarse un halo verde-azul oscuro alrededor del crecimiento microbiano, correspondiente a la oxidación del sustrato ABTS por la enzima [76].

2.3.2. ACTIVIDAD CELULASA EN PLACA

Los microorganismos se evaluaron en medio de cultivo Mandels & Weber, que contenía Carboximetil celulosa (CMC), como se indica en el Anexo 8, se inoculó un disco de crecimiento microbiano de 1 cm de diámetro, en la parte central de una caja Petri (100 x 10 mm) que contenía este medio de cultivo y se incubaron a 30 °C, por 120 h. A continuación, al crecimiento microbiano se le añadieron 15 mL de colorante Rojo Congo 1 %(v/v) hasta cubrir toda la superficie de la placa, y se dejó reposar durante 15 minutos. Finalmente se retiró el colorante y se enjuagó tres veces consecutivas con aproximadamente 15 mL de NaCl 1M, para eliminar el excedente del colorante que no haya sido absorbido en el medio. La presencia de halos incoloros alrededor del crecimiento microbiano se consideró positivo a la presencia de celulasa extracelulares, mientras una tinción bien definida se consideró negativa a la prueba [77].

Para el caso de los hongos, en esta prueba se empleó un inóculo de crecimiento micelial en Agar Papa-Dextrosa (PDA) de 72 h, mientras que el inóculo bacteriano consistió de un crecimiento de 24 h en medio de cultivo MRS.

2.3.3. PRUEBAS FERMENTATIVAS

Las levaduras fueron evaluadas mediante pruebas fermentativas con diferentes fuentes de carbono (glucosa, celobiosa, xilosa y arabinosa). Para estas pruebas se inocularon tubos de ensayo que contenían 1 mL de medio de cultivo líquido Wicherman (Anexo 9) y 1 mL de una solución de la fuente de carbono (Ver Anexo 9) y una campana Durham en su interior. Los tubos se incubaron a 32 °C durante 48 h [78]. Se consideró positiva la prueba cuando se observa una burbuja dentro de la campana de Durham, debido a la fermentación de la fuente carbono, las levaduras evaluadas se incubaron previamente en medio GELPA por 24 h.

2.4. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

2.4.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

La caracterización composicional, se hizo de acuerdo con los procedimientos establecidos en la metodología descrita por el NERL (National Renewable Energy Laboratory) para biomasa lignocelulósica [79]. El procedimiento se basa en una hidrólisis ácida cuantitativa en dos fases: en la primera fase se hidrolizaron 500 mg de muestra con 5 mL de ácido sulfúrico al 72% (v/v) en

tubos de ensayo con agitación constante durante una hora a una temperatura de 35 °C, en un baño de agua.

En la segunda fase de la hidrólisis, la mezcla fue transferida a un frasco de 250 mL con tapa hermética y se diluyó aforando en peso con agua destilada hasta alcanzar 148.7 g. Esta segunda fase de la hidrólisis, se llevó a cabo en autoclave, a una temperatura de 121 °C y presión de 1 Kg/cm² durante una hora. La fracción sólida se recuperó utilizando filtros Gooch (poro mediano, 30 mL), considerada como lignina Klason, y cuya cuantificación se determinó por gravimetría.

El contenido de celulosa y hemicelulosa en la fracción líquida recuperada fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) en un equipo Agilent 1260 Infinity II, equipado con un detector de índice de refracción y una columna MetaCarb 87H (300x7.8mm Agilent) a 60 °C y un flujo de 0.7mL/min con H₂SO₄ 5mM como fase móvil, tomando en cuenta la concentración obtenida a partir de una curva estándar de carbohidratos con glucosa, celobiosa, xilosa y arabinosa como estándares.

2.4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FT-IR)

La biomasa de RHP sin tratar y la pretratada fueron analizadas mediante espectroscopía de Infrarrojo, (Bruker tensor II, en la región de 4000-600 cm⁻¹) usando una resolución de 4 cm⁻¹, con 32 escaneos para conocer los cambios en grupos funcionales correspondientes a los principales biopolímeros (Celulosa, hemicelulosa y lignina). Para este procedimiento, las muestras se secaron a 105 °C durante una hora, previa a su lectura [47].

2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Con el fin de conocer los cambios estructurales provocados por efecto de los pretratamientos, se tomaron micrografías de RHP sin tratar y pretratado, en un microscopio electrónico de barrido (SEM, modelo JSM-6360LV, JEOL, Tokio, Japón). Las muestras fueron montadas sobre una tela de carbón adherida a un barril metálico, las cuales fueron metalizadas con una capa de oro de 15 nm y se observaron a 20 KV [80].

2.5. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Los residuos de hojas de piña fueron pretratados mediante fermentación en estado sólido (FES) con hongos nativos de la podredumbre blanca. Los hongos fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos con las pruebas cualitativas de actividad lacasa y celulasa.

2.5.1. MICROORGANISMOS

Las cepas nativas utilizadas en los pretratamientos de fermentación, en estado sólido, pertenecen a la especie *Trametes hirsuta*, cuyos datos se encuentran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Identidad de los microorganismos evaluados en fermentación en estado sólidos

Microorganismo	Fuente de aislamiento	Accesión
<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	Madera en podredumbre	GQ280373.1
<i>Trametes hirsuta</i> AHB-6	Residuos de henequén	GQ280372.1
<i>Trametes hirsuta</i> RT-1	<i>Acalypha gaumeri</i>	-

Las cepas fueron mantenidas viables en medio de cultivo Papa-Dextrosa Agar, en cajas Petri a 32 °C, hasta su uso como se describe en la metodología de fermentación en estado sólido.

2.5.2. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Las cepas de *T. hirsuta*, con 4 días de edad, fueron crecidas en medio EMA (Ver Anexo 7) a 32 ± 2 °C, de este crecimiento se transfirió un inóculo de 1 cm² a una caja Petri que contenía RHP (2% [p/v] con Agar 2% [p/v]) y se incubó durante 4 días a 32 ± 2 °C para obtener el inóculo a emplear en FES.

La fermentación en estado sólido (FES) se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se determinó el contenido de humedad a la biomasa de RHP previamente acondicionada, para realizar los ajustes adecuados a fin de obtener una relación 1:5 de sólido/agua, (5 g de sustrato en base seca en 25 mL de agua). Los matraces, con el sustrato húmedo, se esterilizaron en autoclave (121 °C y 1 kg/cm² durante 20 min). En la parte central de la superficie de la biomasa RHP se colocó un disco de 1 cm de diámetro del crecimiento micelial de *T. hirsuta* (inoculo antes mencionada en RHP-agar). Los matraces se incubaron a 27 y 35 °C, durante 21 días. En el

experimento se inocularon 12 matraces para cada hongo, tomando en cuenta el retiro de tres matraces en cada muestreo, que fue en los 0, 7, 14 y 21 días. Para el muestreo se añadieron 50 mL de agua destilada estéril y se agitó a 130 rpm en incubadora, a 30 °C por 30 min.

Las fracciones líquidas, se recuperaron por filtración y se analizaron como extractos crudos enzimáticos (actividad lacasa y contenido de fenoles), mientras que las fracciones sólidas se deshidrataron y caracterizaron como se mencionó anteriormente (Sección 2.4), y se almacenaron para la fase de sacarificación [81–83].

2.5.3. CUANTIFICACION DE FENOLES

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. La reacción se hizo con 50 µL de una muestra objeto, a la que se añadieron 750 µL de agua destilada y 50 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 10 %(v/v). Se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 5 min a temperatura de 40 °C, inmediatamente se adicionaron 150 µL de Na₂CO₃ al 7.5% (p/v) y se incubaron a 40 °C, en oscuridad durante 30 min. Finalmente se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados obtenidos se analizaron con una curva de calibración con ácido gálico como estándar, y se expresaron en mg de ácido gálico/ml de muestra objeto [84].

2.5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA

Para la cuantificación de la actividad lacasa se usó la técnica basada en la oxidación de ABTS (2,2'-ácido azino bis-3etilbenzotiazolina 6-sulfónico). En la reacción se mezclaron 100 µL de buffer de acetato (pH 5, 1 M), 100 µL de ABTS (5 mM) y 700 µL agua desionizada, y se preincubó a 40 °C por 5 min, después, 100 µL de muestra fueron añadidos. La mezcla se incubó a 40 °C durante 20 min. Finalmente se tomaron lecturas de absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm ($E=36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y una unidad de actividad se definió como 1 µmol de producto formado por min [85].

2.5.5. DETERMINACIÓN DE DESLIGNIFICACIÓN

El contenido de lignina residual en sólidos después de la FES a 27 y 35 °C, se determinó por gravimetría con el método establecido por el NERL, antes mencionado en la sección 2.4.1. El porcentaje de deslignificación se calculó mediante la diferencia entre el contenido de lignina inicial y residual [86], utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Deslignificación} = \frac{\text{lignina inicial} - \text{Lignina final}}{\text{Lignina inicial}} \times 100 \times \text{fracción de sólidos recuperados}$$

2.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS SÓLIDOS PRETRATADOS

La hidrólisis enzimática de RHP sin tratar y pretratada se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer (50 mL) con una carga de trabajo del 1% (p/v) de fracción sólida en un volumen final de 25 mL en una solución tampón de citrato de sodio (50 mM, pH 4.8). Se usó una carga enzimática de 15 FPU Cellic® Ctec3 (40 mg, Novozymes A / S, Bagsværd, Dinamarca) por gramo de celulosa contenida en la fracción sólida. Se incubó a 50 °C y 150 rpm por 72 h. Se tomaron y analizaron las muestras a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Los experimentos se hicieron por triplicado [87].

Las biomásas pretratadas fueron sometidas a hidrólisis enzimática asistida, agregando 1mL de extracto enzimático obtenido de FES correspondiente a cada caso, bajo las mismas condiciones antes descritas,

2.6.1 CUANTIFICACIÓN AZÚCARES REDUCTORES

La concentración de azúcares reductores liberados por la hidrólisis enzimática, se calculó con el método colorimétrico de Miller, que se basa en la oxidación del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS). Consistió colocar 2 mL (con dilución 10⁻¹) en tubos de ensayo, a los cuales se añadieron 3 mL de DNS. La mezcla se colocó en baño maría a 100 °C durante 5 min, seguido de un enfriamiento, sumergiendo los tubos en agua a 20 °C. A continuación, se agregaron 15 mL de agua destilada, se agitó en vórtex y finalmente se hizo una lectura de absorbancia a 550 nm [88]. Se usó una curva estándar de glucosa (stock de 1 g/L) para determinar la concentración.

El rendimiento de hidrólisis, es decir, el porcentaje que corresponde a la conversión de celulosa en azúcares reductores, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de hidrólisis \%} = \frac{[\text{glucosa}]}{1.111 \times f \times [\text{biomasa}]} \times 100$$

Donde, [glucosa] es la concentración de glucosa obtenida (g/L), [biomasa] es la carga de trabajo en la reacción, 1.111 es el factor de conversión de glucosa a celulosa y *f* la fracción de celulosa correspondiente por gramo de biomasa.

2.6.3 CARACTERIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los azúcares obtenidos de la hidrólisis enzimática asistida fueron analizados en cromatografía líquida de alta resolución HPLC (high performance liquid chromatography), equipado con un detector de índice de refracción y una columna Zorbax carbohydrate (4.6 x 250 nm, 5 micron), con temperatura de colectores a 40 °C, con una fase móvil compuesta de acetonitrilo:agua (75:25) a un flujo de 1.5 mL/min durante 25 min. Los estándares de glucosa, celobiosa, arabinosa y celobiosa fueron utilizados para determinar la composición de los hidrolizados.

2.7. PRETRATAMIENTO HIDROTÉRMICO

La relación de sólido/agua para llevar a cabo los pretratamientos hidrotérmicos fue de 1:10, es decir 5 g de sustrato (base seca) en 50 mL de agua destilada, se determinó porcentaje de humedad para complementar con agua hasta obtener el volumen señalado. Los pretratamientos se llevaron a cabo en un reactor presurizado, con control de temperatura (diseñado por Biorefinery group, Figura 2.1a) bajo el régimen isotérmico de calentamiento [89]. Las condiciones de operación fueron a las temperaturas de 160, 170 y 180 °C con variaciones en los tiempos de residencia de 10, 25 y 40 min para cada temperatura, con un diseño experimental con factor de punto central, por lo que, el pretratamiento 170 °C con 25 min de residencia se realizó por triplicado.

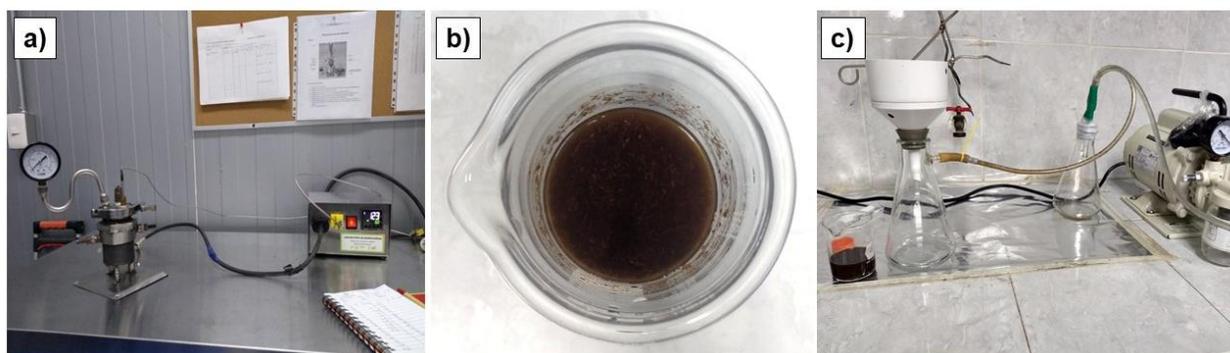


Figura 2.1. Pretratamientos hidrotérmicos, a) reactor presurizado con control de temperatura, b) hidrolizado recuperado, c) separación de las fracciones sólida y líquida para caracterización.

Al término de cada tratamiento se recuperó una biomasa inmersa en una fracción líquida oscura (Figura 2.1b), este producto obtenido fue filtrado para separar la fracción sólida de la líquida

(Figura 2.1c). La fracción sólida se lavó con agua destilada para no arrastrar residuos del hidrolizado, y se caracterizó para determinar su composición porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina (sección 2.4). Al ser un proceso isotérmico, el factor de severidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\log Ro = [Ro \text{ calentamiento}] + [Ro \text{ procesamiento isotérmico}] + [Ro \text{ enfriamiento}]$$

$$\log Ro = \int_0^{t^{Max}} \frac{T - 100}{\omega} dt + \int_{ctri}^{ctrf} \exp \left[\frac{T - 100}{\omega} \right] dt + \int_0^{t^{Max}} \frac{T - 100}{\omega} dt$$

Donde, $\log Ro$ es el factor de severidad, t^{Max} el tiempo máximo en minutos en alcanzar la temperatura del pretratamiento, T es temperatura en °C, ω es un parámetro empírico relacionado con la energía de activación y, $ctri$ y $ctrf$ son el tiempo en minutos, en que inició y que finalizó el estado isotérmico, respectivamente [60,90].

2.7.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS

La fracción líquida (hidrolizado directo), rica en hemicelulosa, fue analizada en HPLC como se indicó en la sección 2.4.1. Para determinar los carbohidratos solubilizados y la formación de compuestos de degradación, se manejaron estándares de glucosa, xilosa, arabinosa, hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético, ácido levulínico y ácido fórmico.

Los hidrolizados directos también fueron sometidos a una hidrólisis ácida cuantitativa. En un frasco de almacenamiento con taparroca hermética (sobre una balanza analítica), se añadió 2 g del hidrolizado directo, 1 g de ácido sulfúrico al 72 % (v/v), y se aforó hasta 25 g con agua destilada, el frasco con la mezcla fue cerrado herméticamente y sometida a 121 °C y presión de 1 kg/cm², durante una hora en autoclave. Posteriormente el líquido hidrolizado fue analizado en HPLC para determinar los oligómeros de carbohidratos.

2.7.2. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LOS SÓLIDOS PRETRATADOS

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con cargas de trabajo de 1 y 3% (p/v) respectivamente de la fracción sólida, bajo las condiciones que se describen en la sección 2.6. La concentración de azúcares reductores, así como los rendimientos se determinaron como se señala en la Sección 2.6.2.

2.7.3. HIDROLISIS ENZIMÁTICA ASISTIDA DE LOS SÓLIDOS PRETRATADOS

La hidrólisis enzimática asistida se llevó a cabo con una carga de trabajo de 1% (p/v) de la fracción sólida. Se usó una carga enzimática de 15 FPU Cellic® Ctec3 (40 mg, Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) por gramo de celulosa contenida en la fracción sólida. A esta hidrólisis se añadió 1 mL de extracto enzimático obtenido por FES de RHP de *T. hirsuta* AHB-6 y *T. hirsuta* RT-1, con actividad enzimática de 3268 U/mL y 1915.2 U/mL, respectivamente. Se seleccionaron los extractos enzimáticos donde se registró mayor deslignificación. Los extractos enzimáticos se añadieron en tres tiempos: 1) extracto enzimático + Cellic Ctec3 simultáneamente; 2) primero, extracto enzimático y a las 3h de incubación se añadió Cellic Ctec3; y 3), Cellic Ctec3, y se agregó a las 3h de incubación el extracto enzimático, todos los tratamientos se realizaron por triplicado. La concentración de azúcares reductores, así como los rendimientos se determinaron como se señala en la sección 2.6.1.

CAPITULO 3.

RESULTADOS

3.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA

En el crecimiento sobre los medios semiselectivos se contabilizaron entre 30-90 CFU con una dilución plaqueada de 10^{-4} , dando indicio a una amplia variedad morfológica, lo cual se aprecia en Figura 3.1.

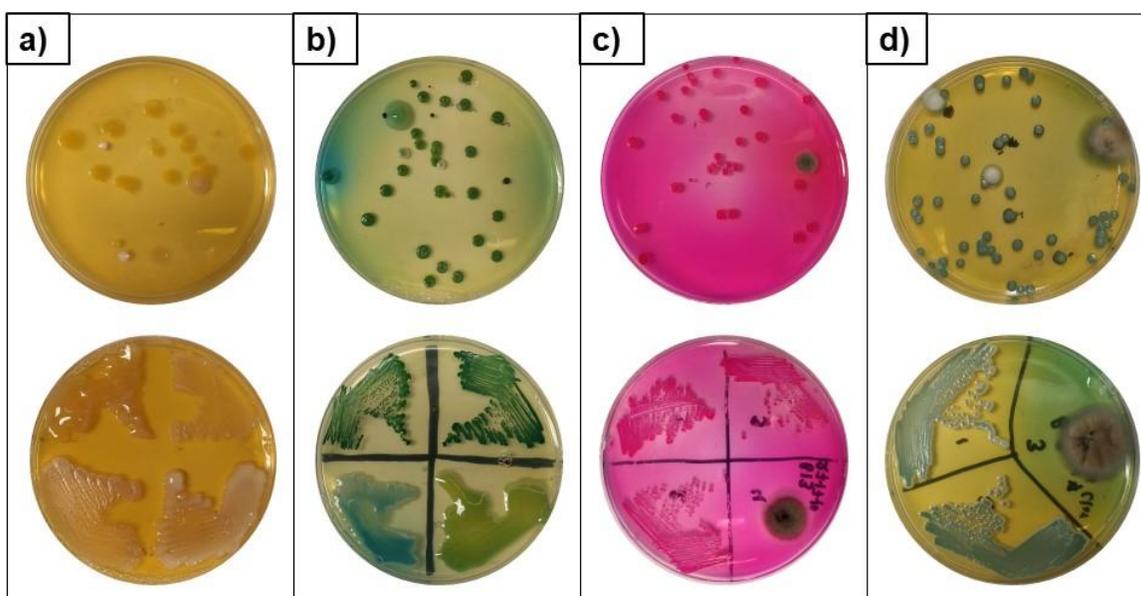


Figura 3.1. Aislamiento (arriba) y purificación de la microbiota (abajo). Aislados de bacterias en a) medio PCA y b) medio WLA; levaduras y hongos filamentosos en c) medio RBA y d) medio WLA.

En la Tabla 3.1 se encuentran agrupados los aislados obtenidos a partir de los tejidos procesados. En total, se obtuvieron 71 aislamientos axénicos con los dos tipos de maceración, de los cuales 33 fueron aislados bacterianos, 34 levaduras y 4 hongos filamentosos.

Tabla 3.1. Aislamientos obtenidos de los residuos de piña, agrupados con respecto a los medios de cultivo utilizados.

Medios de cultivo	Número de aislados			
	Plant Count Agar ¹	WLA ¹	Rosa de Bengala ²	WLA ²
Hojas	6	8	10	7
Base de raíz	10	9	10	11

¹ Cicloheximida

² Cloranfenicol

Más de la mitad de los aislados fueron obtenidos de la base de raíz, esto nos sugiere que la microbiota de este cultivo se encontró principalmente en esta sección del tejido, debido a la presencia de agua y nutrientes que requieren para su viabilidad, así como la interacción directa con el suelo donde existe una vasta gama de microorganismos.

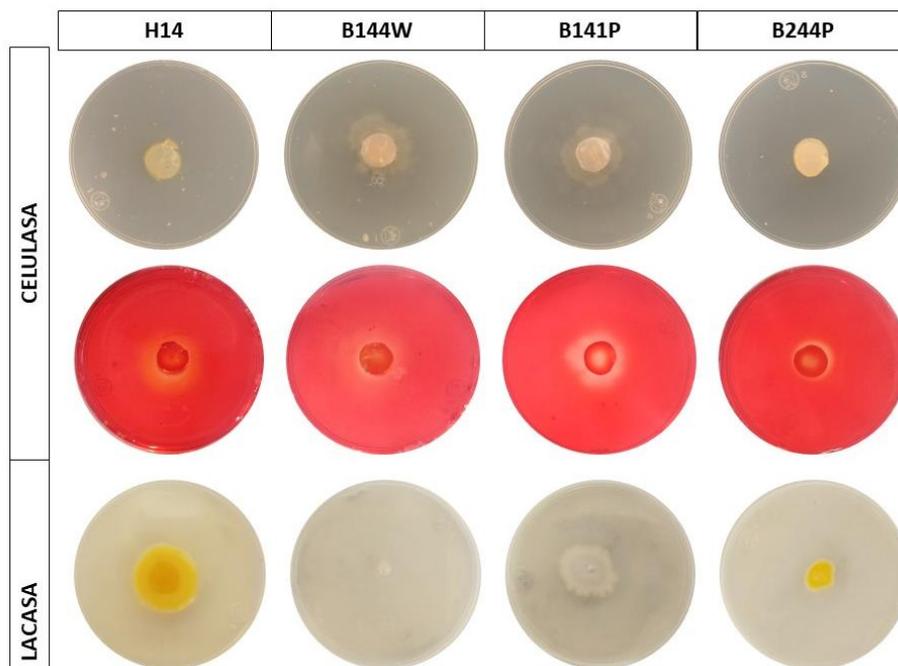


Figura 3.2. Determinación de actividad lacasa (medio de cultivo con ABTS) y celulasa (medio de cultivo con CMC) de aislados bacterianos.

El objetivo principal del aislamiento de la microbiota es la búsqueda de microorganismos adaptados a la biomasa RHP para mejorar la eficiencia de la bioconversión o modificación de la biomasa.

En este sentido, los hongos y bacterias fueron agrupados morfológicamente y luego evaluadas por su capacidad enzimática.

En la Figura 3.2, se observan cuatro morfotipos representativos de los ocho obtenidos. Se muestra el antes y el después de la adición del tinte Rojo Congo, con el objetivo de visualizar el tamaño de la colonia y el efecto de las celulasas alrededor de ella. Los resultados indicaron que existió una leve producción de celulasas, y que se encuentran estrechamente relacionadas con el crecimiento bacteriano, en este sentido, los aislados obtenidos resultaron negativos a la producción extracelular de celulasas.

El medio de cultivo MRS ha sido usado como medio selectivo para el desarrollo de bacterias ácido lácticas, que resultan positivas a la prueba de CMC con rojo Congo [34], sin embargo, dada las características observadas en esta prueba, entre los aislados endófitos obtenidos en este trabajo no se encontraron este tipo de organismos.

Por otro lado, existen géneros de bacterias [91,92] con la capacidad producir enzimas lacasas y oxidar ABTS como efecto de la actividad enzimática, no obstante, dado que en los crecimientos bacterianos observados en la Figura 3.2 no se observaron indicios de oxidación de ABTS, se puede asumir que las bacterias aisladas de RHP no tienen la capacidad de producir lacasas extracelulares ni asociadas a la pared.

Los hongos filamentosos obtenidos pertenecieron a un solo morfotipo que, también fue evaluado bajo estas pruebas cualitativas de actividad lacasa y celulasa, resultando negativo a ambas pruebas. Con base en los resultados obtenidos, los aislados de hongos y bacterias son microorganismos endófitos, probablemente simbióticos, dado que no generan enzimas que degradan los biopolímeros estructurales de RHP, por lo que no fue necesaria la identificación molecular de estos microorganismos y se descartaron para los fines de este trabajo.

En cuanto a las levaduras, la observación en microscopio, evidenció que la morfología celular era distinta para cada uno, apreciándose, por ejemplo, células en pares e incluso con gemación multipolar, células apiculadas, células globosas y pseudomicelio (Figura 3.3a, b, c y d, respectivamente), así mismo, algunas levaduras presentaron células con forma de mazo, otras tenían sus células acomodadas en cadena y otras poseían células largas en forma elipsoidal, las distinciones celulares y de morfología colonial permitieron la agrupación de los aislados en 14 morfotipos, (Figura 3.4).

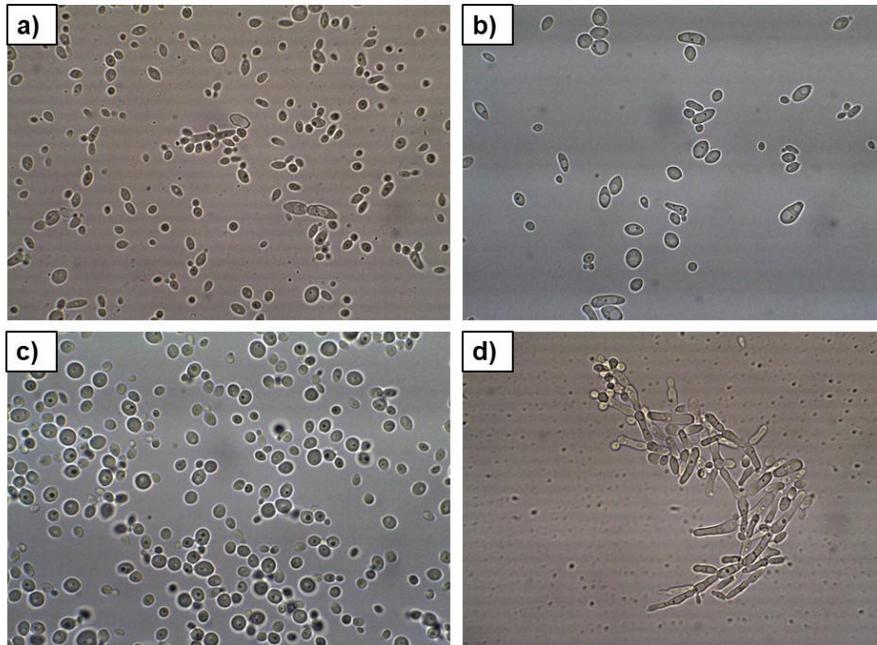


Figura 3.3. Observación en microscopio de células de las levaduras aisladas del RHP, en objetivo de 100x: a) Presencia de células en pares y gemación multipolar, b) células apiculadas, c) células globosas e individuales y d) pseudomicelio.

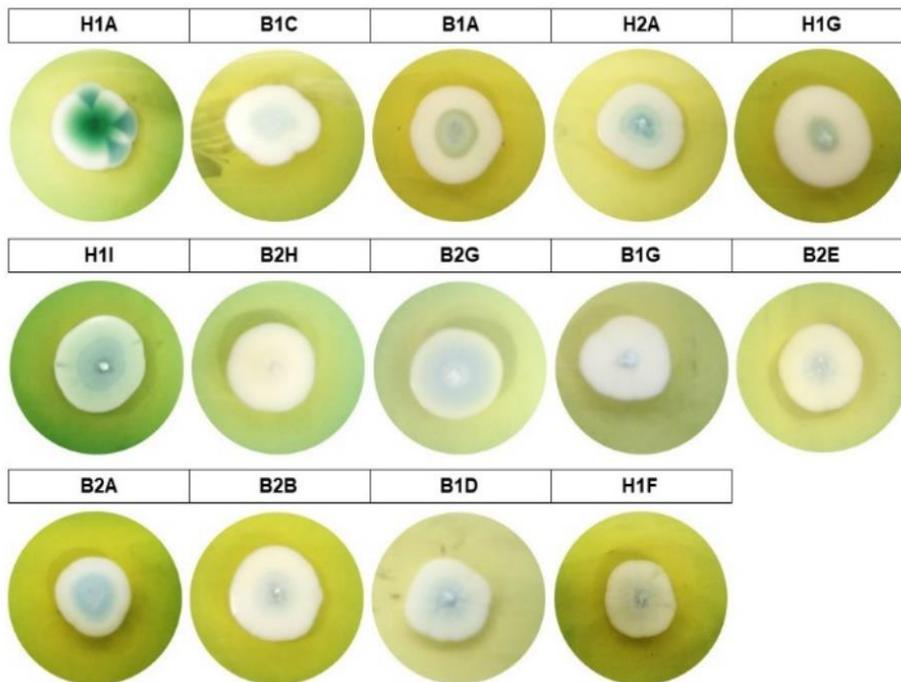


Figura 3.4. Clasificación de los morfotipos de las levaduras aisladas en medio de cultivo WLA.

Tabla 3.2. Resultados de las pruebas fermentativas de las levaduras con diferentes fuentes de carbono.

Morfotipo	Fuente de carbono		
	Xilosa	Glucosa	Celobiosa
H1A	-	+	+
B1C	-	+	-
B1A	-	+	-
H2A	-	+	-
H1G	-	+	-
H1I	-	+	+
B2H	-	+	-
B2G	-	+	-
B1G	-	+	-
B2E	-	+	-
B2A	-	+	-
B2B	-	+	-
B1D	-	+	-
H1F	-	+	-

Entre los morfotipos se observaron desde colonias blancas hasta colonias con tonalidades azules provocadas por absorción del indicador colorimétrico contenido en el medio de cultivo (Figura 3.4). La distribución de la coloración por la absorción del colorante fue diferente para cada uno de los morfotipos, por lo que, en algunas colonias, la coloración se encontró en los bordes, en otras en el centro de la colonia, en forma de anillos concéntricos, o con ligeros cúmulos rugosos en la superficie. Otra distinción observada entre los morfotipos, fue la oxidación del medio, el cual se distinguió con el cambio de coloración de azul intenso a verde-amarillo, esta cualidad de oxidación se encuentra muy relacionado con la capacidad fermentativa de las levaduras y su tolerancia de pH (4-7).

Los morfotipos fueron sometidos a pruebas de asimilación y fermentación de tres fuentes de carbono, xilosa, glucosa y celobiosa, con la finalidad de seleccionar los aislados que presenten mayor recepción de carbohidratos para óptima fermentación alcohólica. Aunque todos los aislados asimilaban los tres carbohidratos para su crecimiento, sus capacidades fermentativas fueron distintas. En la Tabla 3.2 se observa que ninguno de los aislados tuvo la capacidad de

fermentar xilosa, en contraste todos los aislados fermentaron glucosa y sólo las cepas de los morfotipos H1A y H1I pudieron fermentar celobiosa. En perspectiva, aunque aún faltan estudios de identificación, y caracterización, las cepas H1A y H1I que fueron aislados de hojas de piña, pueden considerarse como potenciales fermentadores de los hidrolizados enzimáticos, debido a que tienen la capacidad de asimilar la celobiosa, dímero puede encontrarse residualmente al final de una sacarificación incompleta, de este modo es posible aprovechar todos los carbohidratos fermentables.

3.2. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD LACASA Y CELULASA DE LAS CEPAS

Trametes hirsuta

La actividad lacasa de *T. hirsuta* en la prueba cualitativa en placa se puede ver en la Figura 3.5, alrededor del crecimiento micelial se observa un halo de coloración azul verdoso, que es el resultado de la oxidación de ABTS causada por las enzimas lacasas extracelulares producidas por los hongos [76]. Los resultados de las pruebas en placas mostraron que las cepas *T. hirsuta* AHB-6 y *T. hirsuta* RT-1 presentaron niveles más altos de oxidación de ABTS en comparación con *T. hirsuta* Bm-2. Esta variación en la actividad lacasa puede atribuirse a que los hongos evaluados provienen de diferentes sitios de aislamiento, de acuerdo con lo reportado por Tapia-Tussell y col. [76].

T. hirsuta tiene una amplia gama de isoenzimas de lacasa con alto potencial redox. Vasina y col. [99] identificaron cinco genes de lacasa en *T. hirsuta*, lo que puede indicar su uso potencial en una amplia gama de procesos biotecnológicos, dos de estos genes de lacasa también fueron identificados en *T. hirsuta* Bm-2 por Pereira y col. [94]; Pereira y col., señalan que al inducir el hongo con cáscara de toronja, la expresión de estos genes aumentó hasta 90 veces en comparación con los niveles observados cuando se cultivaron en medio basal [95]. Dado que se visualizó un nivel de oxidación más alto con *T. hirsuta* AHB-6 y *T. hirsuta* RT1 comparados con *T. hirsuta* Bm-2 (la cepa más estudiada de estos tres), estos resultados pueden atribuirse a la variabilidad genética entre las cepas de *T. hirsuta*, lo que a su vez influiría en su desempeño enzimático en el desdoblamiento del sustrato.

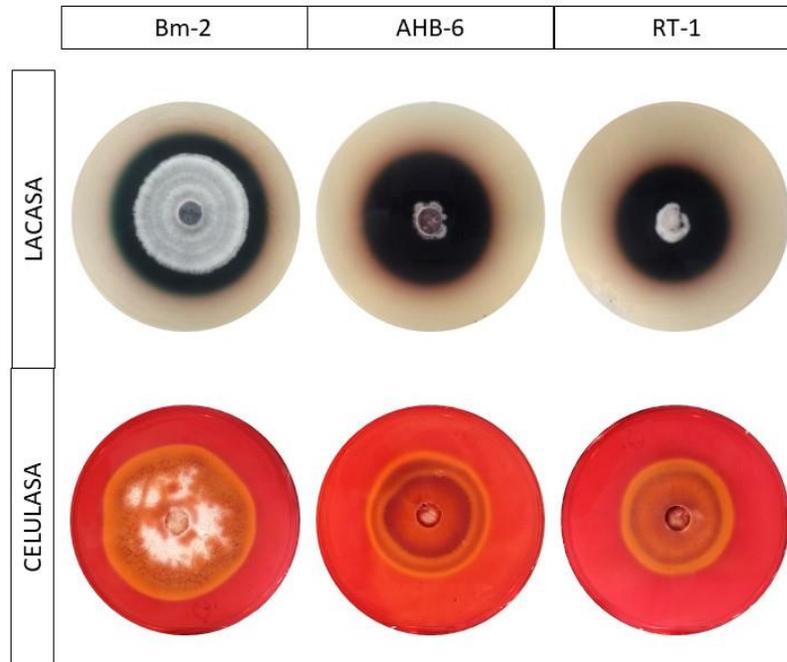


Figura 3.5. Determinación de actividad lacasa (medio de cultivo con ABTS) y celulasa (medio de cultivo con CMC) mediante pruebas cualitativas de a) *Trametes hirsuta* Bm-2, b) *Trametes hirsuta* AHB-6 y c) *Trametes hirsuta* RT-1.

La actividad celulolítica de las cepas de *T. hirsuta* AHB-6 y *T. hirsuta* RT-1 (Figura 3.5) en agar, demostraron una actividad endoglucanasa débil, similar a lo reportado para esta especie por Saritha y col. [96]. Sin embargo, *T. hirsuta* Bm-2 revela zonas hialinas que indican un crecimiento micelial asociado con una alta actividad celulolítica. Muchas especies de hongos de pudrición blanca carecen de celulasas extracelulares y tienen una sinergia diferente a los hongos de la podredumbre café. Esta especie, no puede despolimerizar directamente la celulosa en azúcares reductores, por lo que el consumo de este biopolímero como fuente de carbono es bajo [27].

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS

La composición de la holocelulosa contenida en los residuos de hoja de piña fue similar a lo reportado por algunos autores [5,86]. Como se puede observar en la Tabla 3.3, las diferencias en su composición pueden ser distintas de acuerdo a la variedad y al sitio de desarrollo de la planta; principalmente de la lignina, que es el polímero que le confiere mayor soporte y protección a la planta debido condiciones climáticas y de suelo; Laftah y col. [19], quienes reportan contenidos de lignina similares a los de este trabajo, señalan que el alto contenido de éste polímero

proporciona mayor resistencia a la extracción de la holocelulosa, debido a su naturaleza recalcitrante.

Tabla 3.3. Caracterización composicional de los residuos de hojas de piña (% p/p) en base seca.

Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Variedad/país	Referencia
42.41 ± 1.09	19.52 ± 1.07	30.20 ± 0.82	Cabezona/ México	En este estudio
81.27 ± 2.45	12.31 ± 1.35	3.46 ± 0.58	No reportado/Brasil	[48]
46.17 ± 0.76	19.28 ± 0.54	2.8 ± 0.70	Giant Kew/ India	[86]
41.15 ± 0.25	21.02 ± 0.54	14.4 ± 0.68	Giant Kew/India	[5]
No reportado	No reportado	30	No reportado/Malasia	[19]
81.27%	12.31%	3.47	No reportado/China	[98]
75.3	13.3	9.8	No reportado/India	[99]
81.27	12.31	3.46	No reportados/India	[100]

3.4. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

El crecimiento de las tres cepas utilizadas en la fermentación en estado sólido se observa a en la Figura 3.6. *T. hirsuta* Bm-2 presentó un crecimiento micelial notorio desde los 7 días de evaluación con las dos temperaturas de incubación, con respecto a los otros hongos evaluados. Aunque con *T. hirsuta* AHB-6, tanto a 27 °C como a 35 °C, se observó un crecimiento menos evidente que con *T. hirsuta* Bm-2, se apreció un cambio de coloración en los residuos al término del pretratamiento. Por último, *T. hirsuta* RT-1 presentó un crecimiento micelial intermedio con respecto a los dos anteriores, se observó micelio tanto en la superficie, como entre las fibras de los residuos.

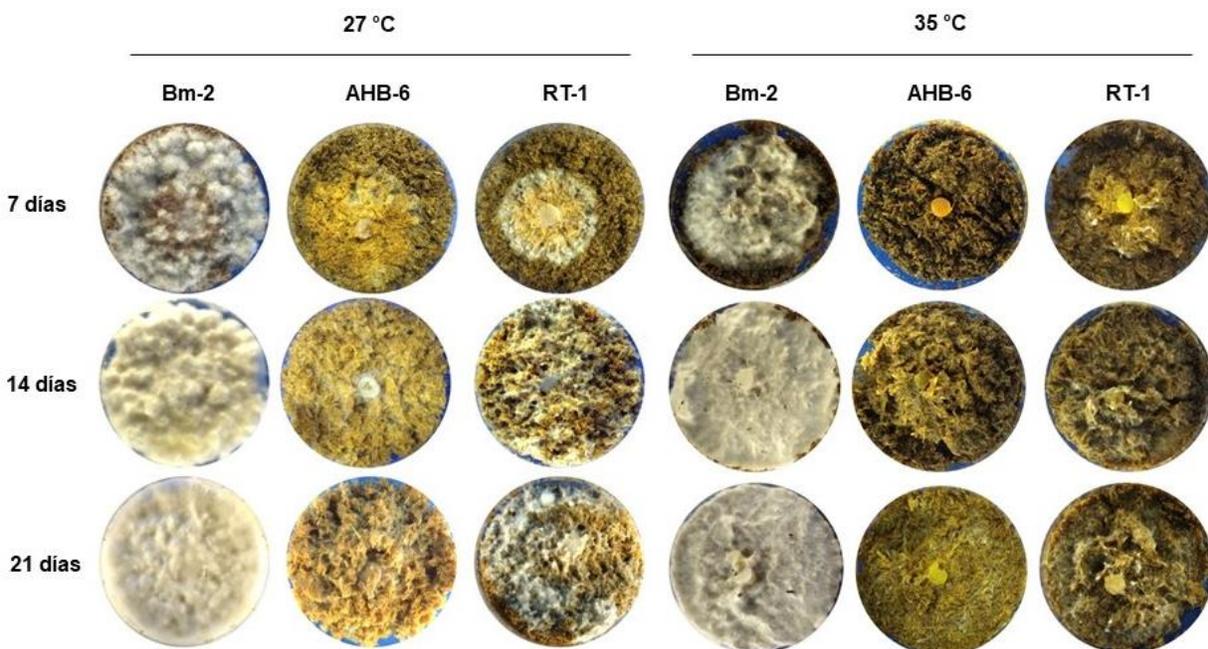


Figura 3.6. Fermentación en estado sólido con cepas de *T. hirsuta* a 27 °C y 35 °C durante 21 días.

En la Figura 3.7 y Figura 3.8, se muestra la producción enzimática de lacasas con respecto a tiempo obtenidas en fermentación en estado sólido (FES) con las cepas de *T. hirsuta* a las temperaturas de 27 °C y 35 °C de incubación, respectivamente.

En la fermentación en estado sólido a 35 °C, *T. hirsuta* Bm-2 produjo una actividad lacasa de 2,083.7 U/mL en el día 7 de incubación y la mayor actividad la presentó a los 21 días de incubación, con un valor de 3,003.2 U/mL (Figura 3.8). Esta cepa ha sido evaluada por Zapata-Castillo y col. [101], quienes alcanzaron una actividad de 2,496 U/mL en fermentación sumergida usando medio basal y salvado de trigo 2 %(p/v); también se ha comprobado que al incrementar la carga de salvado de trigo a 3% (p/v) al medio basal, la actividad de lacasa del *T. hirsuta* Bm-2 incrementa a 4,081.2 U/mL [69], lo que sugiere una influencia de la carga de trabajo en la producción enzimática de esta cepa, el cual es mayor en una fermentación en estado sólido en comparación con fermentación sumergida.

Ancona y col. [69] mencionan que la dinámica enzimática tiene una estrecha relación con la liberación de compuestos fenólicos (de 2.18 mg/mL a 3.46 mg/mL), es decir, que cuando ocurrió la despolimerización de la lignina del salvado de trigo, la concentración de fenoles en el medio aumenta, así como otros compuestos con radicales libres de 3-4 carbonos que pueden actuar como mediadores enzimáticos.

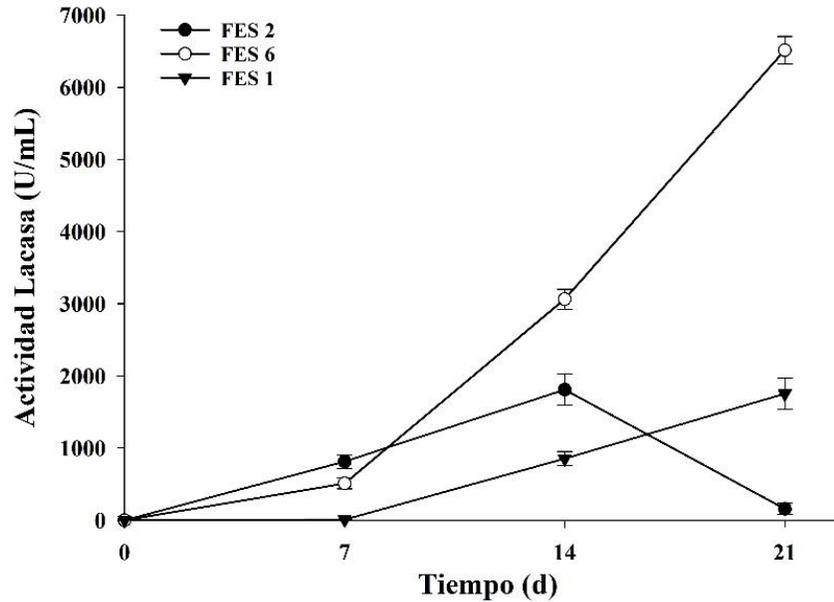


Figura 3.7. Actividad lacasa producida en FES de RHP con *T. hirsuta* Bm-2 (FES 2), *T. hirsuta* AHB-6 (FES 6) y *T. hirsuta* RT-1 (FES 1) a una temperatura de incubación de 27 °C durante 21 días. Los datos graficados son las medias \pm desviación estándar de las tres mediciones (n = 3).

En fermentación en estado sólido a 35 °C con *T. hirsuta* Bm-2, la concentración de fenoles aumentó de 0.44 mg/mL a 1.71 mg/mL, este comportamiento se ha observado en estudios previos para esta cepa a la misma temperatura [101,69]. Por el contrario, al usar la misma cepa en FES a 27 °C, los niveles de fenoles disminuyeron a 0.18 mg/mL, lo que sugiere que posiblemente los fenoles fueron reconocidos como sustratos o inductores y se oxidaron, causando así una disminución de la actividad de lacasa a partir del día 14, con una actividad máxima de 1,809.2 U/mL (Figura 3.7). Este resultado obtenido fue similar a lo reportado por Tapia y col. [102], quienes obtuvieron 1,777.7 U/mL de actividad lacasa con *T. hirsuta* Bm-2 en fermentación sumergida con vinaza a 28 °C. Con este primer informe sobre FES y los reportes anteriores acerca de fermentación sumergida, se demuestra que la temperatura es un factor importante en la producción enzimática de lacasas utilizando la cepa *T. hirsuta* Bm-2.

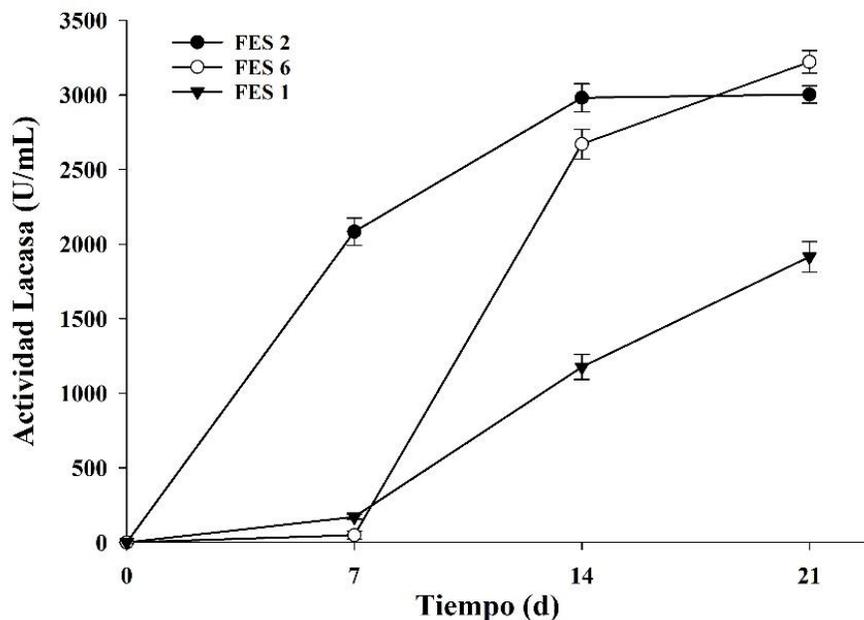


Figura 3.8. Actividad lacasa producida en FES de RHP con *T. hirsuta* Bm-2 (FES 2), *T. hirsuta* AHB-6 (FES 6) y *T. hirsuta* RT-1 (FES 1) a 35 °C durante 21 días. Los datos graficados son las medias \pm desviación estándar de las tres mediciones (n = 3).

Los niveles de actividad enzimática obtenidos con la cepa *T. hirsuta* RT-1 fueron inferiores a los de *T. hirsuta* Bm-2. La concentración de fenoles disminuyó de una concentración inicial de 0.44 mg/mL, hasta 0.09 mg/mL después de la FES a 27 °C, mientras que en FES a 35 °C aumentó a 1.69 mg/mL, aunque, la máxima actividad lacasa fue similar en ambas temperaturas a los 21 días de incubación: 1,752.7 U/mL y 1,915.2 U/mL a 27 °C y 35 °C, respectivamente. En este estudio de FES con la cepa *T. hirsuta* RT-1 se destacó la estabilidad del hongo para la producción enzimática en ambas temperaturas.

Por otro lado, *T. hirsuta* AHB-6 mostró los niveles más altos de actividad lacasa entre las tres cepas estudiadas, alcanzando 3,268 U/mL a 35 °C y duplicando esta cantidad en FES a 27 °C (6,513.8 U/mL). En cuanto a la concentración de fenoles, se observó el mismo comportamiento que las otras cepas, obteniendo concentraciones de 0.08 y 1.79 mg/mL al término de la FES a 27 y 35 °C, respectivamente. Se ha demostrado, que la temperatura tiene influencia en la producción de isoenzimas durante los procesos de deslignificación, lo que puede provocar una variabilidad en la concentración de fenoles liberados, así como en su conformación estructural [103]; además, algunos fenoles en particular, a concentraciones específicas, pueden reconocerse como inductores que desencadenan la actividad de las lacasas. Por ejemplo, el ácido ferúlico, el ácido vainillínico y el guayacol inducen los genes de lacasa en *T. hirsuta* Bm-2 [102]; aunque, en

RHP se ha identificado al ácido *p*-cumárico como el principal precursor de la lignina [104], por lo que, teóricamente, éste habría fungido como un inductor para estimular altos niveles de enzima.

La estimulación del crecimiento micelial y la producción de lacasa en FES puede ocurrir con la adición de nutrientes específicos e incluso con la adición de iones Cu^{2+} , Ag^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} entre otros [105]; en este estudio, no se emplearon estos aditivos, por lo que el crecimiento micelial y la producción de enzimas se estimularon por las trazas de iones Cu^{2+} y Mn^{2+} que RHP contiene naturalmente [15].

Además, la adaptabilidad y desarrollo de las cepas evaluadas en este trabajo fue distinto, esto se debe a que la cepa *T. hirsuta* Bm-2, fue aislada de madera en descomposición, *T. hirsuta* AHB-6 se obtuvo de fibras residuales de henequén que contenían altas concentraciones de ácidos orgánicos [76], mientras que *T. hirsuta* RT-1 se encontró en *Acalypha gaumeri*, especie endémica del estado de Yucatán (México), estudiada por su alto contenido de compuestos con potencial antagonista a fitopatógenos; la naturaleza de los microorganismos, atribuido por las condiciones de hábitat sobre el cual fueron aislados, delimita el reconocimiento de los sustratos [76].

Las cepas de *T. hirsuta* manifestaron diferentes capacidades de deslignificación de RHP después de los 21 días de incubación (Tabla 3.4). El mayor porcentaje de deslignificación registrado fue 28.45% después del pretratamiento en FES a 35 °C con *T. hirsuta* RT-1. Entre los porcentajes de deslignificación de RHP por medio de FES con *T. hirsuta* Bm-2 a 27 °C y 35 °C no existieron diferencias significativas, lo que implica que la temperatura no influyó en este aspecto del pretratamiento con esta cepa.

Los porcentajes de deslignificación obtenidos en FES a 35 °C con *T. hirsuta* AHB-6 y con *T. hirsuta* RT-1, fueron poco más del doble que los alcanzados con estas cepas en FES a 27 °C. Estos resultados coinciden con lo reportado por Isroi y col. [106], quienes señalan que *T. hirsuta* hidroliza mejor la lignina con sus enzimas a temperaturas superiores a 30 °C, a diferencia de las lacasas de otros microorganismos, cuyas temperaturas ideales de reacción se encuentran entre 20 °C y 28 °C.

Hasta el momento no hay reportes disponibles sobre deslignificación de RHP mediante FES y solo existen unos pocos estudios asociados a pretratamientos enzimáticos para este sustrato; por ejemplo, Banerjee y col. [22] lograron deslignificar RHP hasta el 81.12% en 5 h, por medio de fermentación sumergida con una carga de sólidos de 21.5 % (p/v) y lacasas purificadas provenientes de *Lentinus squarrosulus* (3,500 U/g de sustrato), con una biomasa que contenía 14% de lignina inicial. Estos autores afirman que la carga de sólidos influye en la optimización de la deslignificación enzimática de RHP, ya que, la eficiencia tiende a aumentar cuando las cargas

de trabajo son bajas, debido a una mejor homogeneización del oxígeno y, por tanto, una mayor accesibilidad de las enzimas al sustrato [86], lo que indica que los porcentajes de deslignificación en fermentación sólida, serían menores en comparación con una deslignificación en fermentación sumergida.

Tabla 3.4. Porcentaje de deslignificación de RHP después de 21 días de FES a 27 °C y 35 °C con cepas de *T. hirsuta*. Fue usado un análisis ANOVA para determinar las diferencias significativas $p < 0.05$.

Cepa utilizada en Fermentación en estado sólido (FES)	Deslignificación %	
	27 °C	35 °C
<i>T. hirsuta</i> Bm-2	17.48 ± 0.45 a	15.51 ± 0.15 ac
<i>T. hirsuta</i> AHB-6	9.49 ± 0.93 b	24.71 ± 0.43 d
<i>T. hirsuta</i> RT-1	13.64 ± 1.42 c	28.45 ± 0.43 e

El mayor porcentaje de deslignificación alcanzado fue de 28% en FES con *T. hirsuta* RT-1 a 35 °C. Vasco-Correa y col. [107], sugieren un mecanismo de adaptación gradual, a través de subcultivos, en fermentación en estado sólido para sustratos con alto contenido de lignina, ellos lograron la adaptación de *Ceriporiopsis subvermispora* en residuos de fresno americano (25% de lignina), alcanzando una deslignificación del 26% al término de 28 días; en comparación con lo obtenido en este trabajo, la cepa *T. hirsuta* RT-1, tiene una mejor adaptación al sustrato, ya que, no fue necesario de subcultivos para alcanzar un desempeño similar a lo reportado.

Las lacasas son las enzimas deslignificadoras más importantes en *T. hirsuta*, se consideran inespecíficas ya que son capaces de reconocer una amplia gama de sustratos; sin embargo, los potenciales redox de las enzimas pueden ser diferentes de acuerdo con su origen microbiano [108]. La lignina es un heteropolímero, que se conforma de aproximadamente del 70% de compuestos no fenólicos y cuya proporción estructural varía para cada especie vegetal [109]; por lo tanto, las lacasas requieren la acción concertada de enzimas auxiliares o la presencia de mediadores para degradar completamente esta macromolécula [110].

En este trabajo, no se agregaron mediadores externos al FES de RHP, por lo que se asume que la degradación o modificación de compuestos no fenólicos ocurrió por reconocimiento de radicales libres o mediadores redox generados en las primeras etapas de oxidación de la lignina de RHP, ya que existen investigaciones que señalan que los compuestos recuperados (productos de deslignificación), pueden realizar la función de mediadores en sistemas *in vitro*, aunque esta interacción aún no se ha demostrado en la deslignificación espontánea natural [110].

La deslignificación biológica es un proceso lento; aunque puede ser más eficaz, económico y ecológico en comparación con los procedimientos fisicoquímicos o químicos. La lacasa es capaz de despolimerizar compuestos fenólicos, normalmente tóxicos o recalcitrantes a la descomposición convencional de la biomasa [108], y permite recuperar compuestos de valor añadido, como antioxidantes y productos antimicrobianos de interés para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica [111].

Las cepas de *T. hirsuta* evaluadas en este estudio disminuyeron significativamente el contenido de lignina en RHP mediante FES a 35°C; por lo tanto, solo se caracterizó la biomasa recuperada de experimentos a esta temperatura. En los resultados se puede observar un comportamiento diferente entre las tres cepas con respecto a la degradación de la holocelulosa (Tabla 3.5). *T. hirsuta* es un microorganismo ligninolítico perteneciente al grupo de hongos de la podredumbre blanca, que tiene la capacidad de degradar la biomasa lignocelulósica tanto simultánea como selectivamente. En el primer caso, se trata de la degradación gradual de los tres biopolímeros en un solo proceso, mientras que en el tipo de degradación selectiva, la despolimerización se produce de forma paulatina, comenzando por la lignina, seguido de la degradación de la hemicelulosa y, la mayoría de las veces, manteniendo la celulosa intacta [58].

Tabla 3.5. Caracterización composicional de RHP sin tratar y RHP pretratado en FES con las cepas de *T. hirsuta* a 35°C. Los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina están calculados en base seca total (% , p/p).

Biomasa	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Biomasa sin tratar	42.57 ± 0.97 a	18.52 ± 1.32 a	30.20 ± 0.59 a
FES con Bm-2	63.01 ± 0.56 b	12.36 ± 0.59 b	24.76 ± 0.45 b
FES con AHB-6	62.53 ± 0.94 b	15.73 ± 0.46 c	21.40 ± 1.37 c
FES con RT-1	49.97 ± 1.31 c	29.45 ± 0.46 d	20.51 ± 0.87 c

La cepa *T. hirsuta* RT-1 mostró más selectividad hacia la despolimerización de la lignina y permitió un aumento proporcional de hemicelulosa desde un 18.52% (p/p) inicial a 29.45% (p/p) después de la FES, mientras que *T. hirsuta* Bm-2 y *T. hirsuta* AHB-6 redujeron la hemicelulosa hasta un 12.36 y 15.73% (p/p), respectivamente (Tabla 3.5). En cuanto al contenido de celulosa todas las cepas presentaron incrementos; del 49.97% (p/p) con *T. hirsuta* RT-1, 62.53% (p/p) con *T. hirsuta* Bm-2 y 63.01% (p/p) con *T. hirsuta* AHB-6.

Aunque, los valores de holocelulosa obtenidos (75-80% [p/p]) fueron menores a los reportados por Moya y col. [111], quienes alcanzaron hasta 90-92% (p/p) mediante biopulpeo de RHP con *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* en 6 semanas, los resultados obtenidos en éste trabajo se lograron sin mejoramiento de la superficie de contacto y en la mitad del tiempo de lo reportado para el biopulpeo.

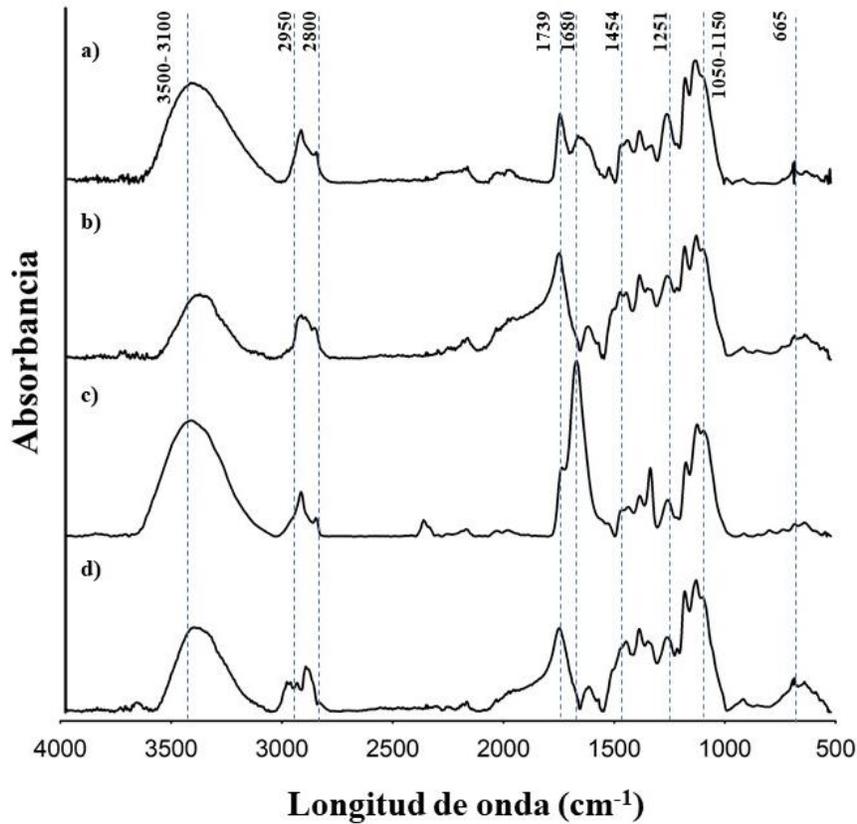


Figura 3.8. Espectros FT-IR de la biomasa RHP sin tratar (a) y las biomásas pretratadas en FES a 35 °C con *T. hirsuta* Bm-2 (b), *T. hirsuta* AHB-6 (c) y *T. hirsuta* RT-1 (d).

El análisis de los espectros obtenidos mediante FT-IR de las biomásas pretratadas en SSF, con respecto a la biomasa sin tratar (control), se muestran en la Figura 3.9. La banda de absorbancia entre 3600-3100 cm⁻¹ corresponde a la vibración del estiramiento de OH-, y entre 2950-2800 cm⁻¹ se reconocen las señales de la vibración de estiramiento de CH-, las cuales están asociadas a celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en RHP [112].

Las señales de la vibración de los estiramientos de C=O de los grupos acetilo correspondiente a la hemicelulosa se observan en el espectro a 1739 cm⁻¹ y a 1680 cm⁻¹ los relacionados a la cera

de pectina [86,113]; en comparación con la biomasa sin tratar, el pico de la primera señal se conservó en la biomasa pretratada en FES con *T. hirsuta* RT-1 (Figura 3.9d) debido a la especificidad de degradación que no causó una disminución porcentual de la hemicelulosa, mientras que el segundo pico se ve modificado en las demás biomásas pretratadas, debido a su asimilación como fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos.

En el rango de longitud de onda de $1454\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$, se visualizaron diferencias entre los espectros de las biomásas pretratadas en FES. En la señal de 1454 cm^{-1} de la biomasa FES con *T. hirsuta* Bm-2 (Figura 3.9b) se observa un ligero aumento, correspondiente al estiramiento asimétrico C-O-C de celulosa y hemicelulosa, debido a que estos polímeros quedan más expuestos después del pretratamiento a diferencia de RHP sin tratar (Figura 3.9a). La ausencia o variaciones en la intensidad de señales podrían atribuirse a los diferentes comportamientos de la batería enzimática de cada cepa. En la biomasa pretratada en FES con *T. hirsuta* AHB-6 (Figura 3.9c) hubo una disminución en la señal de 1370 cm^{-1} y un aumento en 1336 cm^{-1} a diferencia de las otras dos biomásas pretratadas en FES, similares a las observadas en la biomasa sin tratar; estas señales corresponden a la celulosa cristalina tipo II y al estiramiento de CH_2 , respectivamente [21,107]. Esto puede asociarse a una mejor exposición de la celulosa, como se verá más adelante en la Figura 3.10.

El ensanchamiento de los anillos del siringilos de la lignina y las vibraciones del estiramiento de CO del xilano (hemicelulosa) se reconocen a 1251 cm^{-1} , mientras que, en el rango de las longitudes de onda de $665\text{-}619\text{ cm}^{-1}$, las señales corresponden a secciones alifáticas y estiramiento de CH relacionados a otros compuestos aromáticos de lignina [121]; en las biomásas pretratadas en FES donde ocurrió una disminución porcentual de hemicelulosa y lignina se observó que las primeras señales mencionadas aparecieron con picos más pequeños, en comparación con los picos de las muestras de RHP sin tratar; mientras que en el rango de señales que van de 665 cm^{-1} a 619 cm^{-1} se visualizaron distintas alteraciones debido a la deslignificación y/o modificación estructural de la lignina, especialmente en el pretratamiento con *T. hirsuta* RT-1 (Figura 3.10d).

Las modificaciones estructurales se observaron en las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB). En la Figura 3.10a, la muestra de RHP sin tratar (control) puede verse como una fibra compleja con una superficie rugosa y cierta acumulación de lignina en forma de esferas (círculo amarillo). Por otro lado, en la biomasa tratada en FES con *T. hirsuta* Bm-2, se observaron filamentos delgados atribuidos al crecimiento micelial (Figura 3.10b, círculo amarillo), en acercamiento se pudo apreciar el contacto de este micelio con los cúmulos de la lignina,

presentes en la superficie de la biomasa (Figura 3.10b' flecha amarilla), debido su capacidad de deslignificación selectiva y asimilación de lignina como principal fuente de carbono [107].

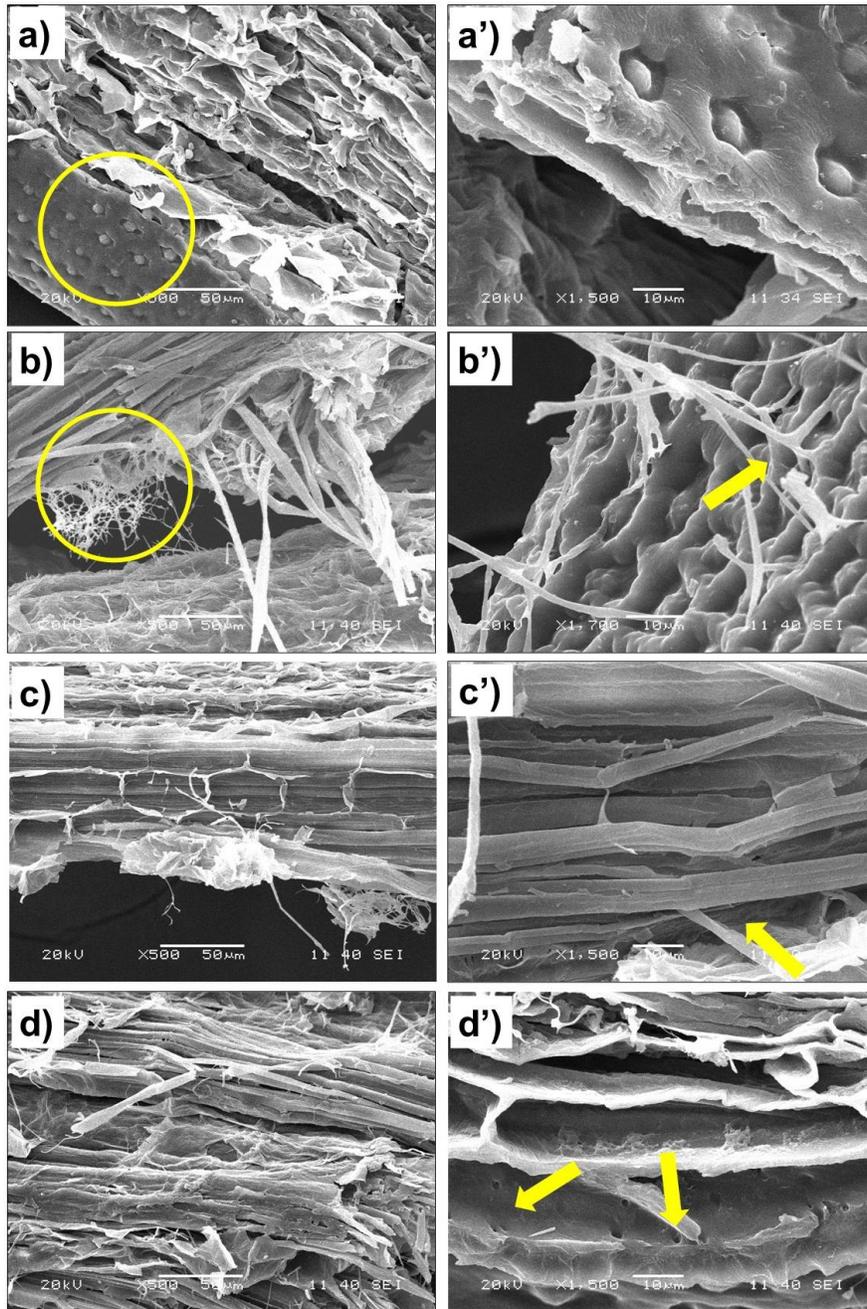


Figura 3.10. Micrografías de RHP sin tratar (a, a') y RHP pretratadas en FES a 35 °C con *T. hirsuta* Bm-2 (b, b'), *T. hirsuta* AHB-6 (c, c') and *T. hirsuta* RT-1 (d, d'). Donde a', b', c' y d' corresponden a magnificaciones (MEB-X 1,500 y MEB-X 1,700) de los efectos más relevantes.

En biomasa pretratada con *T. hirsuta* AHB-6, los túbulos de celulosa quedaron expuestas con un ordenamiento perfectamente lineal (Figura 3.10c), presentaron diámetros de 10-15 μm aproximadamente (Figura 3.10c', flecha amarilla), y con una superficie lisa debido a la presencia de ceras y aceites, similar a las características descritas para la celulosa de RHP por Abraham y col. [99], y Cherian y col. [48]. Por otro parte, aunque en la biomasa pretratada en FES con *T. hirsuta* RT-1 no se apreció una exposición completa de celulosa, por estar aún embebida con los otros biopolímeros, se observaron cambios en la superficie, dejándola más porosa (Figura 3.10d) y también, se lograron distinguir orificios (Figura 3.10d', flechas amarillas) los cuales fueron similares a los reportados por [107,114], como resultado de la acción enzimática. La caracterización estructural de las biomásas pretratadas corrobora la variabilidad del comportamiento entre cepas de la misma especie y, por tanto, estas modificaciones estructurales influyen en el proceso de obtención de los productos finales.

3.4.1. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LAS BIOMASAS PRETRATADAS EN FES

La hidrólisis enzimática de las biomásas pretratadas RHP y sin tratar (control), se observa en la Figura 3.11. El rendimiento de sacarificación para RHP sin tratar fue de 71.3%, mientras que las modificaciones estructurales y composicionales que se generaron en las biomásas pretratadas mediante FES, provocaron que la celulosa sea más susceptible al ataque enzimático e influyeron en la velocidad de la reacción de hidrólisis enzimática, permitiendo rendimientos de hasta 90.8% con la biomasa pretratada con la cepa *T. hirsuta* RT-1 y, 83.3% y 78.1% para las biomásas pretratadas con las cepas *T. hirsuta* Bm-2 y *T. hirsuta* AHB-6, respectivamente. Estos concuerdan con lo reportado por Baneerje y col. [5], que aseveran que la deslignificación contribuye al mejoramiento en la recuperación de azúcares reductores a partir de RHP.

La concentración de los azúcares reductores obtenidos a partir de RHP sin tratar fue de 0.33 g/g de biomasa, mientras que, en el caso de la biomasa pretratadas con FES, este contenido prácticamente se duplicó en todos los casos (Tabla 3.6). Las modificaciones en la biomasa RHP pretratada en fermentación en estado sólido con *T. hirsuta* Bm-2, provocó la mayor productividad de azúcar, entre las tres cepas, en las primeras 12 h, con una velocidad de reacción de 0.35 g L⁻¹h y se obtuvo al término de la sacarificación 580 mg/g de biomasa hidrolizada; esta concentración fue mayor a lo reportado para una biomasa pretratada de bagazo de sorgo dulce en FES con *Coriolius versicolor* [114].

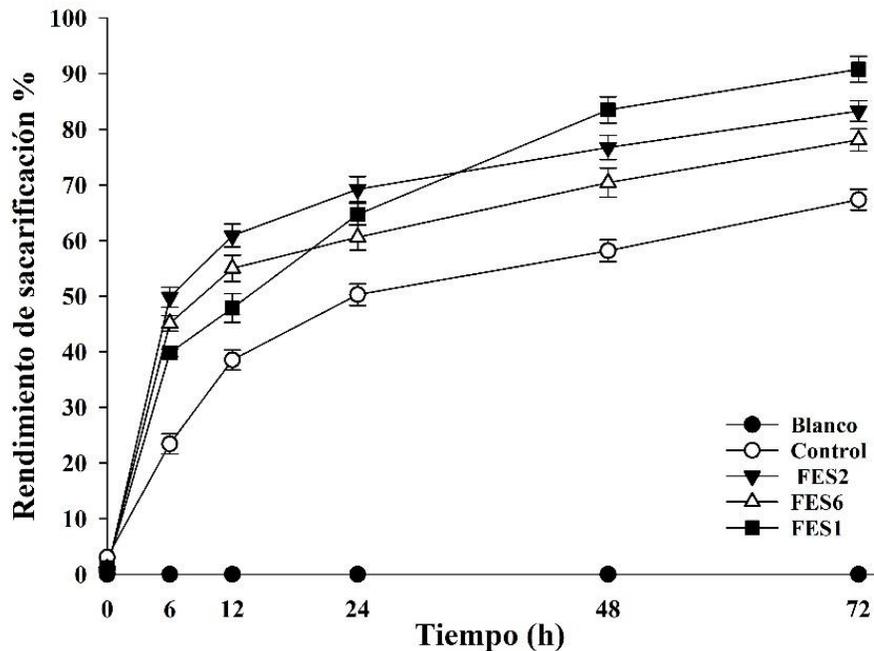


Figura 3.11. Rendimientos de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática, o sacarificación. Donde, Blanco es el control absoluto sin enzimas, Control es RHP sin tratar y, FES2, FES6 y FES1 son las biomásas pretratadas en FES con *T. hirsuta* Bm-2, *T. hirsuta* AHB-6, y *T. hirsuta* RT-1, respectivamente.

Moya y col. [111], quienes emplearon la técnica de biopulpeo para RHP con *T. versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, atribuyen a la selectividad de la batería enzimática de los hongos la podredumbre blanca, la recuperación de biomasa con mayores proporciones de celulosa por medio de la deslignificación, y que esto, promueve el incremento en los rendimientos de recuperación de azúcares fermentables.

La concentración de azúcar obtenida en la sacarificación de la biomasa pretratada en FES con *T. hirsuta* RT-1 fue similar a la reportada por Banerjee y col. [5], quienes alcanzaron a 502 mg/g de RHP pretratada, con una deslignificación previa del 80%. Este porcentaje de deslignificación es superior al alcanzado en FES con *T. hirsuta* RT-1 (28%), lo que es posible plantear la hipótesis de, que las modificaciones estructurales provocadas en FES tuvieron la suficiente influencia para mejorar el desempeño de la hidrólisis enzimática, sin la necesidad de alcanzar grandes tasas de deslignificación como el obtenido por Banerjee y col. [5].

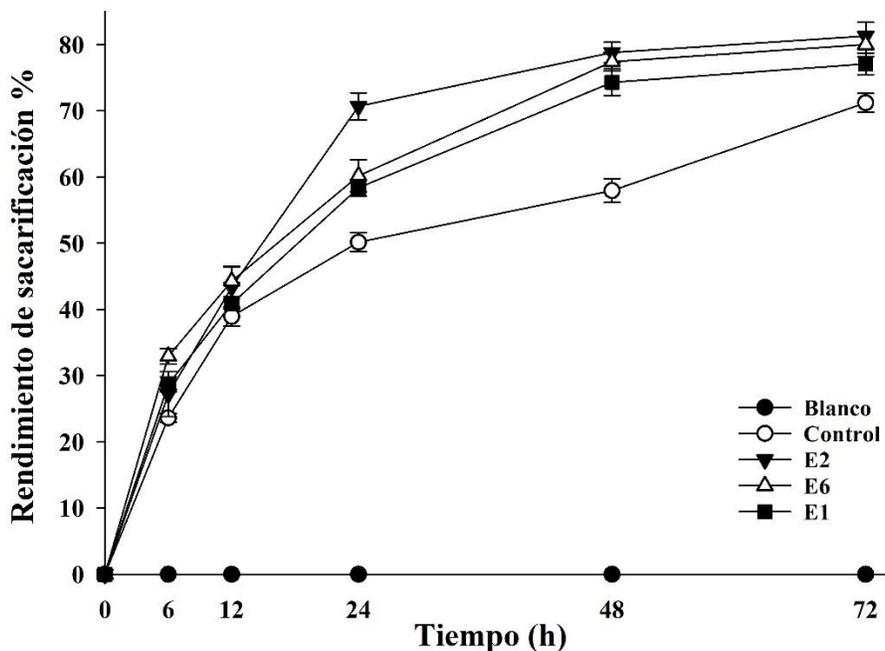


Figura 3.12. Rendimiento de azúcares en la hidrólisis enzimática, o sacarificación, de RHP sin tratar: hidrólisis enzimática convencional (control) e hidrólisis enzimática asistida con extractos enzimáticos de *T. hirsuta* Bm-2 (E2), *T. hirsuta* AHB-6 (E6), y *T. hirsuta* RT-1 (E1).

Con la hipótesis de que la batería enzimática de *T. hirsuta* excretada durante la FES provocó modificaciones en la biomasa que favorecieron al mejoramiento de los rendimientos en la sacarificación, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática asistida de RHP sin tratar con los extractos enzimáticos obtenidos a partir de FES con *T. hirsuta*. La adición de extractos crudos enzimáticos conduciría a los siguientes escenarios (Figura 3.12): Los extractos crudos enzimáticos no inhiben la acción de las celulasas comercial, puede ocurrir una posible aceleración de la reacción y se podrían mejorar los rendimientos de azúcares reductores.

Los rendimientos obtenidos por la adición de los extractos crudos enzimáticos en una hidrólisis enzimática asistida de una biomasa sin tratar, fueron solo un 10% más altos que en el control; sin embargo, las condiciones de reacción, como la temperatura y el pH, podrían optimizarse para un mejor desempeño sinérgico de las enzimas lacasas [86].

Es importante señalar que, aunque los valores de rendimiento fueron similares al control, se obtuvieron en períodos de tiempo de reacción más cortos, es decir, que en las primeras 24h el extracto crudo enzimático de *T. hirsuta* Bm-2 permitió alcanzar los niveles de azúcar reductor similares al control, mientras que con los otros dos extractos enzimáticos en ocurrió a las 48h (Figura 3.12).

Partiendo de esto, la hidrólisis enzimática asistida consistió en la adición de los extractos crudos enzimáticos obtenidos en FES, a la reacción de hidrólisis enzimática (sacarificación) de las biomásas pretratadas, de donde fueron producidos. Los rendimientos de azúcares reductores obtenidos después de 72 h bajo la hidrólisis enzimática asistida por hidrólisis enzimática se encuentran en la Tabla 3.6. Las cantidades de azúcares reductores aumentaron después de la adición de extractos crudos enzimáticos, hasta 2.5 veces cuando la biomasa y el extracto crudo enzimático de *T. hirsuta* AHB-6 fueron utilizados en comparación con los obtenidos de RHP sin tratar.

Tabla 3.6. Concentración de azúcares reductores (g/g de biomasa) de biomasa sin tratar y sólidos pretratados en FES a 35°C con cepas de *T. hirsuta*.

Biomasa	Hidrólisis enzimática (g/g de biomasa)	Hidrólisis enzimática asistida (g/g de biomasa)
RHP sin tratar	0.33 ± 0.01	-
FES con Bm-2	0.58 ± 0.01	0.75 ± 0.03
FES con AHB-6	0.54 ± 0.01	0.77 ± 0.04
FES con RT-1	0.50 ± 0.02	0.72 ± 0.08

Aunque en la hidrólisis enzimática asistida la velocidad de sacarificación a las 12h fueron similares a las de la hidrólisis enzimática convencional (0.37, 0.32 y 0.22 g L⁻¹h con *T. hirsuta* Bm-2, *T. hirsuta* AHB-6 y *T. hirsuta* RT-1, respectivamente), debido al efecto sinérgico entre las enzimas comerciales (celulasas) y el extracto enzimático crudo, los rendimientos máximos teóricos de sacarificación se alcanzaron a las 48 h con las biomásas pretratadas en FES con *T. hirsuta* Bm-2 y *T. hirsuta* AHB-6 (Figura 3.13).

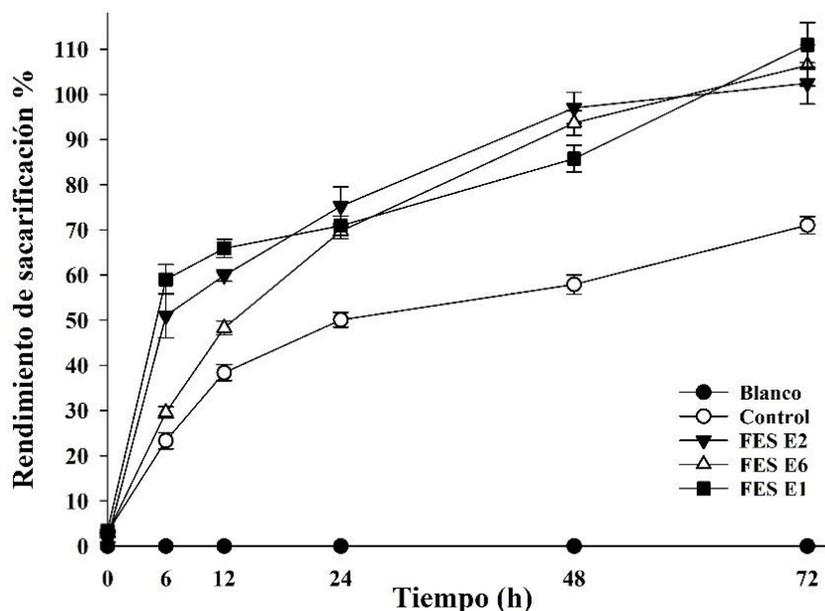


Figura 3.13. Rendimiento de la hidrólisis enzimática asistida de las biomásas pretratadas en FES con sus respectivos extractos enzimáticos: *T. hirsuta* Bm-2 (FES E2), *T. hirsuta* AHB-6 (FES E6), and *T. hirsuta* RT-1 (FES E1).

Las variaciones en el comportamiento cinético durante la hidrólisis enzimática asistida se pueden asociar a las modificaciones estructurales de cada biomasa pretratada, como se mencionó anteriormente. Particularmente, en el caso de la hidrólisis enzimática asistida de las biomásas pretratadas, las enzimas contenidas en el extracto crudo actuaron sinérgicamente con las celulasas, por lo que se produjo una reducción en la velocidad de reacción entre las 24 horas y las 48 horas (Figura 3.13). A las 72 h se obtuvieron los rendimientos teóricos máximos posibles de azúcares reductores y las fracciones líquidas obtenidas de la hidrólisis enzimática asistida fueron analizadas para determinar los perfiles de carbohidratos (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Porcentaje de carbohidratos obtenidos en la hidrólisis enzimática asistida con extractos enzimáticos crudos en base a los azúcares reductores totales (% p/p).

Biomasa hidrolizada	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Celobiosa
FES con Bm-2	14.99 ± 0.23	1.01 ± 0.07	77.08 ± 1.01	6.92 ± 0.78
FES con AHB-6	17.01 ± 0.09	0.06 ± 0.01	79.5 ± 1.28	3.47 ± 0.29
FES con RT-1	38.65 ± 0.27	0.10 ± 0.03	61.34 ± 1.06	0.01 ± 0.00

En la hidrólisis asistida de la biomasa pretratada en FES con *T. hirsuta* AHB-6 se obtuvo el mayor contenido de glucosa (79.5%), incluso al reportado por Chintagunta y col. [22] a pesar de que estos autores emplearon enzimas purificadas de xilanasas-celulasas en hidrólisis asistida, además, ellos también obtuvieron un 39% de celobiosa, como resultado de una hidrólisis incompleta, porcentaje superior a los obtenidos en este estudio. Particularmente, con la hidrólisis enzimática asistida de los sólidos pretratados en FES con *T. hirsuta* RT-1 se alcanzaron altos porcentajes de azúcares reductores: xilosa (38.6%) y glucosa (61.3%), junto a una casi nula presencia de celobiosa, lo que significa la concentración de azúcar reductor obtenida (0.72 g/g biomasa) corresponden a una sacarificación prácticamente completa de la biomasa, que inicialmente contenía 49.9% de celulosa y 29.5% de hemicelulosa. En este sentido, debido a que los porcentajes obtenidos para cada carbohidrato, correlacionados con la composición de cada biomasa pretratada en FES, se sugiere que los extractos enzimáticos crudos contenían enzimas accesorias, incluyendo hemicelulolíticas que permitieron la sacarificación de la holocelulosa completa.

Algunas especies de hongos de la podredumbre blanca tienen la capacidad de excretar complejos enzimáticos que permiten la degradación total de la biomasa lignocelulósica [25] y en el caso específico de *T. hirsuta* existen reportes de su capacidad de producción de enzimas xilanasas [115].

Dado que los extractos crudos enzimáticos influyeron en la mejora de la sacarificación y que, durante la FES no se detectaron azúcares reductores cuantificables en la fracción líquida recuperada, se puede sugerir que la activación enzimática depende de la superficie de contacto y la composición del sustrato. En la reacción de sacarificación asistida de la biomasa de RHP sin tratar, actuaron las enzimas necesarias para el ataque de la lignina (primera barrera superficial), provocando una ligera mejora en la susceptibilidad de la celulosa, mientras que en el caso de las biomásas pretratadas en FES, se permitió la activación de enzimas hemicelulolíticas debido a modificaciones en la superficie de contacto y, por tanto, se facilitó una recuperación total de azúcares reductores de hemicelulosa y celulosa.

En efecto, bajo el concepto de biorrefinería, la FES es una de las tecnologías más importantes para la obtención de productos que permitirán satisfacer necesidades futuras [116], tales como la producción de enzimas, metabolitos secundarios, antioxidantes y proteínas. Por lo tanto, en este enfoque, la implementación de la tecnología FES con *T. hirsuta* sobre residuos agroindustriales, como los residuos de hojas de piña, permite la producción económica de enzimas ligninolíticas con papeles importantes en procesos biotecnológicos, como la eliminación

de compuestos tóxicos, y de enzimas hemicelulolíticas que permiten la sacarificación completa de holocelulosa, en combinación con celulasas comerciales.

3.5. PRETRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS

La caracterización composicional de los sólidos recuperados de cada pretratamiento se encuentra en la Tabla 3.8, a grandes rasgos se puede apreciar que la hemicelulosa se solubilizó más, conforme el pretratamiento fue más severo. El porcentaje más bajo de hemicelulosa obtenido en los sólidos recuperados fue de 0.96% (p/v) con el pretratamiento a 180 °C/ 10min ($[\log R_0]= 3.73$). La reducción de la hemicelulosa obtenida en este trabajo son comparables con lo reportado por Cherian y col. [48], quienes con explosión de vapor alcanzaron la desfibrilación de hojas de piña, obteniendo así, de una red de las nanofibras de celulosa, estos autores aplicaron 20 lbf/ft² durante una hora previo a la descompresión, lo que redujo el contenido de hemicelulosa en los sólidos recuperados hasta 0.56% (p/p), para después llevar a cabo un blanqueado con NaOH, aunque cabe señalar que la composición porcentual de la hemicelulosa previo a pretratamiento es dos veces mayor a lo obtenido en este trabajo.

Inicialmente, la biomasa RHP inmersa en agua, previo a los pretratamientos, tenía un pH de 6.2 ± 0.4 y al término de los pretratamientos se registró una disminución, como se observa en la tabla de resultados, el pH disminuye conforme la severidad del pretratamiento es mayor ($\log R_0$). La acidificación de los hidrolizados se debe a la formación de los ácidos orgánicos durante la autohidrólisis, producto de la interacción de los iones hidronio (H_3O^+) con los grupos acetyl de la hemicelulosa [54].

Los resultados muestran ligeras variabilidades en la caracterización composicional con respecto al incremento de la severidad del pretratamiento, tanto en los hidrolizados directos (fracción líquida) y de la fracción sólida recuperada, un ejemplo es que el mayor porcentaje de celulosa recuperada fue en el pretratamiento de 180 °C/ 25min ($[\log R_0]= 3.93$), aunque el pretratamiento más severo fue el de las condiciones de 180 °C/ 40min ($[\log R_0]= 4.12$); se ha reportado que la degradación de la celulosa cristalina se lleva a cabo con temperaturas mayores de 250 °C [117], por lo que es probable que la ligera disminución de este polímero en el pretratamiento más severo, se encuentre asociado con la ligera degradación de la celulosa amorfa, además, entre estos dos pretratamientos, con el más severo, la fracción sólida se registró una ligera disminución de la lignina.

Tabla 3.8. Caracterización fisicoquímica de la fracción sólida y líquida recuperada después de los pretratamientos hidrotérmicos.

Condición de Operación	160 °C	170 °C	180 °C	160 °C	170 °C	180 °C	160 °C	170 °C	180 °C
	10min	10min	10min	25min	25min	25min	40min	40min	40min
	5.01 Kg/cm ²	7.2 Kg/cm ²	8.7 Kg/cm ²	5.01 Kg/cm ²	7.2 Kg/cm ²	8.7 Kg/cm ²	5.01 Kg/m ²	7.2 Kg/cm ²	8.7 Kg/cm ²
Log R _o	3.63	3.67	3.73	3.87	3.90	3.93	4.06	4.07	4.12
Fracción sólida									
Celulosa %	35.89 ± 0.18	43.59 ± 3.45	48.97 ± 3.55	39.53 ± 0.40	45.24 ± 0.85	53.77 ± 1.75	42.71 ± 1.40	45.36 ± 1.32	49.34 ± 1.41
Hemicelulosa %	7.72 ± 0.41	7.61 ± 0.30	0.96 ± 0.83	6.89 ± 0.30	6.32 ± 0.26	2.58 ± 0.57	6.99 ± 1.49	4.66 ± 0.22	4.82 ± 0.75
Lignina %	28.70 ± 0.49	36.97 ± 1.01	39.97 ± 2.84	31.58 ± 0.71	33.30 ± 0.53	37.53 ± 3.12	31.94 ± 1.71	35.05 ± 1.08	33.41 ± 1.34
Fracción líquida									
pH	4.23 ± 0.04	4.17 ± 0.03	4.03 ± 0.01	4.06 ± 0.01	4.04 ± 0.01	3.85 ± 0.02	4.01 ± 0.01	3.99 ± 0.03	3.93 ± 0.06
Glucosa (g/L)	2.16 ± 0.13	2.37 ± 0.19	2.49 ± 0.09	2.43 ± 0.07	2.19 ± 0.02	2.61 ± 0.05	2.67 ± 0.03	2.10 ± 0.01	2.37 ± 0.08
Xilosa (g/L)	3.83 ± 0.07	6.59 ± 0.11	10.05 ± 0.04	6.41 ± 0.03	8.34 ± 0.013	13.24 ± 0.07	9.72 ± 0.06	10.42 ± 0.12	12.19 ± 0.04
Arabinosa (g/L)	0.90 ± 0.03	0.94 ± 0.07	0.94 ± 0.02	1.18 ± 0.02	1.14 ± 0.01	0.83 ± 0.00	1.19 ± 0.01	0.81 ± 0.07	0.53 ± 0.06
Glucooligómeros (g/L)	2.08 ± 0.18	2.22 ± 0.15	2.14 ± 0.15	2.32 ± 0.29	1.91 ± 0.32	2.19 ± 0.15	2.54 ± 0.02	2.08 ± 0.04	1.73 ± 0.15
Xilooligómeros (g/L)	3.25 ± 0.20	4.66 ± 0.40	4.57 ± 0.18	5.83 ± 0.20	7.64 ± 0.20	13.03 ± 0.84	9.08 ± 0.34	9.24 ± 0.33	11.94 ± 0.44
Arabinoooligómeros (g/L)	0.63 ± 0.02	0.39 ± 0.21	0.34 ± 0.02	0.79 ± 0.21	0.44 ± 0.36	0.01 ± 0.15	0.71 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Ácido fórmico (g/L)	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.51 ± 0.03	1.14 ± 0.03	0.41 ± 0.01	0.00 ± 0.00	1.26 ± 0.01	1.30 ± 0.03
Ácido Levulínico (g/L)	0.35 ± 0.02	0.65 ± 0.02	1.02 ± 0.03	0.55 ± 0.03	1.79 ± 0.02	2.29 ± 0.03	0.91 ± 0.02	2.91 ± 0.06	3.50 ± 0.05
HMF (g/L)	0.00 ± 0.00	0.39 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.50 ± 0.02	1.01 ± 0.03	0.97 ± 0.01	0.00 ± 0.00	1.25 ± 0.01	1.18 ± 0.02
Furfural (g/L)	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.23 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.51 ± 0.01	1.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.96 ± 0.03	1.56 ± 0.02

HMF: 5-Hidroximetil furfural

Debido a sus propiedades viscoelásticas y enlaces fuertes, que lo hacen altamente recalcitrante, es posible despolimerizar la lignina a partir de 200 °C [117,118], sin embargo, también se ha comprobado que esta resistencia puede ser variable dependiendo del cultivo, lo que puso haber ocurrido en este caso. La lignina proporciona soporte y hace más resistente a una especie vegetal, sin embargo, los tipos de monolignoles, proporción y distribución le confieren características particulares, de este modo pueden darse casos de biomasa provenientes de árboles leñosos que requieran una temperatura más baja para la degradación de su lignina, en comparación con la requerida para la degradación de la lignina de algún pasto [32,118].

En la caracterización de los hidrolizados directos (fase líquida obtenida de cada pretratamiento hidrotérmico), Tabla 3.8, se observa el incremento en la concentración de los oligómeros de carbohidratos, con respecto a la severidad del pretratamiento, sin embargo, a partir de un factor de severidad de $[\log R_0] = 3.93$, donde se obtuvo hasta 13 g/L de xilooligosacáridos, así como de xilosa, esta tendencia comienza a ser variable por el incremento en los grados de descomposición, al igual que se observa variabilidad en concentración de los compuestos de degradación, los cuales se derivan de los primeros.

La concentración de 5-hidroximetil furfural (HMF) en el hidrolizado fue de 1.25 g/L, éste se genera a partir de la degradación de monómeros de carbohidratos de 6 carbonos, tanto de hemicelulosa como de celulosa [119] y, dado que la concentración de glucosa y glucooligómeros no disminuyó considerablemente conforme incrementó la presencia de HMF, es posible considerar que la celulosa fue afectada de forma significativa. La concentración de furfural bajo estas condiciones fue de 0.96 g/L, el cual fue generado a partir de las reacciones de degradación de las pentosas [58], por lo que a este grado de descomposición ocurre una descomposición de los carbohidratos provenientes de la hemicelulosa previamente solubilizada.

Los ácidos orgánicos se derivan de la continua degradación de los compuestos comprendidos en los polímeros de celulosa y hemicelulosa, principalmente del furfural e hidroximetil furfural generados en las primeras reacciones de la autohidrólisis [58,119]. Bajo las condiciones de los pretratamientos evaluados para RHP, las concentraciones más altas de ácido fórmico (1.3 g/L) y de ácido levulínico (3.5 g/L) se encontraron en el hidrolizado directos del pretratamiento de 180 °C/ 40min ($[\log R_0] = 4.12$), al tener el mayor grado de degradación.

Con la finalidad de obtener una biomasa lignocelulósica con la celulosa más susceptible, el proceso de los pretratamientos hidrotérmicos se basa principalmente en la despolimerización de la hemicelulosa, sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la biomasa y la severidad puede ocurrir una afectación física y composicional de la celulosa. Por tal motivo, de acuerdo con los resultados obtenidos, el pretratamiento con factor de severidad más alto fue descartado al

disminuir el porcentaje de celulosa, y se seleccionó el pretratamiento 180 °C/ 25min ($[\log R_0]=3.93$) para continuar con la etapa de hidrólisis enzimática.

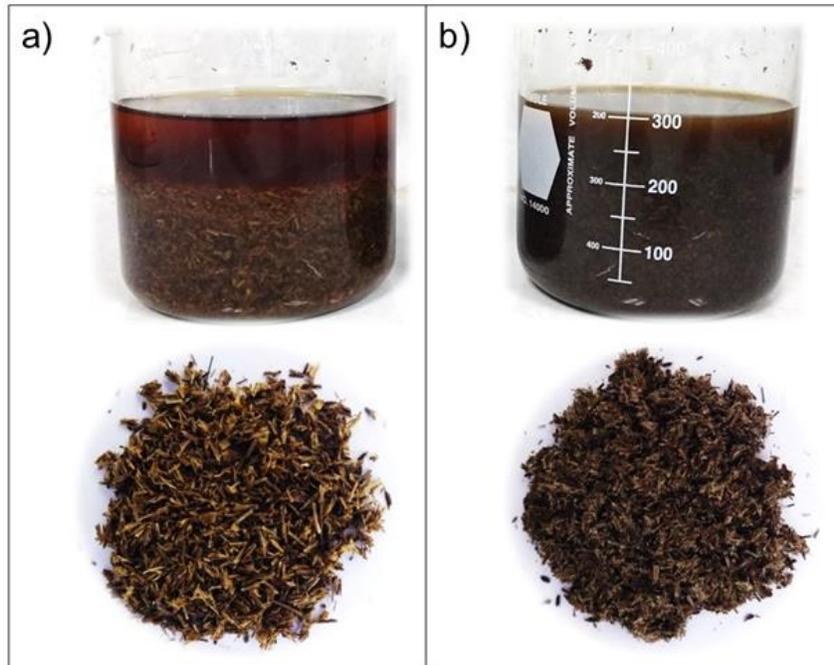


Figura 3.14. Residuos de hojas de piña sumergidos en agua, a) antes del pretratamiento hidrotérmico y b) después del pretratamiento hidrotérmico 180 °C/ 25min ($[\log R_0]=3.93$).

En la Figura 3.14a, se observa que previo al pretratamiento las partículas de RHP estaban bien definidas, de color beige a marrón claro y con escasas líneas verdes muy tenues, que al estar sumergidas en agua se encuentran compactas hasta el fondo del recipiente y el líquido era traslucido. Por otro lado, los cambios provocados por el pretratamiento hidrotérmico fueron notoriamente visibles (Figura 3.14b), la fibra hidrolizada se encontraba expandida dentro del hidrolizado directo de color café oscuro. Una vez filtrada, lavada con agua destilada y seca, la biomasa pretratada estaba claramente fragmentada y expandida aéreamente, de color café oscuro con muy pequeñas tonalidades beige como se observa en Figura 3.14b.

El cambio de color en la biomasa observado fue provocado por el pretratamiento, debido a las reacciones de Maillard y de caramelización, ambas son reacciones químicas de pardeamiento, el primero por una condensación de grupos carbonilo en azúcares reductores con grupos amino en péptidos, proteínas y aminoácidos, mientras que la caramelización implica tanto la isomerización como la degradación de los azúcares. Estas reacciones están fuertemente influenciadas por la temperatura (mayores de 80 °C), duración del calentamiento, el contenido de agua, pH y la relación azúcar/aminoácido según sea el caso [90,120].

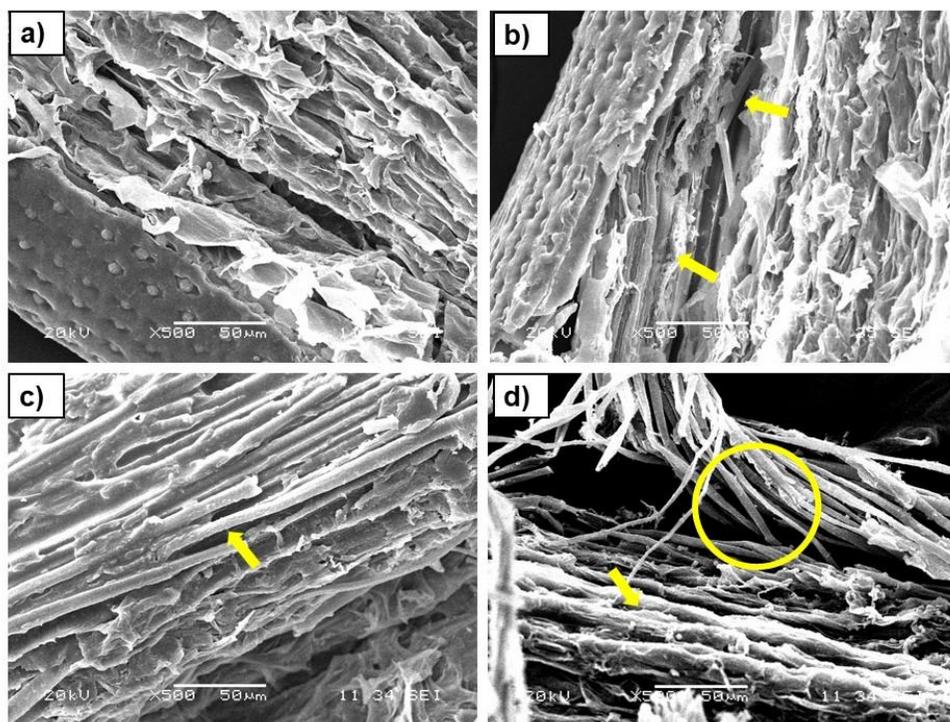


Figura 3.15. Micrografías de RHP sin tratar (a) y biomásas de los pretratamientos hidrotérmicos: b) menos severo ($[\log Ro]= 3.63$), c) bajo las condiciones de $180\text{ °C}/25\text{min}$ ($[\log Ro]= 3.93$) y d) el más severo $[\log Ro]= 4.12$.

Las modificaciones causadas por los pretratamientos difieren de acuerdo con la agresividad del mismo. En la Figura 3.15a se observa la biomasa sin tratar de RHP, que está compuesta por una matriz compleja, que presenta superficie rugosa incrustadas en sí, unas esferas que consisten en lignina acumulada. Con el pretratamiento menos severo $[\log Ro]= 3.63$ ($160\text{ °C}/10\text{min}$), la biomasa quedó fisurada de modo que permitió visualizar la celulosa (flechas amarillas) y con la superficie casi intacta (Figura 3.15b).

Algunos autores han extraído la celulosa de RHP a partir de procesos exhaustivos, obteniendo unos túbulos con diámetros de $10\text{-}15\text{ }\mu\text{m}$ perfectamente acomodados linealmente [48,99]. Con el pretratamiento de $180\text{ °C}/25\text{min}$ ($[\log Ro]= 3.93$), se observó una superficie rugosa, agrietada y con algunas zonas con orificios, característicos de este pretratamiento hidrotérmico [121,122], fue posible observar los túbulos de la celulosa aun ligeramente embebida (Figura 3.15c, flecha amarilla), ésta modificación fue similar a lo reportado por Nashiruddin y col. [123], quienes sometieron fibra de hojas de piña (libres de corteza) a un pretratamiento térmico-alcálico (NaOH al 2% p/v, 85 °C , 1h).

Con el pretratamiento más severo ($[\log Ro]= 4.12$) se observó una modificación estructural muy considerable, en la Figura 3.15d se observa una biomasa fracturada, con la celulosa totalmente expuesta (círculo amarillo) y con la superficie de la lignina rugosa y plegada (flecha amarilla) causados por la expansión y relajación volumétrica provocada por el aumento y disminución de la temperatura [124].

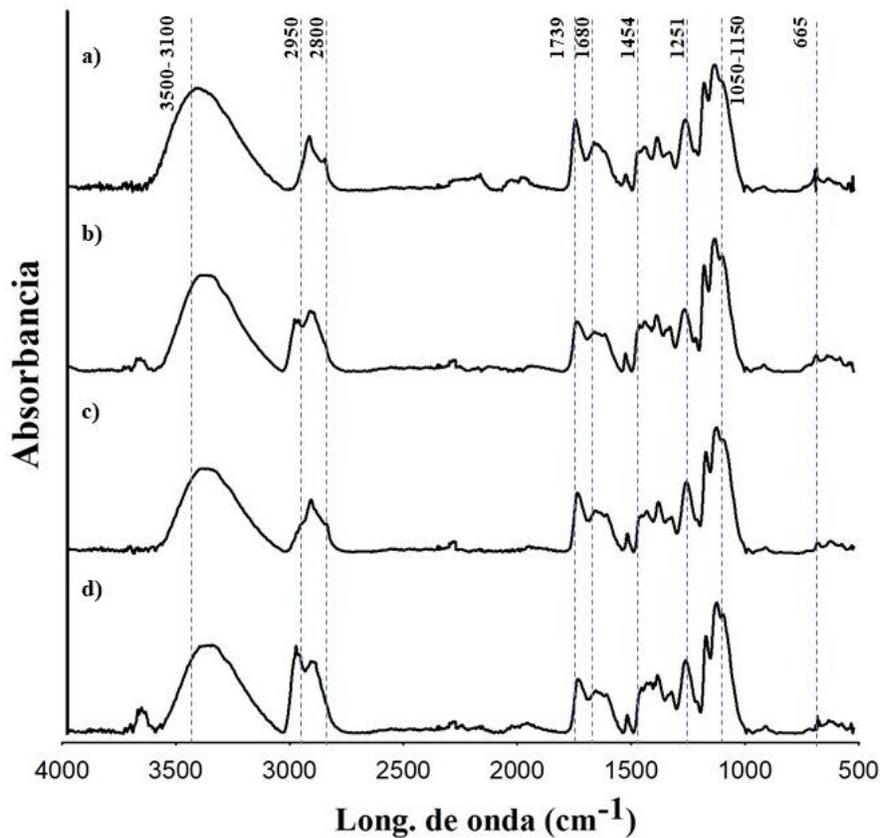


Figura 3.16. Espectros FT-IR de RHP sin tratar (a) y biomásas de los pretratamientos hidrotérmicos: b) menos severo ($[\log Ro]= 3.63$), c) el más severo ($[\log Ro]= 4.12$) y d) bajo las condiciones de 180 °C/25min ($[\log Ro]= 3.93$).

Los espectros FT-IR de RHP sin tratar y RHP después del pretratamiento menos severo, el más severo y del pretratamiento de 180 °C/25min se encuentran en la Figura 3.16. En los espectros de las biomásas pretratadas se observó una disminución en el pico de absorbancia en la región 3600-3100 cm^{-1} asociada a las señales de estiramiento del grupo funcional HO correspondiente a la celulosa, hemicelulosa y lignina.

En la región 2950-2800 cm^{-1} , se registran señales de vibración de estiramiento CH de (celulosa y lignina) y grupos metoxilo de anillos fenólicos presentes en la lignina [21,125], la modificación

por efecto de los pretratamientos en esta región son muy marcados, en el espectro del pretratamiento 180 °C/25min las absorbancias de estos picos son mayores (Figura 3.16d) en comparación con RHP sin tratar (Figura 3.16a) y el pretratamiento menos severo (Figura 3.16b); por otro lado, con el pretratamiento más severo la señal en esta región es menor y menos definida (Figura 3.16c), por lo que, aunque en la micrografía se observa una mayor exposición de la celulosa, estos resultados apoyan la hipótesis planteada a partir del análisis composicional de que bajo estas condiciones existe una degradación o afectación estructural considerable de la celulosa.

En los espectros de las biomásas pretratadas se observó disminución con respecto al control, en las señales de la vibración de estiramiento C=O de los grupos acetilo correspondiente a la hemicelulosa y pectina reportadas en 1739 cm^{-1} y 1680 cm^{-1} , respectivamente [86,113].

La región 1454-1050 cm^{-1} está asociada a la estructura de los carbohidratos, principalmente a estiramiento asimétrico C-O-C de celulosa y hemicelulosa, en esta región se observan alteraciones en los espectros de las biomásas pretratadas en comparación con RHP sin tratar. Otro cambio estructural observado en los espectros de las biomásas pretratadas fue en las señales a 1251 cm^{-1} identificados como señales de ensanchamiento del siringilo de lignina y así como el estiramiento de CO de xilano (hemicelulosa) [86]. La caracterización estructural nos permite comprobar la integridad de la biomasa a someter a hidrólisis enzimática.

3.5.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA PRETRATADA

El comportamiento de la hidrólisis enzimática de la biomasa RHP pretratada con 180 °C/25min ([logRo]= 3.93) se observa en la Figura 3.17. La extracción de la hemicelulosa y las modificaciones estructurales originadas por el pretratamiento, permitieron que las celulasas actuaran efectivamente sobre la biomasa, alcanzando así el 100% rendimiento posible a las 72 h a diferencia de la biomasa sin tratar, con la que se alcanzó 71.3%. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con una carga de trabajo del 1% (p/v) de celulosa, ya que es lo recomienda como primera evaluación de la susceptibilidad adquirida después del pretratamiento [126]. La carga de trabajo fue llevada hasta 3% (p/v) de celulosa, como se observa en la gráfica de la Figura 3.17, también se alcanzó 100% de rendimiento sacarificación a las 72 h, el comportamiento fue distinto entre las 24-48 h, probablemente por la adaptación de las enzimas por el aumento de la carga de sólidos. Como se mencionó anteriormente, los sólidos recuperados del pretratamiento presentaron una expansión volumétrica, por lo que el incremento en las cargas de sólidos para llevar a cabo una hidrólisis a nivel de matraces Erlenmeyer es complejo. Actualmente, una de las

metas a alcanzar, es llevar a cabo la hidrólisis enzimática con cargas de trabajo elevadas (hasta el 20%), por lo que es importante contar con reactores especiales que permitan alcanzar estos objetivos [127].

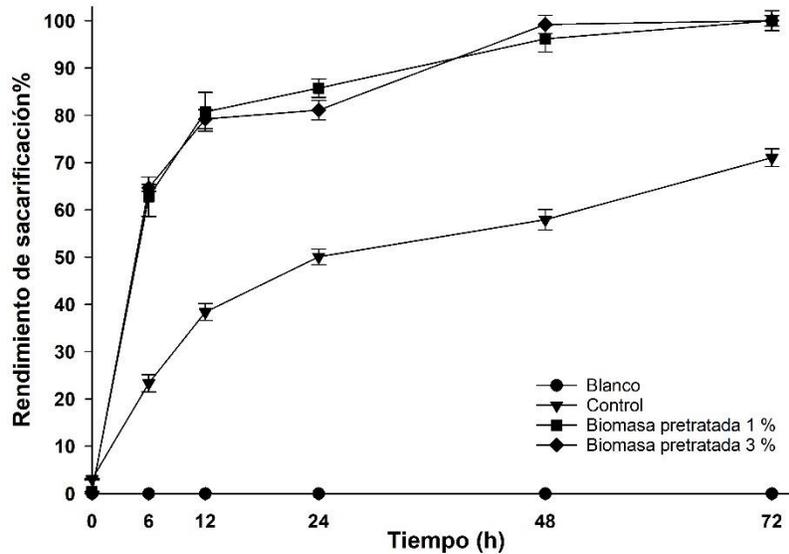


Figura 3.17. Rendimientos de la hidrólisis enzimática con cargas de sólidos de 1 y 3% (p/v) de RHP pretratadas con autohidrólisis. El blanco es en control absoluto y el control es RHP sin tratar, ambos con una carga de sólidos del 1% (p/v).

Mientras que, con la hidrólisis enzimática de la biomasa sin tratar la concentración de azúcares reductores obtenidos de 0.33 g por cada gramo de biomasa hidrolizada, con la biomasa pretratada por autohidrólisis se alcanzó casi el doble de concentración hasta 0.56 y 0.57 g/g de biomasa hidrolizada con 1 y 3% (p/v) de celulosa respectivamente (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Rendimientos de azúcares reductores (g/g de biomasa), a partir de la biomasa sin tratar y sólidos pretratados con autohidrólisis a 180 °C/25min ([logRo]= 3.93)

Biomasa	Hidrólisis enzimática (g/g de biomasa)
RHP sin tratar	0.33 ± 0.01
1 % (p/v) RHP pretratada	0.57 ± 0.01
3 % (p/v) RHP pretratada	0.56 ± 0.02

Las concentraciones obtenidas fueron similares a las reportadas por Banerjee y col. [5], quienes obtuvieron 502 mg/g de biomasa con hojas de piña pretratadas con enzimas lacasas, y mayores a los reportados por Nashiruddin y col. [123], quienes obtuvieron 0.183 y 0.093 g/g, a partir de hojas de piña pretratadas con ácido diluido (0.5 % v/v de H₂SO₄, 80 °C, 60 min) y térmico (100 °C, 90 min).

Con la finalidad de reducir los tiempos de la hidrólisis enzimática, se adicionaron esta fase extractos crudos enzimáticos que previamente se han comprobado que tienen la capacidad de actuar sinérgicamente con la CellicCetec3®. Sabiendo que la biomasa obtenida del pretratamiento hidrotérmico está compuesta de celulosa y lignina principalmente, se seleccionaron los extractos crudos de *T. hirsuta* RT-1 (E1) y *T. hirsuta* AHB-6 (E6) obtenidos a partir de fermentación en estado sólido, ya que causaron el mayor porcentaje de deslignificación de RHP durante su obtención. Además, cuando una biomasa que ha sido sometida a procesos que fragmentaron los enlaces entre los biopolímeros o las uniones entre sus monómeros, por lo general siempre se liberan residuos de éstos compuestos, como antioxidantes y cromóforos en el caso de la lignina [128].

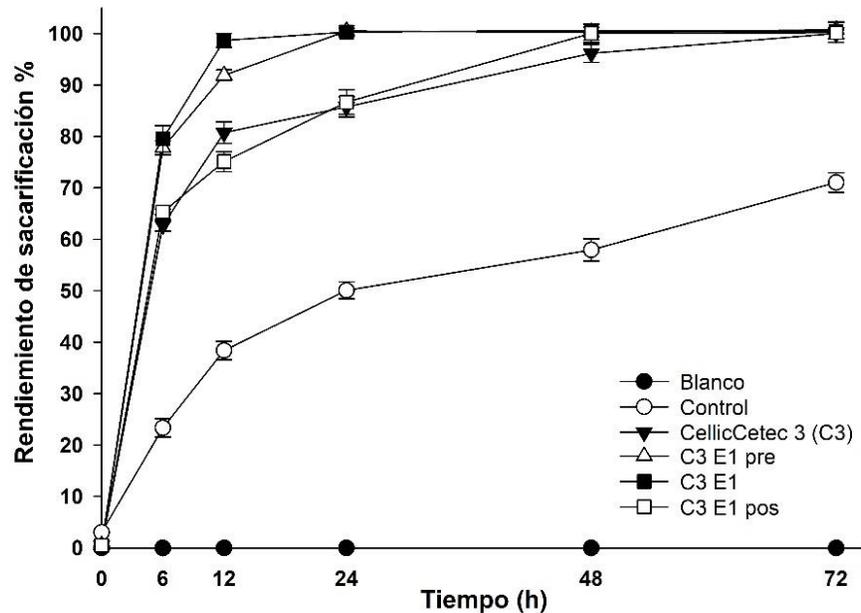


Figura 3.18. Rendimientos de hidrólisis enzimática asistida con cargas de sólidos de 1% (p/v) de la biomasa pretratada. Donde, C3 E1 pre, C3 E1 y C3 E1 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de *T. hirsuta* RT-1 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.

En la Figura 3.18 se observa el desempeño de la hidrólisis enzimática con extracto enzimático de *T. hirsuta* RT-1, el 100% de rendimiento de sacarificación se alcanza a las 48 h al añadir el extracto enzimático E1 posteriormente a la Cellic Cetec3, mientras que añadirlo previamente estos rendimientos se alcanzan a las 24 h de incubación, no obstante, cuando la adición es simultánea los tiempos de sacarificación pueden reducirse hasta las 12 h. Esto nos sugiere que no existe competencia ni inhibición entre las enzimas, principalmente cuando las enzimas son añadidas simultáneamente.

Como se observa en la Figura 3.19, al despolimerizar celulosa de la biomasa pretratada por autohidrólisis se liberó hasta 8 mg de compuestos fenólicos por gramo de biomasa en una hidrólisis enzimática convencional (sin extractos crudos enzimáticos). En hidrólisis enzimática asistida con E1, ocurrió una variación en la liberación y reducción de estos compuestos por acción de las enzimas lacasas debido a la variación en los tiempos de adición del extracto enzimático, ya que, las lacasas actúan sobre la lignina, dejando más accesible la celulosa, por lo que permitió una aceleración en la reacción de sacarificación con reducción en los tiempos de este proceso [63,64].

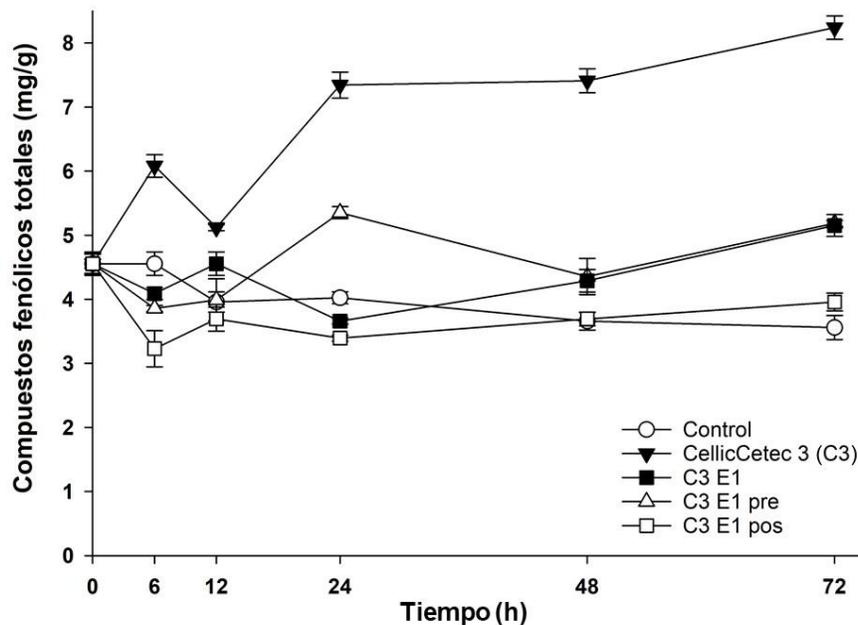


Figura 3.19. Comportamiento de la liberación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática asistida. Donde C3 E1 pre, C3 E1 y C3 E1 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de *T. hirsuta* RT-1 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.

A diferencia, en la hidrólisis enzimática asistida con E6 (Figura 3.20), la velocidad de reacción fue relativamente similar, alcanzando el 100% de rendimiento a las 24h en los tres casos (C3 E6 pre, C3 E6 y C3 E6 pos), así mismo, en los comportamientos de liberación de compuestos fenólicos, las variaciones no fueron tan notorias (Figura 3.21), como ocurrió con la hidrólisis asistida con el extracto enzimático de *T. hirsuta* RT-1. Aunque el extracto enzimático de *T. hirsuta* RT-1 tenía una actividad de 1915 U/mL, menor al del extracto enzimático de *T. hirsuta* AHB-6 (3268 U/mL), es probable que exista una variabilidad en las isoenzimas que produce el hongo, lo que le permitió asociarse a diversos componentes de la lignina, limitando así la generación inhibitorios en la hidrólisis enzimática asistida, del mismo modo que causó una mayor deslignificación en FES.

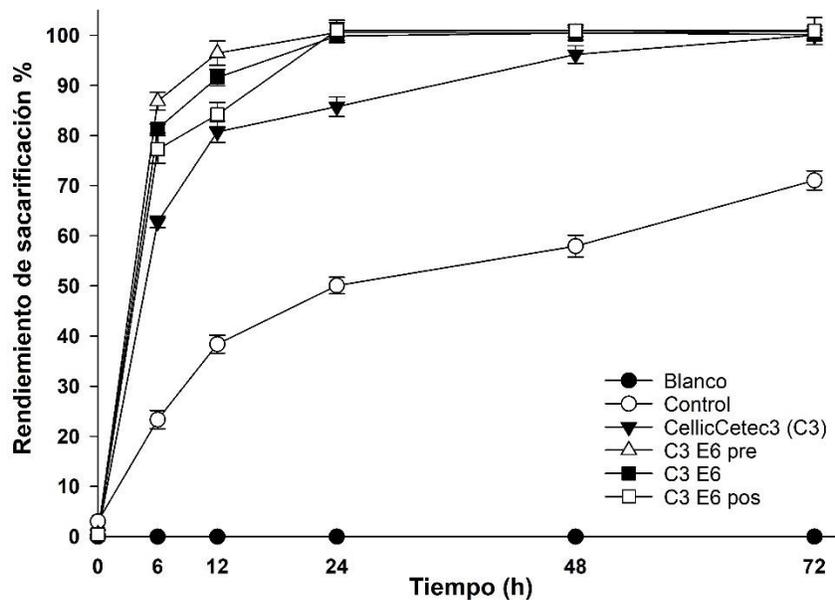


Figura 3.20. Rendimientos de hidrólisis enzimática asistida con cargas de sólidos de 1% (p/v) de la biomasa pretratada. Donde, C3 E6 pre, C3 E6 y C3 E6 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de *T. hirsuta* AHB-6 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.

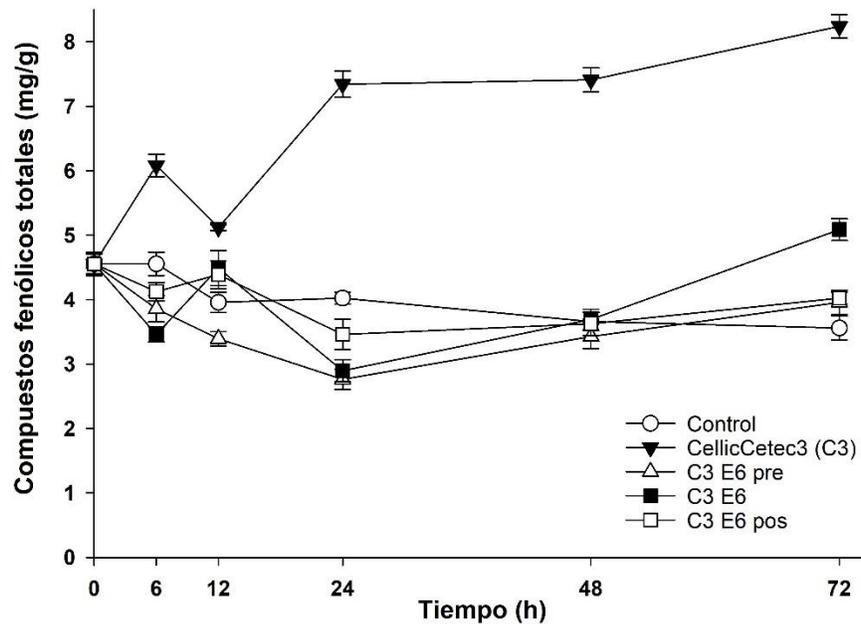


Figura 3.21. Comportamiento de la liberación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática asistida. Donde C3 E6 pre, C3 E6 y C3 E6 pos es, la hidrólisis asistida con extracto crudo enzimático de *T. hirsuta* AHB-6 añadido 3 horas antes, simultáneamente y 3 horas después de la adición de CellicCetec3®, respectivamente.

Aunque los extractos enzimáticos fueron producidos por hongos de la especie *T. hirsuta* pueden existir variabilidad entre sus isoenzimas y con desempeños diferentes los hongos tienen diferente origen. En la hidrólisis enzimática convencional, se demostró que los compuestos derivados de la lignina liberados durante la sacarificación no inhiben a la CellicCetec3®, sin embargo, existe evidencia que afectan potencialmente la función de levaduras fermentativas y que la reducción de estos compuestos fenólicos en esta etapa con lacasas mejora la eficiencia de levaduras fermentativas como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* [58,129,130].

Por otro lado, la búsqueda de estrategias de extracción y purificación de estos compuestos fenólicos, permitiría más ampliamente la valorización de los residuos. En el hidrolizado directo obtenidos del pretratamiento hidrotérmico 180 °C/25 min se cuantificó la concentración de compuestos fenólicos, y se obtuvo 0.6 mg/mL. Esta concentración se aproxima a la obtenida por Sepúlveda y col. [131], quienes obtuvieron 0.7 mg/mL a partir de un proceso hidrotérmico (175 °C/15 min) de residuos del cultivo de piña, los cuales fueron identificados como compuestos de alto valor agregado como antioxidantes, antimicrobianos y ácido ferúlico.

Otros compuestos que han sido señalados también inhibidores en la etapa de fermentación, son los furfurales e hidroximetil furfurales, no obstante, estos son de gran importancia para la elaboración de disolventes, plásticos, resinas y aditivos para combustibles [132], por lo que al

recuperarlos en la fracción líquida, separando de la celulosa, es posible su extracción y disposición como compuestos de valor agregado bajo el concepto de biorrefinería.

Además, existen microorganismos capacitados como *Rhodosporidium toruloides* que pueden asimilar los furfurales, estas levaduras pueden adaptarse a sustratos de que contienen hidrolizado directo hidrotérmico a partir de bagazo de caña con concentraciones de 0.2 g/L HMF y 1.7 g/L furfural, asimilando la xilosa como fuente de carbono, para la producción de ácidos grasos [58]. De este modo, el hidrolizado directo puede ser aprovechado como sustrato para la producción de otros compuestos.

Considerando las características y el valor de los compuestos generados durante el proceso hidrotérmico, el pretratamiento 180 °C/25min ($[\log R_o]= 3.93$) seguido de una hidrólisis enzimática asistida con E1 para mejorar la eficiencia en la etapa de fermentación, es una vía apropiada para la producción de bioetanol de segunda generación.

En este trabajo, se lograron rendimientos del 100% de recuperación de azúcares en hidrólisis enzimática con biomasa pretratada hidrotérmicamente (180 °C/25min), por otro lado, una hidrólisis enzimática asistida abre la oportunidad de recuperar el 100% de los azúcares fermentables de la holocelulosa al término de un pretratamiento por FES con *T. hirsuta*. Además, la implementación de una hidrólisis enzimática permite la reducción en los tiempos de sacarificación de biombras pretratadas en FES y biombras pretratadas por autohidrólisis, a 24 h y 12 h de incubación. En este sentido, con ambos pretratamientos es posible extraer eficientemente los azúcares fermentables. Finalmente, dado que los pretratamientos son diferentes, a fin de tener una mayor tolerancia de los subproductos generados en la etapa de hidrólisis enzimática, es necesario plantear como perspectiva una evaluación y caracterización más exhaustivas de las levaduras obtenidas de RHP para seleccionar la o las levaduras que permitan alcanzar los máximos rendimientos teóricos en producción de etanol.

CONCLUSIONES

- La microbiota aislada de hojas de piña estuvo constituido de bacterias y hongos endófitos incapaces de excretar enzimas lacasas y celulasas.
- El mayor porcentaje de deslignificación en fermentación en estado sólido (FES) fue 28.4% con *T. hirsuta* RT-1 a una temperatura de incubación de 35 °C, a esta temperatura las tres cepas provocaron modificaciones estructurales que mejoraron la exposición de la celulosa.
- El pretratamiento hidrotérmico 180 °C/25min ([logRo]= 3.93) permitió una recuperación de una biomasa pretratada que contenía 54 % (p/v) de celulosa, con una mejor susceptibilidad que facilitó la sacarificación con un rendimiento del 100%.
- El hidrolizado recuperado del pretratamiento hidrotérmico 180 °C/25min ([logRo]= 3.93) puede ser valorizado por su contenido de furfural, 5 hidroximetil furfural, ácido fórmico, ácido levulínico y compuestos fenólicos bajo el concepto de biorrefinería.
- Los extractos enzimáticos crudos de *T. hirsuta* utilizados en la hidrólisis enzimática asistida permitieron una reducción en los tiempos de sacarificación.
- El extracto enzimático de *T. hirsuta* RT1 fue el más eficiente en el proceso de hidrólisis asistida, alcanzando en 12 h el 100% de los rendimientos de sacarificación, de la celulosa en la biomasa pretratada por autohidrólisis y de la holocelulosa pretratada en FES.
- Las estrategias planteadas en este trabajo permiten la valorización de RHP, al recuperar sus azúcares fermentables, emplearlas como sustrato para la producción de enzimas de importancia biotecnológica y obtención de compuestos de valor agregado.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar y purificar los extractos enzimáticos crudos obtenidos en fermentación en estado sólido con las cepas de *T. hirsuta* para su potencial uso en la bioconversión de biomasa
- Realizar un análisis tecno-económico de las propuestas aquí planteadas para la recuperación de azúcares, con pretratamientos biológicos y pretratamientos hidrotérmicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ruiz, H.A., Martínez, A., Vermerris, W. (2016). Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico. *Bioenergy Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9802-7>
- [2] Instituto para la Competitividad A. C. (2016). México ratifica el Acuerdo de París sobre el cambio climático. <https://imco.org.mx/mexico-ratifica-el-acuerdo-de-paris-sobre-el-cambio-climatico/>. Consultado: 11 de Noviembre 2018
- [3] Secretaría de Agricultura, Gandería, Desarrollo Rural, P. y A. (2016). Impulsa sagarpa generación de Biocombustibles que no compitan con alimentos. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/impulsa-sagarpa-generacion-de-biocombustibles-que-no-compitan-con-alimentos>. Consultado: 09 de Noviembre 2017
- [4] Chávez-Sifontes, M., Domine, M.E. (2013). Lignin, structure and applications: depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. *Av. en Ciencias e Ing.* 4, 15–46.
- [5] Banerjee, R., Chintagunta, A.D., Ray, S. (2017). A cleaner and eco-friendly bioprocess for enhancing reducing sugar production from pineapple leaf waste. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.088>
- [6] Aruna, T.E. (2019). Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193>
- [7] De La Cruz Medina, J., García, H.S. (2005). Pineapple Post-harvest Operations. *Food Agric. Organ. United Nations.* <https://www.fao.org/publications/card/es/c/cd17633e-2f36-4631-9836-5bf8130d7d71/>. Consultado: 24 Septiembre de 2019.
- [8] Pandit, P., Pandey, R., Singha, K., Shrivastava, S., Gupta, V., Jose, S. (2020). *Pineapple Leaf Fibre: Cultivation and Production*, Springer, Singapore.
- [9] Bartholomew, D.P., Rohrbach, K.G. (2002). *The Pineapple, botany, production and uses* CABI, USA.
- [10] Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., Lasekan, O. (2020). Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Res. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675>.
- [11] Rebolledo, M.A., Uriza, A.D.E., Pérez, A.D.A., Rebolledo, L.M., Zetina, L.R. (2011). *La piña y su cultivo en México: Cayena Lisa y MD2*. INIFAP, México.
- [12] Altendorf, S. (2019). *Major Tropical Fruits, Statistical compendium 2018.* <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA5688EN/>. Consultado: 03 de diciembre 2020.

- [13] Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2020). Crece 16.2% producción de piña en México durante 2020. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crece-16-2-produccion-de-pina-en-mexico-durante-2020?idiom=es>. Consultado: 14 de abril 2021.
- [14] Yusof, Y., Yahya, S.A., Adam, A. (2015). Novel technology for sustainable pineapple leaf fibers productions. *Procedia CIRP*. 26, 756–760.
- [15] Ch'ng, H. Y., Ahmed, O. H., Kassim, S., Majid, N. M. (2013). Co-composting of pineapple leaves and chicken manure slurry. 2, 1–8.
- [16] Micanquer-Carlosama, A., Cortés-Rodríguez, M., Serna-Cock, L. (2020). Formulation of a fermentation substrate from pineapple and sacha inchi wastes to grow *Weissella cibaria*. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03790>.
- [17] Rabiú, Z., Maigari, F.U., Lawan, U., Mukhtar, Z.G. (2018). Pineapple Waste Utilization as a Sustainable Means of Waste Management. En: *Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes*. Springer, Singapore, pp. 143–154.
- [18] Seguí, L., Fito Maupoey, P. (2018). An integrated approach for pineapple waste valorisation. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues. *J. Clean. Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.284>.
- [19] Laftah, W.A., Abdul Rahaman, W.A.W. (2015). Chemical pulping of waste pineapple leaves fiber for kraft paper production. *J. Mater. Res. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.12.006>.
- [20] Iewkittayakorn, J., Khunthongkaew, P., Wongnoipla, Y., Kaewtatip, K., Suybangdum, P., Sopajarn, A. (2020). Biodegradable plates made of pineapple leaf pulp with biocoatings to improve water resistance. *J. Mater. Res. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.03.023>.
- [21] Cassellis, M.E.R., Pardo, M.E.S., López, M.R., Escobedo, R.M. (2014). Structural, physicochemical and functional properties of industrial residues of pineapple (*Ananas comosus*). *Cellul. Chem. Technol.* 48, 633–641.
- [22] Chintagunta, A.D., Ray, S., Banerjee, R. (2017). An integrated bioprocess for bioethanol and biomanure production from pineapple leaf waste. *J. Clean. Prod.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.179>.
- [23] Padzil, F.N.M., Ainun, Z.M.A., Kassim, N.A., Lee, S.H., Lee, C.H., Ariffin, H., Zainudin, E.S. (2020). Chemical , Physical and Biological Treatments of Pineapple Leaf Fibres. En: *Pineapple leaf fibers*. Springer, Singapour, pp. 73-90.
- [24] Sharma, H.K., Xu, C., Qin, W. (2019). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste Biomass Valor.* 10, 235–251.
- [25] Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński,

- A. (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. FEMS Microbiol. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux049>.
- [26] Oke, M.A., Suffian, M., Annuar, M., Simarani, K. (2016). Mixed Feedstock Approach to Lignocellulosic Ethanol Production — Prospects and Limitations. BioEnergy Res. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-016-9765-8>.
- [27] Naraian, R. (2019). Mycodegradation of Lignocelluloses. Springer Nature, Switzerland.
- [28] Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realf, M.J., Bommarius, A.S. (2010). Cellulose crystallinity - A key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. FEBS J. 277, 1571–1582.
- [29] Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C., Viikari, L. (2004). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. En: Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility. Marcel Dekker, New York. 1, 1023-1062.
- [30] Michelin, M., Polizeli, M.D.L.T.M., Ruzene, D.S., Silva, D.P., Ruiz, H.A., Vicente, A.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Teixeira, J.A. (2012). Production of xylanase and β -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. Bioprocess Biosyst. Eng. 35, 1185–1192.
- [31] El Seoud, O.A., Heinze, T. (2005). Organic esters of cellulose: New perspectives for old polymers. Adv. Polym. Sci. 186, 103–149.
- [32] Kleinert, M., Barth, T. (2008). Phenols from lignin. Chem. Eng. Technol. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800073>
- [33] Farías-Sánchez, J.C., Velázquez-Valadez, U., Vargas-Santillán, A., Pineda-Pimentel, M.G., Mendoza-Chávez, E.A., Rutiaga-Quiñones, J.G., Saucedo-Luna, J. Castro-Montoya, A.J. (2016). Production of Fermentable Sugars and Hydrogen-Rich Gas from *Agave tequilana* Biomass. Bioenergy Res. 9, 1015–1022.
- [34] Alfenore, S., Molina-Jouve, C. (2016). Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. Process Biochem. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.028>.
- [35] Achinas, S., Euverink, G.J.W. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. Electron. J. Biotechnol. 23, 44–53.
- [36] Kang, Q., Appels, L., Tan, T., Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. Sci. World J. <https://doi.org/10.1155/2014/298153>
- [37] Yeh, R.H., Lin, Y.S., Wang, T.H., Kuan, W.C., Lee, W.C. (2016). Bioethanol production from pretreated *Miscanthus floridulus* biomass by simultaneous saccharification and fermentation. Biomass and Bioenergy. 94, 110–116.
- [38] Chintagunta, A.D., Jacob, S., Banerjee, R. (2016). Integrated bioethanol and biomanure

production from potato waste. *Waste Manag.* 49, 320–325.

[39]. Carrillo-Nieves, D., Rostro Alanís, M.J., de la Cruz Quiroz, R., Ruiz, H.A., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R. (2019). Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 102, 63–74.

[40] Chen, H., Fu, X. (2016). Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069>.

[41]. Prunescu, R.M., Blanke, M., Jakobsen, J.G., Sin, G. (2017). Model-based plantwide optimization of large scale lignocellulosic bioethanol plants. *Biochem. Eng. J.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.008>.

[42] Ebrahimi, M., Caparanga, A.R., Ordone, E.E., and 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.* 109, 41–48.

[43] Norrrahim, M.N.F., Huzaifah, M.R.M., Farid, M.A.A., Shazleen, S.S., Misenan, M.S.M., Yasim-Anuar, T.A.T., Naveen, J., Nurazzi, N.M., Rani, M.S.A., Hakimi, M.I., Ilyas R.A., Jenol M.A. (2021). Greener pretreatment approaches for the valorisation of natural fibre biomass into bioproducts. *Polymers.* 13, 1–23.

[44] Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>.

[45] Rana, S., Adak, A., Tiwari, R., Sharma, A., Saritha, M., Singh, S., Nain, L. (2015). Pretreatment and designing energy crops: Technological innovations and prospects. *Res. J. Microbiol.* 10, 557–570.

[46] Mishra, V., Jana, A.K. (2017). Fungal Pretreatment of Sweet Sorghum Bagasse with Combined CuSO₄-Gallic Acid Supplement for Improvement in Lignin Degradation, Selectivity, and Enzymatic Saccharification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 200–217.

[47] Silva, T.A.L., Zamora, H.D.Z., Varão, L.H.R., Prado, N.S., Baffi, M.A., Pasquini, D. (2018). Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *Waste and Biomass Valorization* 9, 2191–2201.

[48] Cherian, B.M., Leão, A.L., de Souza, S.F., Thomas, S., Pothan, L.A., Kottaisamy, M. (2010). Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam explosion. *Carbohydr. Polym.* 81, 720–725.

[49] Aguilar-Reynosa, A., Romaní, A., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguilar, C.N., Garrote, G., Ruiz,

- H.A. (2017). Comparison of microwave and conduction-convection heating autohydrolysis pretreatment for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.096>.
- [50] Conesa, C., Seguí, L., Laguarda-Miró, N., Fito, P. (2016). Microwaves as a pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of pineapple industrial waste for bioethanol production. *Food Bioprod. Process.* 100, 203–213.
- [51] Aguilar-Reynosa, A., Romani, A., Ma. Rodríguez-Jasso, R., Aguilar, C.N., Garrote, G., Ruiz, H.A. (2017). Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview. *Energy Convers. Manag.* 136, 50–65.
- [52] Irmak, S., Meryemoglu, B., Sandip, A., Subbiah, J., Mitchell, R.B., Sarath, G. (2018). Microwave pretreatment effects on switchgrass and miscanthus solubilization in subcritical water and hydrolysate utilization for hydrogen production. *Biomass and Bioenergy* 108, 48–54.
- [53] Nabarlantz, D., Ebringerová, A., Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 69, 20–28.
- [54] Ruiz, H.A., Cerqueira, M.A., Silva, H.D., Rodríguez-jasso, R.M., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. (2013). Biorefinery valorization of autohydrolysis wheat straw hemicellulose to be applied in a polymer-blend film. *Carbohydr.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.054>.
- [55] Nakasu, P.Y.S., Ienczak, L.J., Costa, A.C., Rabelo, S.C. (2016). Acid post-hydrolysis of xylooligosaccharides from hydrothermal pretreatment for pentose ethanol production. *Fuel* 185, 73–84.
- [56] Ruiz, H.A., Silva, D.P., Ruzene, D.S., Lima, L.F., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. (2012). Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain - Effect of process conditions. *Fuel* 95, 528–536.
- [57] Aparicio, E., Rodríguez-Jasso, R.M., Pinales-Márquez, C.D., Loredó-Treviño, A., Robledo-Olivo, A., Aguilar, C.N., Kostas, E.T., Ruiz, H.A. (2021). High-pressure technology for *Sargassum* spp. biomass pretreatment and fractionation in the third generation of bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 329, 1–10.
- [58] Fillat, Ú., Ibarra, D., Eugenio, M.E., Moreno, A.D., Tomás-Pejó, E., Martín-Sampedro, R. (2017). Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: A review. *Fermentation.* <https://doi.org/10.3390/fermentation3020017>.
- [59] Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M. (2011). Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006>.
- [60] Aguilar, D.L., Rodríguez-Jasso, R.M., Zanuso, E., de Rodríguez, D.J., Amaya-Delgado, L., Sanchez, A., Ruiz, H.A. (2018). Scale-up and evaluation of hydrothermal pretreatment in

isothermal and non-isothermal regimen for bioethanol production using agave bagasse. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.100>.

[61] Bonturi, N., Crucello, A., Viana, A.J.C., Miranda, E.A. (2017). Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochem.* 57, 16–25.

[62] Yu, H., Xie, T., Xie, J., Ai, L., Tian, H. (2019). Characterization of key aroma compounds in Chinese rice wine using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.* 293, 8–14.

[63] Hofrichter, M. (2002). Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30, 454–466.

[64] 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.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>.

[65] Yoon, L.W., Ang, T.N., Ngoh, G.C., Chua, A.S.M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy* 67, 319–338.

[66] Shirkavand, E., Baroutian, S., Gapes, D.J., and Young, B.R. (2016). Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.003>.

[67] Avanthi, A., Banerjee, R. (2016). A strategic laccase mediated lignin degradation of lignocellulosic feedstocks for ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 92, 174–185.

[68] Nagula, K.N., Pandit, A.B. (2016). Bioresource Technology Process intensification of delignification and enzymatic hydrolysis of delignified cellulosic biomass using various process intensification techniques including cavitation. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.152>.

[69] 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.* <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1323-y>.

[70] Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K.Y., Ishii, J., Kondo, A. (2013). Bioresource Technology A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>.

[71] Leite, P., Sousa, D., Fernandes, H., Ferreira, M., Costa, A.R., Filipe, D., Gonçalves, M.,

Peres, H., Belo, I., and Salgado, J.M. (2021). Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>

[72] Costa, R. dos S., de Almeida, S.S., Cavalcanti, E. d. A.C., Freire, D.M.G., Moura-Nunes, N., Monteiro, M., Perrone, D. (2020). Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. *Food Res. Int.*, 109843. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109843>.

[73] Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J. (2016). Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 114, 39–44.

[74] Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, L., Islas-Flores, I., Rivera-Muñoz, G., Ancona-Escalante, W., Solís-Pereira, S. (2015). Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Lett. Appl. Microbiol.* 61, 252–258.

[75] Ebabhi, A. M., Adekunle, A. A. (2016). Potential of some agro-wastes in bioethanol production using two indigenous yeast strains; *Candida tropicalis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Niger. J. Mycol.* 8, 8-22.

[76] Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Rojas-Herrera, R., Cortes-Velazquez, A., Rivera-Muñoz, G., Solís-Pereira, S. (2011). New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. *African J. Biotechnol.* 10, 10134–10142.

[77] 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., Martínez, A., Tiessen A. Díaz-Mireles E., Lozoya-Gloria E. (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.

[78] Huchin Poot, E.G. (2015). Aislamiento de la microbiota del fruto de *Brosimum alicastrum* Sw. para su uso en la producción de bioetanol. Tesis de Maestría, CICY, México.

[79] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C.S., Slui, J., and ter, D. Templeton, and D.C. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>. Consultado: 22 de agosto de 2018.

[80] Olguin-Maciél, E., Larqué-Saavedra, A., Pérez-Brito, D., Barahona-Pérez, L.F., Alzate-Gaviria, L., Toledano-Thompson, T., Lappe-Oliveras, P.E., Huchin-Poot, E.G., Tapia-Tussell, R. (2017). *Brosimum alicastrum* as a novel starch source for bioethanol production. *Energies.* <https://doi.org/10.3390/en10101574>.

[81] Parenti, A., Muguerza, E., Redin Iroz, A., Omarini, A., Conde, E., Alfaro, M., Castanera,

R., Santoyo, F., Ramírez, L., Pisabarro, A.G. (2013). Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresour. Technol.* 133, 142–149.

[82] Rana, S., Tiwari, R., Arora, A., Singh, S., Kaushik, R., Kumar Saxena, A., Dutta, S.C., Nain, L. (2013). Prospecting *Parthenium* sp. pretreated with *Trametes hirsuta*, as a potential bioethanol feedstock. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2, 152–158.

[83] Aydinoğlu, T., Sargin, S. (2013). Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 215–222.

[84] Singleton, V.L., Rossi, J.A.J. (1965). Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *Am. J. Enol. Vinic.* 16, 144–58.

[85] Matsumura, E., Shin, T., Murao, S., Yamamoto, E., Kawano, T. (1987). New Enzymatic Colorimetric Reactions of Benzoic Acid Derivatives with ABTS [2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] in the Presence of Laccase. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2743–2750.

[86] Banerjee, R., Chintagunta, A.D., Ray, S. (2019). Laccase mediated delignification of pineapple leaf waste: An ecofriendly sustainable attempt towards valorization. *BMC Chem.* <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0576-9>

[87] Sun, F.F., Hong, J., Hu, J., Saddler, J.N., Fang, X., Zhang, Z., Shen, S. (2015). Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 79–80, 42–48.

[88] Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Motzezak, R.H., Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias* 12, 129–135.

[89] Perez-Pimienta, J.A., Flores-Gómez, C.A., Ruiz, H.A., Sathitsuksanoh, N., Balan, V., da Costa Sousa, L., Dale, B.E., Singh, S., Simmons, B.A. (2016). Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEX™, autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments. *Bioresour. Technol.* 211, 216–223.

[90] Ruiz, H.A., Thomsen, M.H., Trajano, H.L. (2017). *Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of bioethanol and high added-value compounds of second and third generation biomass.* Springer International Publishing, Switzerland.

[91] Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0510-7>.

[92] Margot, J., Bennati-Granier, C., Maillard, J., Blánquez, P., Barry, D.A., Holliger, C. (2013).

Bacterial versus fungal laccase: Potential for micropollutant degradation. *AMB Express*. 3, 1-14.

[93] Vasina, D. V., Mustafaev, O.N., Moiseenko, K. V., Sadovskaya, N.S., Glazunova, O.A., Tyurin, A.A., Fedorova, T. V., Pavlov, A.R., Tyazhelova, T. V., Goldenkova-Pavlova, I. V., Koroleva O.V. (2015). The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.015>.

[94] Pereira-Patrón, A., Solís-Pereira, S., Lizama-Uc, G., Ramírez-Prado, J.H., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R. (2019). Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Trametes hirsuta* Bm-2 and analysis of the 5' untranslated region (5'UTR). *3 Biotech* 9, 1-12.

[95] Tapia-Tussell, R., Pereira-Patrón, A., Alzate-Gaviria, L., Lizama-Uc, G., Pérez-Brito, D., Solís-Pereira, S. (2020). Decolorization of Textile Effluent by *Trametes hirsuta* Bm-2 and lac-T as Possible Main Laccase-Contributing Gene. *Curr. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02188-9>.

[96] Mishra, V., Jana, A.K. (2017). Fungal Pretreatment of Sweet Sorghum Bagasse with Combined CuSO₄-Gallic Acid Supplement for Improvement in Lignin Degradation, Selectivity, and Enzymatic Saccharification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 200–217.

[97] Saritha, M., Arora, A., Nain, L. (2012). Bioresource Technology Pretreatment of paddy straw with *Trametes hirsuta* for improved enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.043>.

[98] Fu, T.K., Li, J.H., Wang, Q.H., Huang, H., Wei, X.Y., Cui, L.H., Wang, Y.H., Wang, F. (2013). Structure and properties of natural cellulose extracted from pineapple leaf. *Adv. Mater. Res.* 815, 379–385.

[99] Abraham, E., Deepa, B., Pothan, L.A., Jacob, M., Thomas, S., Cvelbar, U., Anandjiwala, R. (2011). Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. *Carbohydr. Polym.* 86, 1468–1475.

[100] Ravindran, L., Sreekala, M.S., Thomas, S. (2019). Novel processing parameters for the extraction of cellulose nanofibres (CNF) from environmentally benign pineapple leaf fibres (PALF): Structure-property relationships. *Int. J. Biol. Macromol.* 131, 858–870.

[101] Patricia Zapata-Castillo (2012). Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African J. Biotechnol.* 11, 3603–3611.

[102] 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*

<https://doi.org/10.3390/molecules200815147>.

- [103] Carlos, D.L.M.J., Leonardo, S., Jesús, M.C., Paola, M.R., Alejandro, Z.C., Juan, A.V., Noé, A.C. (2020). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* gh1 to enhance polyphenolic content and antioxidative activity of castilla rose (*Purshia plicata*). *Plants* 9, 1–15.
- [104] Rodrigues, C.I., Costa, D.M. da, Santos, A.C.V., Batatinha, M.J.M., Souza, F.V.D., Souza, E.H. de, Botura, M.B., Alves, C.Q., Soares, T.L., Brandão, H.N. (2020). Assessment of in vitro anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of BRS Boyrá pineapple leaf extracts. *Vet. Parasitol.* 285.
- [105] Kirst Tychanowicz, G., De Souza, D.F., Souza, C.G.M., Kadowaki, M.K., Peralta, R.M. (2006). Copper Improves the Production of Laccase by the White-Rot Fungus *Pleurotus pulmonarius* in Solid State Fermentation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 49, 699–704.
- [106] Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M.N., Lundquist, K., Taherzadeh, M.J. (2011). Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources* 6, 5224–5259.
- [107] Vasco-Correa, J., Luo, X., Li, Y., Shah, A. (2019). Comparative study of changes in composition and structure during sequential fungal pretreatment of non-sterile lignocellulosic feedstocks. *Ind. Crops Prod.* 133, 383–394.
- [108] Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 941–962.
- [109] Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>.
- [110] Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>.
- [111] Moya, R., Berrocal, A., Rodríguez-Zúñiga, A., Rodríguez-Solis, M., Villalobos-Barquero, V., Starbird, R., Vega-Baudrit, J. (2016). Biopulp from Pineapple Leaf Fiber Produced by Colonization with Two White-Rot Fungi: *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. *BioResources* 11, 8756–8776.
- [112] Ilyas, R.A., Sapuan, S.M., Ishak, M.R., Zainudin, E.S. (2017). Effect of delignification on the physical, thermal, chemical, and structural properties of sugar palm fibre. *BioResources* 12, 8734–8754.
- [113] Banerjee, R., Chintagunta, A.D., Ray, S. (2017). A cleaner and eco-friendly bioprocess for enhancing reducing sugar production from pineapple leaf waste. *J. Clean. Prod.* 149, 387–395.

- [114] Mishra, V., Jana, A.K. (2019). Sweet Sorghum Bagasse Pretreatment by *Coriolus versicolor* in Mesh Tray Bioreactor for Selective Delignification and Improved Saccharification. *Waste Biomass Valor.* 10, 2689–2702.
- [115] Carrillo-Nieves, D., Saldarriaga-Hernandez, S., Gutiérrez-Soto, G., Rostro-Alanis, M., Hernández-Luna, C., Alvarez, A.J., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R. (2020). Biotransformation of agro-industrial waste to produce lignocellulolytic enzymes and bioethanol with a zero waste. *Biomass Convers. Biorefinery.* <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00738-6>.
- [116] Costa, J.A.V., Treichel, H., Kumar, V., Pandey, A. (2018). Advances in Solid-State Fermentation. En: *Current developments in biotechnology and bioengineering.* Elsevier, New York pp 1-17
- [117] Carrier, M., Loppinet-Serani, A., Denux, D., Lasnier, J.M., Ham-Pichavant, F., Cansell, F., Aymonier, C. (2011). Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy* 35, 298–307.
- [118] Pilate, G., Chabbert, B., Cathala, B., Yoshinaga, A., Leplé, J.C., Laurans, F., Lapierre, C., Ruel, K. (2004). Lignification and tension wood. *Comptes Rendus. Biol.* 327, 889–901.
- [119] Jönsson, L.J., Martin, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 199, 103–112.
- [120] Liu, H.M., Yao, Y.G., Yan, Y.Y., Wang, X. De (2020). Elucidation of the structural changes of sesame hull hemicelluloses during roasting. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 1535–1544.
- [121] Bach, Q.V., Tran, K.Q., Skreiberg, O. (2016). Hydrothermal pretreatment of fresh forest residues: Effects of feedstock pre-drying. *Biomass and Bioenergy* 85, 76–83.
- [122] Pino, M.S., Rodríguez-Jasso, R.M., Michelin, M., Ruiz, H.A. (2019). Enhancement and modeling of enzymatic hydrolysis on cellulose from agave bagasse hydrothermally pretreated in a horizontal bioreactor. *Carbohydr. Polym.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.111>.
- [123] Nashiruddin, N.I., Mansor, A.F., Rahman, R.A., Ilias, R.M., Yussof, H.W. (2020). Process parameter optimization of pretreated pineapple leaves fiber for enhancement of sugar recovery. *Ind. Crops Prod.* 152.
- [124] Alzate-Gaviria, L., Domínguez-Maldonado, J., Chablé-Villacís, R., Olguin-Maciel, E., Leal-Bautista, R.M., Canché-Escamilla, G., Caballero-Vázquez, A., Hernández-Zepeda, C., Barredo-Pool, F.A., Tapia-Tussell, R. (2021). Presence of polyphenols complex aromatic “Lignin” in *Sargassum* Spp. From Mexican Caribbean. *J. Mar. Sci. Eng.* 9, 1–10.
- [125] Lopattananon, N., Panawarangkul, K., Sahakaro, K., Ellis, B. (2006). Performance of pineapple leaf fiber-natural rubber composites: The effect of fiber surface treatments. *J. Appl. Polym. Sci.* 102, 1974–1984.

- [126] Ruiz, H.A., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. (2012). Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process. *Ind. Crops Prod.* 36, 100–107.
- [127]. Pino, M.S., Rodríguez-Jasso, R.M., Michelin, M., Ruiz, H.A. (2019). Enhancement and modeling of enzymatic hydrolysis on cellulose from agave bagasse hydrothermally pretreated in a horizontal bioreactor. *Carbohydr. Polym.* 211, 349–359.
- [128] Adebo, O.A., Medina-Meza, I.G. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules* 25, 1–19.
- [129] Bhadana, B., Chauhan, M. (2016). Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* with Different Perspectives: Substrates, Growth Variables, Inhibitor Reduction and Immobilization. *Ferment. Technol.* <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000131>
- [130] Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process. Technol.* 160, 196–206.
- [131] Sepúlveda, L., Romani, A., Aguilar, C.N., Teixeira, J. (2018). Valorization of pineapple waste for the extraction of bioactive compounds and glycosides using autohydrolysis. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.012>.
- [132] Modelska, M., Berłowska, J., Kregiel, D., Cieciora, W., Antolak, H., Tomaszewska, J., Binczarski, M., Szubiakiewicz, E., Witonska, I.A. (2017). Concept for recycling waste biomass from the sugar industry for chemical and biotechnological purposes. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules22091544>.

ANEXO 1 Agua peptonada

Reactivos	1000 mL
Peptona	1 g
NaCl	8.5 g
Agar-agar	0.02 g

Ajustar pH 7.2 y distribuir en tubos para diluciones seriadas (9 mL)

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min

ANEXO 2- Medio de cultivo Wallerstein laboratory nutrient-Agar (WLA)

- Aislamiento de hongos y levaduras

Reactivos	1000 mL
WLA	80.2 g
Cloranfenicol	0.5 g

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min.

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar

- Aislamiento de bacterias

Reactivos	1000 mL
WLA	80.2 g
Cicloheximida	0.04 g/L*

*En condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar y a una temperatura aproximada de 60 °C se añade cicloheximida (stock previamente esterilizado por filtración para obtener la concentración indicada).

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar

ANEXO 3 Medio de cultivo Rosa de Bengala

Reactivos	Para 1000mL
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
Peptona	0.5 g
Dextrosa	10.0gr
Extracto de Levadura	0.5 g
Rosa de Bengala	0.05 g
Cloranfenicol*	0.5 g
Agar	20.0 g
Cloranfenicol	0.05 g

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min.

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar

ANEXO 4 Medio Plate Count Agar (PCA)

Reactivos	Para 1000 mL
Triptona	5 g
Dextrosa	1 g
Extracto de Levadura	2.5 g
Agar	12 g
Cicloheximida*	0.04 g/L

Ajustar pH 7 y esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min.

*En condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar y a una temperatura aproximada de 60 °C se añade cicloheximida (stock previamente esterilizado por filtración para obtener la concentración indicada).

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

ANEXO 5 Medio de cultivo de Man Rogosa & Sharpe (MRS)

Reactivos	Para 1000 mL
Peptona de Caseina	10 g
Extracto de Carne	10 g
Extracto de Levadura	4 g
Glucosa	20 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Tween 80	1 g
Citrato de amonio di básico	2 g
Acetato de sodio	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
MnSO ₄ 7H ₂ O	0.04 g
Agar	20 g
CaCO ₃	2 g

Ajustar pH 6 y esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

ANEXO 6 Medio de cultivo GELPA

Reactivos	Para 1000 mL
Glucosa	20 g
Extracto de Levadura	5 g
Peptona	5 g
Agar	2 g

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

ANEXO 7 Medio de cultivo EMA

Reactivos	Para 1000 mL
Extracto de malta	2 g
Agar	2 g

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

ANEXO 8 Medio Mandels & Weber

Reactivos	Para 1000 mL
KH ₂ PO ₄	2 g
CaCl ₂	0.3 g
Urea	0.3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4 g
FeSO ₄	5 mg
MgSO ₄	0.3 g
MnSO ₄	1.6 g
ZnSO ₄	1.4 mg
CoCl ₂	2 mg
Glucosa	2 g
Carboximetil celulosa (CMC)	10 g
Agar	20 g

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min

Dosificar en cajas Petri bajo condiciones estériles dentro de campana con flujo laminar.

ANEXO 9 Medio de cultivo basal Wicherman

Reactivos	Para 1000 mL
Peptona	7.5 g

Extracto de levadura

4.5 g

Para las pruebas fermentativas de carbohidratos, se coloca 1 mL del medio de cultivo y 1 mL de una solución stock de carbohidrato (para este trabajo fue 1.5 g en 25 mL de agua destilada).

Se coloca una campana Durham en el interior y se esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 Kg/cm² durante 20 min.