



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

VALORIZACIÓN INTEGRAL DE LA SEMILLA DE RAMÓN
(*Brosimum alicastrum*) BAJO EL CONCEPTO DE
BIORREFINERÍA

Tesis que presenta

ING. EDWIN JOSUÉ CHAN GONZÁLEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE



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: _____

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Edwin Chan', is written over a horizontal line.

Edwin Josué Chan González

Mérida, Yucatán, México, a 18 de Abril de 2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

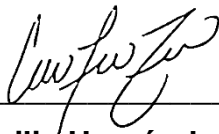
POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Edwin Josué Chan González** titulado **VALORIZACIÓN INTEGRAL DE LA SEMILLA DE RAMÓN (*Brosimum alicastrum*) BAJO EL CONCEPTO DE BIORREFINERÍA**, fue realizado en la Unidad de Energía Renovable, Bioenergía, ERU 19 y 20 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.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 18 de Abril de 2022

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada no. 1067841 para la realización de la presente investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por aceptarme como estudiante y a la Unidad de Energía Renovable en los laboratorios ERU 19 y 20 por el espacio otorgado para desarrollar este trabajo de investigación.

A mi director de tesis el Dr. Raúl Tapia Tussell, por su dirección, enseñanzas, consejos, apoyo, paciencia y tiempo para desarrollar las actividades realizadas.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por sus revisiones en las tesis y comentarios durante todo el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Sara Elena Solís Pereira por sus revisiones en la tesis, apoyo y comentarios para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda por el apoyo en la revisión de la tesis, por sus comentarios y observaciones para el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Galdy Hernández Zárate por el apoyo en la revisión y corrección de la tesis, así como comentarios y observaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Edgar Olguin Maciel por toda la ayuda en la realización de este trabajo, por su orientación y apoyo en todo momento, redacción, desarrollo experimental y discusión de resultados.

A la I.Q.I Tanit Toledano Thompson por su paciencia, comentarios y apoyo en el desarrollo de técnicas de laboratorio, así como la enseñanza en el manejo de equipo de laboratorio, en especial del cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

Al M.C Jorge Domínguez Maldonado por su ayuda en el desarrollo de la tesis, por sus enseñanzas y apoyo en el manejo de equipos de laboratorio.

A la Dra. Elda Isaura España Gamboa que a pesar del poco tiempo de conocernos me brindo comentarios y su ayuda incondicional para el manejo del cromatógrafo de gases.

Al M.C Martín Baas López por su disponibilidad y apoyo en la realización del análisis elemental de las muestras.

A la Lic. Julia González Montilla por toda la accesibilidad durante los procesos administrativos correspondientes.

A la Dra. Rubí Chable Villacis por su ayuda brindada en laboratorio, así como comentarios y observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Ing. Ileana Beatriz Ake Cituk por toda la ayuda y amabilidad brindada en la orientación con los procesos administrativos correspondientes.

A mis compañeros de generación por todos esos momentos de solidaridad y apoyo que me brindaron, así como, los momentos felices y tristes durante toda mi estancia en la institución. Y en especial a mis compañeros de laboratorio por los incontables momentos de apoyo brindados incondicionalmente.

A mi familia por permitirme llegar hasta donde me encuentro, por la paciencia, confianza y apoyo para la realización de mis metas. Este logro es tan de ustedes como mío, sin ustedes no habría sido posible.

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS.....	iv
LISTADO DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES.....	3
1.1 El árbol ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>).....	3
1.1.1 Usos.....	3
1.1.2 Producción de biomasa.....	4
1.1.3 Fruto y composición de la semilla de ramón.....	4
1.2 Compuestos fenólicos.....	7
1.2.1 Funciones de los compuestos fenólicos.....	8
1.2.2 Métodos de extracción e identificación de compuestos fenólicos.....	9
1.3 Bioetanol.....	9
1.3.1 Materias primas para la producción de etanol.....	10
1.3.1.1 Almidón.....	11
1.3.1.1.1 Estructura.....	12
1.3.2 Etanol a partir de almidón.....	13
1.3.2.1 Molienda.....	14
1.3.2.2 Licuefacción.....	15
1.3.2.3 Sacarificación.....	15
1.3.2.4 Fermentación.....	15
1.3.2.5 Destilación.....	15
1.3.2.6 Vinaza.....	16
1.4 Procesos para la producción de etanol.....	17
1.4.1 Hidrólisis y fermentación separada (HFS).....	18
1.4.2 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS).....	18
1.4.3 Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea (SCFS).....	18
1.4.4 Bioproceso Consolidado (BPC).....	18
1.4.4.1 Ingeniería genética de microorganismos individuales y de consorcios sintéticos.....	19
1.4.4.1 Microorganismos de interés en BPC.....	20
1.5 La biorrefinería.....	21

1.5.1 Clasificación de las biorrefinerías.....	23
1.5.1.1 Clasificación de biorrefinerías por la materia prima.....	23
1.5.1.2 Clasificación por la Tarea 42 de Bioenergía de la Agencia Internacional de Energía (AIE)	24
1.5.2 Nomenclatura de la descripción de una biorrefinería	25
1.5.3 La biorrefinería a partir de almidón.....	26
1.5.4 BPC para la producción de etanol.....	28
1.6 Economía circular	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Estrategia experimental.....	33
2.2 Harina de Semilla de Ramón (HSR).....	34
2.2.1 Extracción de compuestos solubles en agua.	34
2.3 Cualificación y cuantificación de compuestos en la fracción líquida.	36
2.3.1 Azúcares Reductores (AR)	36
2.3.2 Fenoles Totales (FT)	36
2.3.3 Actividad enzimática lacasa.....	36
2.3.4 Actividad enzimática α -amilasa.....	37
2.4 Cuantificación de fenoles por HPLC	37
2.5 Caracterización para la HSR y micelio generado en el BPC	37
2.5.1 Determinación de humedad	37
2.5.2 Determinación de cenizas en biomasa	38
2.5.3 Contenido de proteína.....	38
2.5.4 Análisis elemental CHNS	38
2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	38
2.7 Condiciones del Bioproceso Consolidado (BPC).....	39
2.8 Destilación	40
2.9 Cuantificación de etanol y metanol por Cromatografía de Gases (CG)	40
2.10 Análisis estadístico.....	40
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
3.1 Harina de Semilla de Ramón (HSR).....	42
3.1.1 Rendimiento fruto de ramón	42

3.1.2 Extracciones de compuestos solubles en agua en harina de semilla de ramón (HSR)	42
3.1.3 Caracterización de HSR resultante de la extracción (fracción sólida).....	47
3.2 BPC con las cepas de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y RT-1 empleando como sustrato HSR-C, HSR-1E y HSR-2E	49
3.2.1 Cinética del contenido de fenoles totales, actividad enzimática y liberación de azúcares reductores durante el BPC.	50
3.3 Productos generados en el BPC.	55
CONCLUSIONES	66
PERSPECTIVAS	67
BIBLIOGRAFÍA	68

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales componentes de la semilla de ramón.	5
Tabla 1.2 Compuestos fenólicos identificados en la semilla de ramón.	6
Tabla 1.3 Metodologías de extracción e identificación de compuestos fenólicos [40].	9
Tabla 1.4 Sistemas BPC y la tecnología utilizada en los microorganismos para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico y con almidón.	20
Tabla 1.5 Compañías con biorrefinería de almidón [48].	27
Tabla 2.1 Relación de método de extracción: sin agitación y con agitación a diferentes tiempos.	34
Tabla 2.2 Relación de harina de semilla de ramón y número de extracciones.	35
Tabla 2.3 Relación de cepa de <i>T. hirsuta</i> inoculada y la harina de semilla de ramón empleada en el bioproceso consolidado.	40
Tabla 3.1 Cuantificación de fenoles totales, azúcares reductores y pH de la fracción líquida de las extracciones de HSR.	44
Tabla 3.2 Compuestos fenólicos identificados en las extracciones de HSR por HPLC.	46
Tabla 3.3 Humedad, contenido inorgánico (cenizas) y caracterización elemental de la HSR resultante de las diferentes extracciones.	48
Tabla 3.4 Condiciones iniciales en el BPC previo a la inoculación de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 y RT-1.	49
Tabla 3.5 Contenido inorgánico (cenizas), proteína y caracterización elemental del micelio de las cepas de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 y RT-1 generado en el BPC.	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 De izquierda a derecha: árbol de ramón, corteza, hojas, flores y madera de árbol de ramón [18].....	3
Figura 1.2 De izquierda a derecha: fruto de ramón inmaduro (pericarpio verde), fruto maduro (pericarpio amarillento a anaranjado rojizo) y semilla.	5
Figura 1.3 Molécula de Fenol: consta de un grupo fenilo unido a un grupo hidroxilo [35].....	7
Figura 1.4 a) Ácido vanílico, b) Ácido cafeico, c) Ácido dihidro- <i>p</i> -cumárico [35].....	8
Figura 1.5 Generaciones de biocombustibles en función al tipo de biomasa [45].	11
Figura 1.6 Esquema del proceso para la extracción de almidón, procesamiento y sus múltiples aplicaciones [9].	12
Figura 1.7 A) Estructura de la amilosa y B) estructura de la amilopectina [47].	13
Figura 1.8 Esquema del procesamiento de materiales ricos en almidón hasta su conversión a etanol, así como el tratamiento de los subproductos obtenidos [41].	14
Figura 1.9 Esquemas para la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol [55].....	17
Figura 1.10 Esquema general de una biorrefinería [64].	22
Figura 1.11 Posibles plataformas de una biorrefinería [64].....	25
Figura 1.12 Esquema simple de una biorrefinería a partir de cultivos de semillas oleaginosas [64].	26
Figura 1.13 Esquema biorrefinería de almidón a partir de maíz [7].....	27
Figura 1.14 Ciclo de la economía circular [11].	29
Figura 2.1 Diagrama de la estrategia experimental empleada en este trabajo.	33
Figura 3.1 Compuestos fenólicos totales recuperados de una solución HSR/agua destilada al 14% (p/v) con diferentes tratamientos y tiempos. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Los valores de las columnas de un mismo tratamiento que comparten la misma letra no son significativos (p<0.05).	43

Figura 3.2 Compuestos fenólicos recuperados en extracciones secuenciales. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	43
Figura 3.3 Cromatogramas obtenidos por HPLC. A) Mezcla de estándares utilizados, B) Extracción HSR-1E, C) Extracción HSR-2E. 1= Ácido gálico, 2= Ácido cafeico, 3= Ácido vanílico, 4= Ácido <i>p</i> -cumárico y 5= Siringaldehído.	46
Figura 3.4 Fotografía de la HSR resultante de las diferentes extracciones. A) HSR-C, B) HSR-1E y C) HSR-2E.	48
Figura 3.5 Condiciones de pH en la fracción líquida al inicio y final del BPC. A) <i>T. hirsuta</i> Bm-2 y B) <i>T. hirsuta</i> RT-1. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	50
Figura 3.6 Cinética de liberación de azúcares reductores y actividad enzimática α -amilasa de la cepa de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.	52
Figura 3.7 Cinética de liberación de azúcares reductores y actividad enzimática α -amilasa de la cepa de <i>T. hirsuta</i> RT-1 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.	52
Figura 3.8 Cinética fenoles totales y actividad enzimática lacasa de la cepa de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.	54
Figura 3.9 Cinética fenoles totales y actividad enzimática lacasa de la cepa de <i>T. hirsuta</i> RT-1 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.	54
Figura 3.10 Biomasa en peso seco del micelio generado por las cepas de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 y RT-1 durante el bioproceso consolidado. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	56
Figura 3.11 HSR residual recuperada en peso seco al final del BPC con las cepas de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 y RT-1. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	59

Figura 3.12 Comparativa de la humedad, contenido inorgánico (cenizas) y análisis elemental de la HSR inicial (previo al BPC) y la HSR residual obtenido de los BPC con <i>T. hirsuta</i> Bm-2 y RT-1. No se detectó la presencia de azufre. Los resultados representan la media (n=2) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	61
Figura 3.13 Microscopía electrónica de barrido para la HSR previo al BPC y la HSR residual recuperada al final del BPC en diferentes secciones del matraz. De flecha naranja la matriz de fibroproteína presente en la harina y en círculo rojo los gránulos de almidón.	62
Figura 3.14 Producción de etanol alcanzada al día 12 de incubación. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	64
Figura 3.15 Producción de metanol al día 12 de incubación. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).	64
Figura 3.16 Modelo propuesto para una planta de biorrefinería a partir del fruto de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>). Aprovechamiento del pericarpio, testa y harina de semilla de ramón para la producción de etanol y productos de valor agregado.	65

ABREVIATURAS

AR	Azúcares reductores
Bm-2	<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2
BPC	Bioproceso consolidado
BPC-C	Bioproceso consolidado utilizando harina de semilla de ramón control
BPC-1E	Bioproceso consolidado utilizando harina de semilla de ramón con una extracción
BPC-2E	Bioproceso consolidado utilizando harina de semilla de ramón con doble extracción
FT	Fenoles totales
HSR	Harina de semilla de ramón
HSR inicial	Se refiere a las harinas de semilla de ramón antes del bioproceso consolidado
HSR final	Se refiere a las harinas de semilla de ramón después del bioproceso consolidado
HSR-C	Harina de semilla de ramón control (sin extracciones)
HSR-1E	Harina de semilla de ramón con una extracción
HSR-2E	Harina de semilla de ramón con doble extracción
gEAG	Gramos equivalentes de ácido gálico
U_{α}	Unidad de actividad enzimática α -amilasa
U_L	Unidad de actividad enzimática lacasa
RT-1	<i>Trametes hirsuta</i> RT-1

RESUMEN

Actualmente, los productores de biocombustibles compiten con el mercado volátil del precio de la gasolina. Esto ha impulsado la implementación de nuevas estrategias para diversificar sus productos y mejorar la rentabilidad. A partir de esta premisa se implementa la biorrefinería, la cual consiste en un proceso íntegro de conversión de biomasa a través de diversos procesos para la generación de diversos productos comercializables. En este estudio se valorizó a la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) bajo un concepto de biorrefinería, empleando harina de semilla de ramón (HSR-C) como sustrato. Se evaluaron los efectos de realizar una extracción (HSR-1E) y doble extracción (HSR-2E) con agua destilada sobre HSR-C en la producción de etanol y co-productos (harina residual, metanol, micelio y vinaza) en un bioproceso consolidado (BPC) utilizando las cepas de *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1. Se obtuvo una extracción rica en compuestos fenólicos (2.31 gEAG/L) y azúcares reductores (3.21 g/L) y se identificó al ácido gálico como el compuesto fenólico de mayor concentración (2.75 g/kg de HSR seca). Las extracciones generaron cambios en la composición elemental de la HSR y tuvieron efecto sobre la concentración de fenoles totales y azúcares reductores, actividad enzimática α -amilasa y lacasa, utilización de la HSR y producción de micelio durante el desarrollo del BPC. En el BPC con *T. hirsuta* Bm-2 se obtuvieron los mejores resultados con HSR-1E. Se produjeron 14.14 g/L de etanol, un aumento del 13.21% de la concentración con respecto a HSR-C (12.49 g/L), simultáneamente hubo una reducción en un 72.22% de la concentración de metanol, sin embargo, el micelio generado fue menor (1.25 g) con respecto a HSR-C (1.69 g) pero mayor a HSR-2E (0.81 g). Por el contrario, *T. hirsuta* RT-1 demostró mayor capacidad hidrolítica que fermentativa. La producción de etanol fue baja en comparación con Bm-2, alcanzando con RT-1 un máximo de 4.16 g/L en HSR-2E. Sin embargo, HSR-C presentó la mayor utilización de la HSR (59.36%), con una producción similar de etanol (3.98 g/L) a HSR-2E, pero con mayor crecimiento micelial (1.36 g) y la concentración más alta de azúcares reductores (31.25 g/L) en comparación con HSR-1E y HSR-2E.

ABSTRACT

Nowadays, biofuel producers compete with the volatile market price of gasoline. This has led to the implementation of new strategies to diversify their products and improve profitability. From this premise, the biorefinery is implemented, which consists of a comprehensive biomass conversion process through various processes for the generation of various marketable products. In this study, ramón seed (*Brosimum alicastrum*) was valorized under a biorefinery concept, using ramón seed flour (HSR-C) as a substrate. The effects of performing a single extraction (HSR-1E) and double extraction (HSR-2E) with distilled water on HSR-C in the production of ethanol and co-products (residual flour, methanol, mycelium, and vinasse) were evaluated in a consolidated bioprocess (CBP) using the strains of *Trametes hirsuta* Bm-2 and RT-1. An extraction rich in phenolic compounds (2.31 gEAG/L) and reducing sugars (3.21 g/L) was obtained and gallic acid was identified as the phenolic compound with the highest concentration (2.75 g/kg of dry HSR-1E). The extractions generated changes in the elemental composition of HSR and had an effect on total phenols and reducing sugars concentration, α -amylase and laccase enzymatic activity, HSR utilization, and mycelium production during CBP development. In the CBP with *T. hirsuta* Bm-2, the best results were obtained with HSR-1E. 14.14 g/L of ethanol was produced, an increase of 13.21% in concentration compared to HSR-C (12.49 g/L), simultaneously there was a 72.22% reduction in methanol concentration. However, the generated mycelium was lower (1.25 g) compared to HSR-C (1.69 g) but higher than HSR-2E (0.81 g). In contrast, *T. hirsuta* RT-1 demonstrated greater hydrolytic than fermentative capacity. Ethanol production was low compared to Bm-2, reaching a maximum of 4.16 g/L in HSR-2E with RT-1. However, HSR-C had the highest utilization of HSR (59.36%), with similar ethanol production (3.98 g/L) to HSR-2E but with higher mycelial growth (1.36 g) and the highest concentration of reducing sugars (31.25 g/L) compared to HSR-1E and HSR-2E.

INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles generan cada vez más interés tanto en países en desarrollo y desarrollados por razones de seguridad energética y ambiental. Los países en desarrollo consideran a los biocombustibles como una oportunidad para estimular el desarrollo rural, crear puestos de trabajo y ahorro de divisas [1]. Existe una correlación entre las fluctuaciones del precio del petróleo y la penetración y viabilidad económica de la producción de biocombustibles [2,3]. Sin embargo, en un mercado no regulado, los productores de biocombustibles se encuentran en una posición de pérdida de competitividad debido al aumento de precio de los insumos necesarios para la producción, lo que se refleja en un incremento en sus precios, por lo cual es necesaria la implementación de políticas favorables, como son los subsidios, reducción de impuestos y el establecimiento obligatorio de mezclas con biocombustibles [3].

El bioetanol es adicionado a la gasolina en concentraciones que varían entre el 5% y el 100% dependiendo de la legislación de cada país y las condiciones del vehículo. Por ejemplo, en Brasil se utiliza un promedio de mezcla del 27.7%, en Estados Unidos el 10% y en la unión europea se añade el 5% de etanol a la gasolina. Estas mezclas son referidas como E28, E10 y E5 respectivamente [4]. Para México se planteó la adición de 5.8% de etanol a la gasolina bajo la norma NOM-016-CRE-2016, con excepción de las zonas metropolitanas de Guadalajara, Monterrey y el Valle de México [5].

Otra forma de afrontar la pérdida de competitividad ante los combustibles fósiles es la diversificación de sus productos con base en la demanda del mercado, esto con la finalidad de mejorar su viabilidad económica al competir en otros mercados no abarrotados por los combustibles fósiles [6]. Esto se puede llevar a cabo bajo un esquema de biorrefinería, el cual utiliza algún tipo de biomasa como materia prima que se convierte, preferiblemente por completo, en una variedad de productos comerciales [1,7–9]. Las principales características de una biorrefinería son la generación acoplada de energía (biocombustibles líquidos o gaseosos), materiales (productos químicos y alimentos), la combinación de varios procesos (físicos, químicos y biológicos) y el uso de diferentes materias primas (cultivos dedicados, residuales forestales, etc.) generando una economía circular y una política de cero residuos. La economía circular generalmente es modelada como un ciclo de extracción y transformación de recursos y la distribución, uso, recuperación de bienes y materiales [10,11] para disminuir el consumo y mejorar

el aprovechamiento de los recursos. Al mismo tiempo, se reduce la generación de desechos y se incentiva la utilización de estos en procesos de reutilización y reciclaje.

De acuerdo con la academia de ciencias de Estados Unidos de América [12], el fruto del ramón (*Brosimum alicastrum*) puede ser considerado una materia prima potencial para llevar a cabo la producción de bioetanol bajo el concepto de biorrefinería, ya que a cada una de las partes del árbol ramón se le puede dar un uso práctico [13]. Este árbol se distribuye ampliamente en la península de Yucatán; actualmente no se consume de manera masiva por parte de la población [14]. La especie posee características deseables como cultivo energético como: resistencia a la sequía, alta productividad, resistencia a plagas, entre otras.

En el trabajo realizado por Olguin-Maciel y col. [15] se hace uso de la harina de semilla de ramón para la obtención de etanol, micelio y un residuo rico en proteínas a partir de harina de ramón mediante un bioproceso consolidado (BPC). Con base en este trabajo se propone evaluar la producción de bioetanol en un bioproceso bajo el concepto de biorrefinería, teniendo como objetivo realizar: una caracterización cuantitativa del fruto de ramón durante el proceso de producción de la harina de semillas, una extracción acuosa de la harina previo al BPC y caracterizar fisicoquímicamente los productos obtenidos durante el proceso.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 El árbol ramón (*Brosimum alicastrum*)

Brosimum alicastrum, cuyo nombre común en Yucatán es ramón (Figura 1.1), es una especie arbórea de la familia *Moraceae*, originaria de Mesoamérica y el Caribe [13,16]. En México se encuentra distribuida en los estados del Golfo de México y el mar Caribe, desde Tamaulipas hasta Quintana Roo; por la costa del Pacífico desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas y en el centro del país se localiza en los estados de San Luis Potosí, Durango, Estado de México, Morelos y Puebla [17].



Figura 1.1 De izquierda a derecha: árbol de ramón, corteza, hojas, flores y madera de árbol de ramón [18].

En la parte norte de Yucatán, donde prácticamente no hay suelo fértil, el ramón es una de las pocas especies forestales que realmente prospera [16]. La especie puede crecer exitosamente en plantaciones comerciales, por lo que es factible capitalizar los servicios ambientales que ofrecen y ayudar a la conservación de los ecosistemas tropicales [17].

1.1.1 Usos

Es uno de los pocos árboles tropicales del que se pueden usar todas sus partes [13]. El follaje y los son utilizados para alimentar el ganado porcino, caprino, bovino y equino [13,16]; el látex que produce el árbol es empleado como calmante del asma y como sustituto de la leche; la corteza en infusión se utiliza como tónico; la madera se puede utilizar como combustible y para fabricar mangos de herramientas, cajas de empaque y muebles [13].

El árbol de ramón ayuda en la protección contra la erosión y ha demostrado potencial como restaurador del suelo, los cuerpos de agua y la conservación de la biodiversidad [16]. Presenta abundancia reducida en la selva y constituye parte del dosel superior. Bajo los árboles se encuentran diversas plántulas sin que domine alguna especie, lo que sugiere que se favorece la regeneración y coexistencia de otras especies de árboles del dosel [19]. Su tronco contrarresta los efectos de los vientos fuertes, ya que está reforzado con contrafuertes ayudando contra la erosión del suelo debido al efecto de rompevientos. Dichas características permiten su uso como cerca viva en agrohábitats, sombra y refugio para la fauna silvestre [19,20]. En general, la plantación de árboles trae beneficios por su capacidad de captación CO₂ del ambiente, almacenándolo en forma de biomasa. La cual aporta materia orgánica al suelo mejorando la disponibilidad de nutrientes, así como el aumento de sombreado, el cual mejora la infiltración del agua y atraen insectos que actúan como polinizadores, sirven como refugios para la fauna y mejoran el paisaje [21].

1.1.2 Producción de biomasa

En un año, un árbol de ramón produce un promedio de 163.3 kg de forraje. Para las semillas, el árbol presenta dos periodos picos de producción: en primavera, del mes de marzo a mayo, siendo esta temporada la de mayor producción, y de otoño, desde el mes de julio a septiembre, presentando solo un tercio de la producción mayor. La producción media por árbol de ramón es de 95.5 kg al año. Tomando una plantación de 300 árboles por hectárea, en un año se producirían 48.9 toneladas de forraje y 28.6 toneladas de semillas [16]. Esta productividad de la biomasa es un reflejo de la producción silvestre sin manejo del árbol, lo que indica su facilidad de crecimiento, por lo que se esperaría un aumento de producción de biomasa al brindar los cuidados necesarios.

Dadas las temporadas de producción y el volumen de estas, las semillas de ramón pueden ser almacenadas temporalmente, a temperatura ambiente, en bolsas (costales) que permitan el paso del aire para regular la temperatura, de igual manera se pueden almacenar hasta por 3 meses a 5 °C, en envases herméticamente sellados [18].

1.1.3 Fruto y composición de la semilla de ramón

Los frutos de *Brosimum alicastrum* (Figura 1.2) son bayas globosas de 1.50 a 2.50 cm de diámetro, con un pericarpio carnoso y comestible con sabor y olor dulce. Son de color verde cuando está inmaduro y verde amarillento a anaranjado rojizo en su etapa de madurez. Los frutos contienen una sola semilla, de textura lisa, opaca y de color café verdoso de 1.00 a 2.00 cm de diámetro. La

semilla se encuentra cubierta de una testa papirácea opaca de color café, con los cotiledones montados uno sobre otro. Son comestibles hervidas o tostadas y tienen sabor parecido a las castañas [18,19,22,23]



Figura 1.2 De izquierda a derecha: fruto de ramón inmaduro (pericarpio verde), fruto maduro (pericarpio amarillento a anaranjado rojizo) y semilla.

Diversos estudios coinciden, en que la cantidad de carbohidratos presentes en la semilla de ramón es elevada, rondando el 75% del peso total de la semilla seca (Tabla 1.1), con un contenido de 61% de almidón [15]. Al igual que los carbohidratos, destaca la gran cantidad de proteínas que contiene la semilla. Es una fuente importante de aminoácidos, es alta en fibra, calcio, potasio, ácido fólico y vitaminas A, E, C y B [24,25].

Tabla 1.1 Principales componentes de la semilla de ramón.

Componente (g en 100g semilla en base seca)	Fuente			
	Barquera [26]	Peters [27]	Lozano [28]	Arévalo [29]
Carbohidratos	72.25	--	77.27	72.8
Proteína Cruda	12.24	12.8	10.87	10.52
Fibra	4.96	4.6	5.99	3.4
Lípidos	1.1	--	--	--
Energía**	347.86 Kcal	361 Kcal	--	--
Humedad	5.88	--	--	8.33

Nota: **Kcal en 100g de semilla base seca

Tabla 1.2 Compuestos fenólicos identificados en la semilla de ramón.

Concentración compuesto fenólico (mg/kg harina semilla de ramón)						
Fuente	Ozer [24]	Ozer [30]	Ozer [24]	Ozer [30]	Moo-Huchin [31]	
Solvente	Metanol*		Metanol**		Agua destilada	Etanol:Agua (1:1 v/v)
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	45	45	342.2	326.2	-	-
Ácido vanílico	21.15	21.6	103.9	103.9	240.3	295.7
Ácido gálico	27.06	27.1	-	-	12.9	18.8
Ácido cafeico	6.5	6.5	17.1	17.1	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	-	13.5	13.5	-	-
Ácido sinapínico	-	-	8.16	-	88.4	175.2
Ácido clorogénico	-	-	-	-	310.4	418.6
Ácido ferúlico	-	-	-	-	47.6	40.6
Ácido cinámico	-	-	-	-	16.5	16.4
Quercetina	-	-	-	-	48.2	45.1
Catequina	-	-	53	53	137.2	132.8

Nota: * Pretratamiento de hidrólisis ácida. **Pretratamiento de hidrólisis alcalina seguida de hidrólisis ácida.

De manera similar se ha demostrado que la semilla de ramón es rica en compuestos fenólicos que resultan en una capacidad antioxidante de interés con posibles propiedades funcionales. Destaca su capacidad antioxidante similar al amaranto, superior a la quínoa, pero menor que la chía. Por lo que ha sido propuesto como alimento funcional, los cuales pueden convertirse en nutraceuticos beneficiosos para la salud [22,23]. En la Tabla 1.2 se presentan algunos compuestos fenólicos identificados en la semilla de ramón. En estudios previos, se puede observar que, dependiendo del tratamiento a la semilla de ramón, el solvente utilizado y la técnica de identificación, se encontraron diferentes concentraciones de compuestos fenólicos, sin embargo, en todos los estudios se detectó la presencia de ácido vanílico con variaciones significativas según el solvente utilizado.

1.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos vegetales secundarios ampliamente distribuidos, se encuentran en frutas y verduras como: manzanas, cerezas, naranjas, cítricos, uvas, bayas, melocotones y tomates, así como en cereales, granos de café, aceitunas, hojas de té, entre otros, y forman un grupo de moléculas con estructuras químicas muy diversificadas que varían en tamaño desde una estructura simple con un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Figura 1.3) hasta complejos como las ligninas [32,33]. Se contemplan más de 8000 compuestos fenólicos identificados [34].

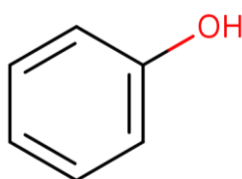


Figura 1.3 Molécula de Fenol: consta de un grupo fenilo unido a un grupo hidroxilo [35].

Existen diversas clasificaciones para los compuestos fenólicos, sin embargo, en general se pueden clasificar en siete grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos simples y condensados, estilbenos, cumarinas, lignanos y ligninas [34]. Otra clasificación es mediante la agrupación en flavonoides y no flavonoides [36].

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes en frutas y verduras, representan casi dos tercios de los compuestos fenólicos de la dieta y como grupo son los más bioactivos. El grupo de los no flavonoides incluye compuestos fenólicos con estructuras químicas muy diversas, la mayoría de ellas más pequeñas y simples que los flavonoides, pero también hay algunos compuestos con estructuras complejas y altos pesos moleculares [36].

El grupo más importante de no flavonoides son los ácidos fenólicos, que contienen un solo grupo fenilo sustituido por un grupo carboxílico y uno o más grupos OH. Los ácidos fenólicos se pueden dividir además en ácidos hidroxibenzoicos (aldehídos hidroxibenzoicos como la vanilina derivado del ácido vanílico y siringaldehído derivado del ácido sirénido), ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido clorogénico y las formas metiladas de los ácidos ferúlico y sinápico) y otros ácidos hidroxifenílicos (acético, propanoico y pentaenoico) que difieren entre ellos en la longitud de la cadena que contiene el grupo carboxílico [36]. En la Figura 1.4 se presenta algunos ejemplos de la estructura de algunos de ácidos fenólicos.

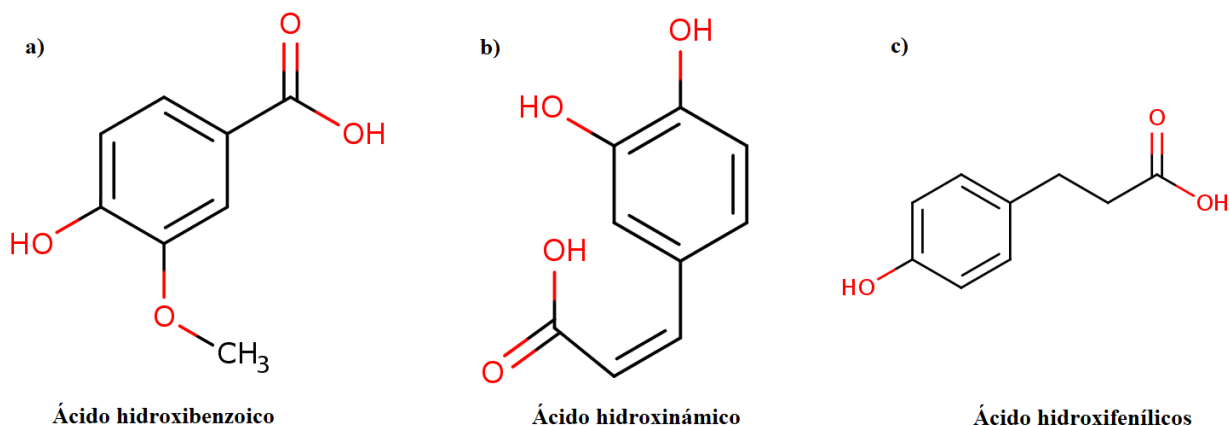


Figura 1.4 a) Ácido vanílico, b) Ácido cafeico, c) Ácido dihidro-*p*-cumárico [35].

1.2.1 Funciones de los compuestos fenólicos

Se atribuyen diversas funciones a los compuestos fenólicos, por ejemplo, la protección de la planta, así como contribuir al sabor, color, apariencia y estabilidad oxidativa (antioxidante) de frutos y verduras. Pueden exhibir actividades fisiológicas relevantes que incluyen antiinflamatorias, antiinfecciosas, antiproliferativas (anticancerígenas, antimutagénicas) y antioxidantes [34,37,38]. Este último se atribuye a su capacidad para retardar o inhibir el daño celular relacionado con la oxidación, como la peroxidación lipídica y la descomposición oxidativa del ácido desoxirribonucleico (ADN) a través de su actividad depuradora contra los radicales libres [34]. Estas características han aumentado el interés por la aplicación de los compuestos fenólicos a la salud humana debido a sus efectos beneficiosos contra varias enfermedades, así como la prevención y tratamiento de cánceres. Son fuentes de valiosos agentes terapéuticos potenciales para la modulación del sistema inmunológico y algunos de ellos han sido sometidos a ensayos clínicos. [33,37–39].

Han sido publicados informes que describen el potencial inhibidor de los compuestos fenólicos frente a las enzimas humanas [39]. La acción de los compuestos fenólicos implica mecanismos inespecíficos y específicos. Los mecanismos inespecíficos son, por ejemplo, la capacidad de captación de radicales libres y secuestro de metales de los compuestos fenólicos y sus interacciones con las membranas. Por otro lado, los mecanismos específicos incluyen la interacción de fenólicos con enzimas, con factores de transcripción o con receptores. Los inhibidores enzimáticos pueden tener muchas aplicaciones en las industrias farmacéutica, medioambiental y bioquímica, teniendo un gran impacto en el sector sanitario y médico [38].

1.2.2 Métodos de extracción e identificación de compuestos fenólicos

Debido a la importancia y el valor de los compuestos fenólicos para la salud humana, se ha estudiado e investigado la extracción de compuestos fenólicos de diferentes partes de las plantas, como hojas y semillas. Dado que los compuestos fenólicos presentan varias estructuras, tienen características físicas y químicas diferentes, las cuales tienen un papel importante en los procesos de extracción. Se pueden dividir en dos categorías, la primera categoría consta de compuestos solubles como flavonoides, quinonas, fenilpropanoides y la segunda categoría consta de compuestos insolubles como ligninas, taninos condensados y ácido hidroxilcinámico [40]. Por lo que, dependiendo de la metodología de extracción e identificación aplicada (Tabla 1.3), se obtendrán diferentes tipos y cantidades de compuestos fenólicos de cierta biomasa.

Tabla 1.3 Metodologías de extracción e identificación de compuestos fenólicos [40].

Extracción	Identificación
Líquido-Líquido	Espectroscopia UV-visible
Asistida por ultrasonido	Espectroscopia infrarroja
Asistida por microondas	Resonancia magnética nuclear
Fluidos supercríticos	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

1.3 Bioetanol

El etanol es un compuesto químico que se puede utilizar en diferentes aplicaciones, en la industria alimentaria, farmacéutica y en el sector energético. El uso de etanol como combustible comenzó a principios del siglo XX, época en la que el Ford Modelo T podía funcionar con etanol [41].

El constante aumento de la demanda de combustibles a nivel mundial, impulsa la necesidad de una mayor producción de biocombustible producida de forma sustentable, como el etanol [41]. Para lograr una buena producción de etanol, los sustratos utilizados deben ser sometidos a pretratamientos (físicos, químicos, físico-químicos y biológicos) con la finalidad de facilitar los procesos de fermentación al dejar disponibles azúcares a través de reacciones químicas de hidrólisis.

En el 2021 fueron producidos 156,600 millones de litros de biocombustibles de los cuales 102 054 millones de L correspondieron a etanol, contribuyendo con un 65.16% de la producción global de biocombustibles [42]. La Asociación de Combustibles Renovables (RFA por sus siglas en inglés)

índice que Estados Unidos es actualmente el mayor productor de bioetanol. En el año 2021 Estados Unidos tuvo una producción de 15,000 millones de galones por año a partir de maíz; Brasil es el segundo mayor productor utilizando caña de azúcar con 7,500 millones de galones por año, en tercer lugar se encuentra la Unión Europea, con una producción de 1,300 millones de litros, principalmente a partir de cultivos de remolacha azucarera y otros cultivos de almidón [43,44].

1.3.1 Materias primas para la producción de etanol

En función del tipo de biomasa (procesada y no procesada) utilizada, los biocombustibles se clasifican como biocombustible primario o secundario y según la fuente o clase de materia prima utilizada, el biocombustible secundario se subdivide en diferentes generaciones [45], este esquema está representado en la Figura 1.5.

Los combustibles de primera generación se producen a partir de cultivos alimenticios comestibles, de azúcar, almidón, aceite vegetal o grasas animales utilizando tecnologías convencionales [43,45]. Las materias primas básicas son a menudo semillas y cereales como el trigo, el maíz, caña de azúcar, sorgo, entre otros. A diferencia de la primera generación, los de segunda generación se producen a partir de una variedad de cultivos no alimentarios, estos incluyen la utilización de materiales lignocelulósicos como residuos de la agricultura, la silvicultura, la industria y cultivos energéticos [43,45]. En la tercera generación se utiliza como sustrato micro y macroalgas [45]. Por último, los de cuarta generación utilizan plantas y microorganismos modificados genéticamente para obtener una alta capacidad de captura de carbono, por consiguiente una mayor generación de biocombustibles y bioquímicos [45].

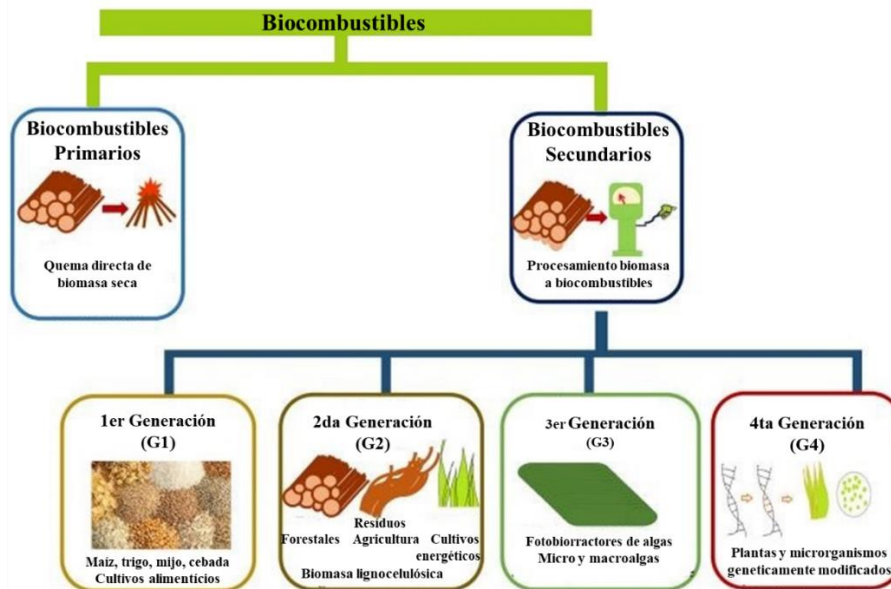


Figura 1.5 Generaciones de biocombustibles en función al tipo de biomasa [45].

1.3.1.1 Almidón

El almidón es la segunda fuente de carbono (energía) más importante y abundante en las plantas, y tienen gran demanda en el mercado por tener muchas aplicaciones en la industria. Las principales fuentes de almidón son los cereales como el maíz, los tubérculos y raíces como la papa y la yuca [9].

En la industria alimentaria se obtiene gran variedad de productos a partir del almidón. El almidón proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos, por lo que se considera como la fuente principal de energía [9,46]. Es una materia prima en la industria de la fermentación para producir etanol, la cual se utiliza como base para bebidas o como biocombustible alternativo. En la Figura 1.6 se presenta un esquema de la producción de almidón y sus diferentes aplicaciones.

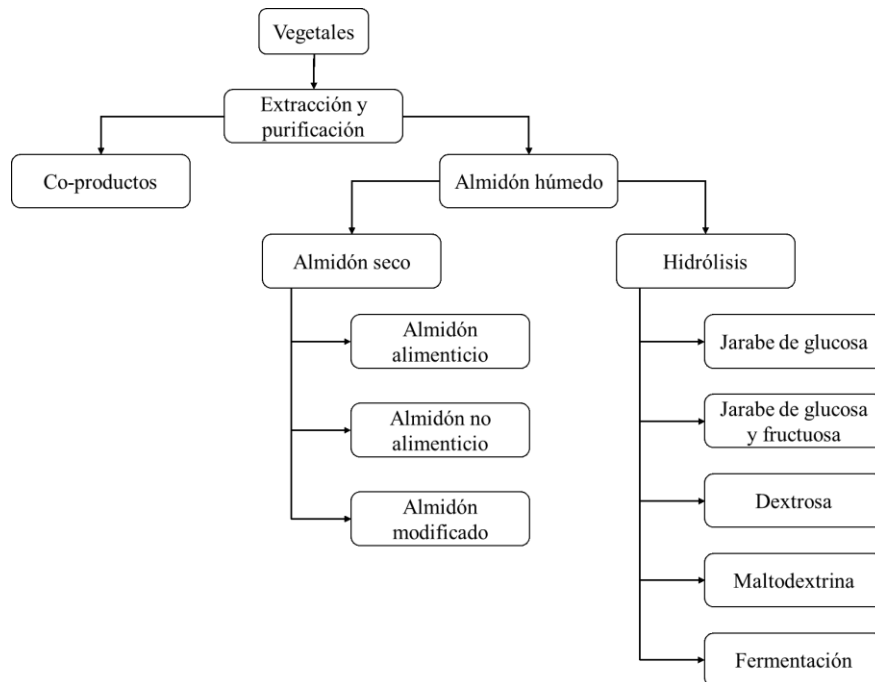


Figura 1.6 Esquema del proceso para la extracción de almidón, procesamiento y sus múltiples aplicaciones [9].

El almidón y moléculas similares se pueden encontrar en plantas, bacterias y algas. En las plantas se encuentra altas concentraciones de almidón en las estructuras reproductivas (granos), estructuras vegetativas (tubérculos, tallos), frutos (plátano, manzana, etc.) y raíces (yuca, taro). Los métodos de extracción de almidón están bien establecidos para cereales y raíces comerciales, pero deben adaptarse a las nuevas fuentes de almidón, como hojas, frutos, rizomas, tallos, legumbres, nueces y brotes de plantas, entre otros [9].

1.3.1.1.1 Estructura

El almidón es un homopolisacárido que consta de una gran cantidad de moléculas de D-glucosa que están unidas por enlaces glicosídicos. Las plantas verdes pueden producir D-glucosa a partir de la fotosíntesis, esta es usada por la planta para crecer, el exceso es almacenado como almidón en forma de gránulos [41].

La amilosa y la amilopectina son los dos componentes principales del almidón. La amilosa es un polímero lineal con pequeñas ramas laterales, compuestas por cadenas de glucano unidas por enlaces α -(1-4), la estructura se presenta en la Figura 1.7 A). La amilopectina es un polímero altamente ramificado que consta de cadenas cortas de glucano unidas por enlaces α -(1-4) y enlaces α -(1-6) en sus ramas, la estructura se presenta en la Figura 1.7 B) [41,47].

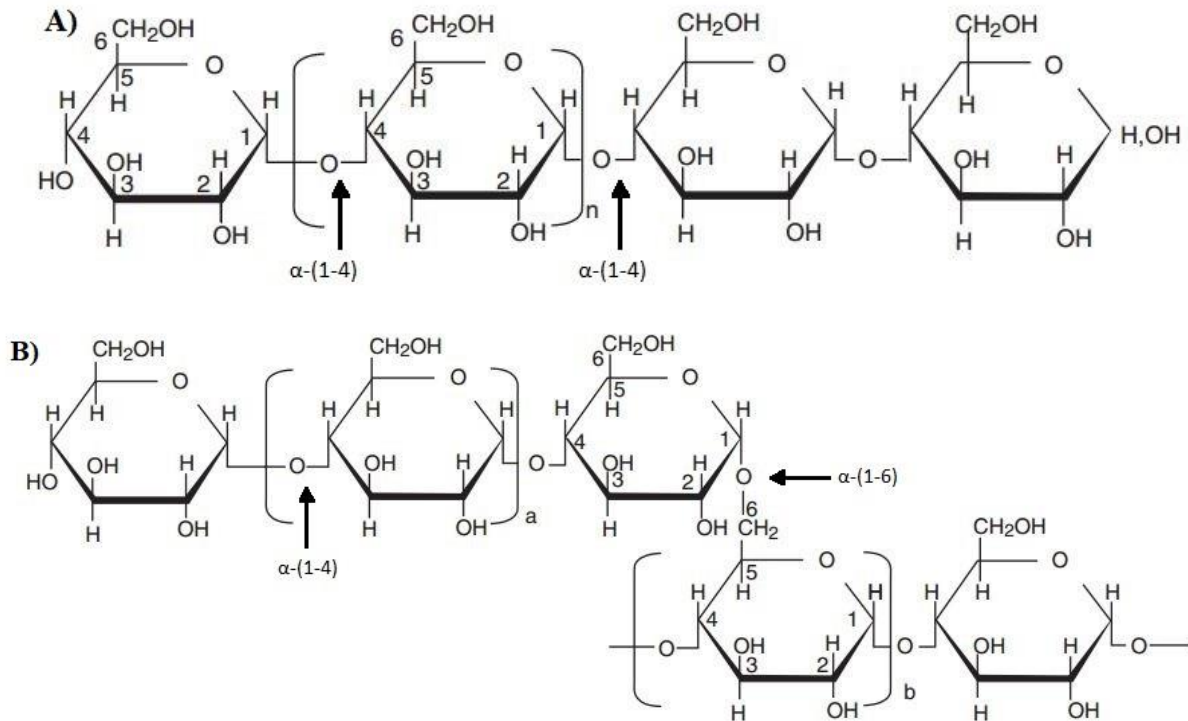


Figura 1.7 A) Estructura de la amilosa y B) estructura de la amilopectina [47].

1.3.2 Etanol a partir de almidón

Para el año 2021, la aportación de los Estados Unidos a la producción de etanol a partir de almidón alcanzó como mínimo una participación de un 51.59% en la producción mundial total de etanol (sin contar las aportaciones de otras naciones dadas sus variadas materias primas) [44]. La elección de la materia prima varía dependiendo de las regiones del mundo, se utiliza una amplia variedad de plantas que contienen almidón, por ejemplo, en Estados Unidos la materia prima utilizada es el maíz, en Europa, Canadá y muchas otras regiones el trigo y el maíz. Otros cereales como la cebada, el centeno y el triticale (cruzamiento entre el trigo y centeno) son utilizados en menor cantidad para la producción de bioetanol [41]. Otros alcoholes que se producen mediante fermentación a partir de almidón son el n-butanol o isobutanol, siendo el etanol el producto de mayor volumen producido a partir del almidón [48].

La tecnología y los pasos del proceso de conversión de la biomasa rica en almidón a etanol son diferentes a los utilizados para la biomasa lignocelulósica. El esquema de procesamiento del almidón se presenta en la Figura 1.8, donde se observan los procesos de molienda, licuefacción, sacarificación, fermentación, destilación para la obtención de etanol y los tratamientos al mosto y vinaza resultante para su utilización.

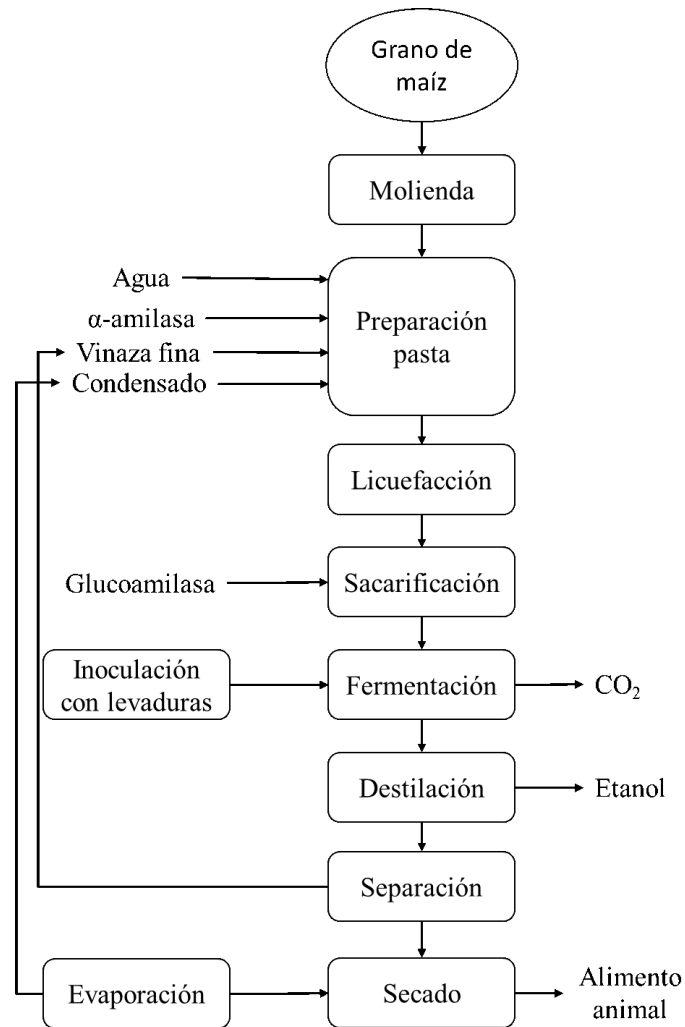


Figura 1.8 Esquema del procesamiento de materiales ricos en almidón hasta su conversión a etanol, así como el tratamiento de los subproductos obtenidos [41].

1.3.2.1 Molienda

El primer paso del proceso es la molienda (trituración) de la materia prima. Son posibles dos procesos diferentes: el proceso de molienda en húmedo o el de molienda en seco. El proceso de molienda en húmedo es más común que en seco para extraer el almidón [41,47].

La molienda es importante porque los diferentes equipos y procesos de molienda conducen a productos de diferentes tamaños de partículas y posiblemente un cambio de estructura física en el almidón, proteína, fibra y otros componentes; esto especialmente para obtener el almidón, el cual conforma más del 60% de la mayoría de los granos. Los cambios de estructura ocasionados por el proceso de molienda pueden afectar en gran medida las propiedades funcionales de la harina y/o el almidón [47].

1.3.2.2 Licuefacción

Es un proceso de dispersión de almidón insoluble en solución acuosa a partir de un proceso enzimático que utiliza amilasas. Las enzimas α -amilasas son responsables de la rápida disminución de la viscosidad de la solución de almidón al cortar las cadenas de almidón (enlaces α -(1-4)) en oligosacáridos que constan de siete a diez moléculas de glucosa [41,46].

1.3.2.3 Sacarificación

En la licuefacción se rompen únicamente los enlaces α -(1-4), es necesario descomponer las dextrinas en moléculas de glucosa individuales a través de enzimas β -amilasa y glucoamilasa. La glucoamilasa puede hidrolizar enlaces glucosídicos α -(1-4) así como enlaces glucosídicos α -(1-6), pero la velocidad de reacción es mucho más lenta. El resultado es una solución de azúcar fermentable que contiene glucosa y maltosa [41].

1.3.2.4 Fermentación

Proceso biológico de conversión de moléculas en alcohol por una variedad de microorganismos (como bacterias, levaduras y hongos) bajo condiciones anaeróbicas mediante un balance interno de oxidación/reducción de un compuesto orgánico que tiene lugar en ausencia de aceptores de electrones externos (oxígeno), la oxidación de un compuesto orgánico intermedio se acopla a la reducción de otro intermedio orgánico [49]. Los azúcares son convertidos a etanol y dióxido de carbono (CO₂) y permiten a los microorganismos obtener energía para su crecimiento [4].

1.3.2.5 Destilación

La recuperación del etanol es el paso con mayor requerimiento energético. La destilación es el proceso de separación del etanol de los sólidos y el agua en la mezcla. Para separar el etanol del agua, todo el caldo de fermentación debe calentarse hasta alcanzar el punto de ebullición del etanol (78.33 °C) [41]. Con la destilación convencional se logra concentrar el etanol en una mezcla casi azeotrópica (etanol hidratado, 95 % de etanol y un 5 % de agua). Sin embargo, para la utilización del etanol como combustible el contenido máximo de agua se encuentra entre el 0.2 al 1% (v/v) dependiendo de la legislación del país [1,41,50]. La normatividad mexicana (NOM-016-CRE-2016) establece que el etanol de tipo anhidro cuyo uso final sea el sector automotriz deben ser mezclados con gasolina, cumpliendo con las especificaciones estipuladas, la cual permite como máximo 0.5% del volumen total como agua presente en el etanol [5]. La eliminación del agua restante se puede

alcanzar mediante varios métodos como la destilación extractiva o pervaporación, la destilación azeotrópica, procesos con membranas, adsorción, la extracción con CO₂ y la recompresión de vapor. En la actualidad el proceso más utilizado es por secado por tamiz molecular. En este método, el etanol azeótropo pasa a través de capas de zeolita sintética con tamaños de poro idénticos, la cual adsorbe selectivamente moléculas de agua [1,41].

1.3.2.6 Vinaza

La vinaza es un subproducto de la destilación de alcohol, se considera que por cada litro de etanol producido se generan alrededor de 9-14 L de vinaza [51–53].

La vinaza es una rica fuente de sales y contenido orgánico. Tiene altos contenidos de potasio, calcio, magnesio, sulfato, fósforo total y nitrógeno, y concentraciones significativas de metales pesados acumulativos como el cobre. Entre los macronutrientes, el potasio es el elemento que se encuentra en mayor concentración, seguido del azufre, magnesio, nitrógeno, calcio y fósforo [52,53].

Los componentes orgánicos constituyen la mayor parte del mosto y están formados principalmente por componentes presentes en las melazas que no son capaces de fermentar, como azúcares remanentes (glucosa y fructosa), productos formados en la fermentación y que no se extraen en la destilación (glicerol y ácidos orgánicos), y los restos de levadura que no hayan sido separados en el proceso industrial [52].

La disposición correcta de la vinaza es importante debido a su composición. La disposición regular en suelos y cuerpos de agua ha causado problemas ambientales, ya que esta altera las propiedades químicas y fisicoquímicas de estas entidades ambientales. En consecuencia, se han evaluado y desarrollado usos alternativos para la vinaza, entre los que se encuentran el uso en fertirrigación, producción de composta, fertilizante orgánico para la recuperación del suelo, como complemento en la alimentación animal [53,54] y como medio de cultivo para la producción de proteína unicelular [51,52].

La vinaza recibida de la destilación es tratada en un decantador para separar los restos sólidos, la vinaza fina que puede reciclarse y concentrarse en un proceso de evaporación. La vinaza concentrada se puede mezclar con los restos sólidos para producir un alimento para animales como segundo producto [41].

1.4 Procesos para la producción de etanol

Después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática, la biomasa se fracciona en monómeros de azúcar, los cuales son fermentados para obtener etanol, sin embargo, debe tenerse en cuenta que el orden de hidrólisis enzimática, fermentación de azúcares, ya sean de hexosa o pentosa, es variable. Existen cuatro procesos para la producción de etanol a partir de biomasa y cada uno contiene un orden diferente para estos procesos [55,56]. En la Figura 1.9 se aprecian los diferentes procesos para la conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol: hidrólisis y fermentación separada (HFS), sacarificación y fermentación simultánea (SFS), sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS), y el bioproceso consolidado (BPC).

Estos procesos se aplican a la biomasa lignocelulósica, ya que luego de algún pretratamiento se obtiene celulosa y hemicelulosa, la cual al hidrolizarla obtienen hexosas y pentosas. Un concepto similar se puede aplicar para la producción de etanol a partir de almidón, cuya producción consta de varias etapas. El almidón se somete a un proceso de gelatinización seguido de un paso de licuefacción, donde el almidón se convierte en dextrinas y moléculas más pequeñas por acción de enzimas α -amilasas; este paso es seguido por la sacarificación y fermentación [15].

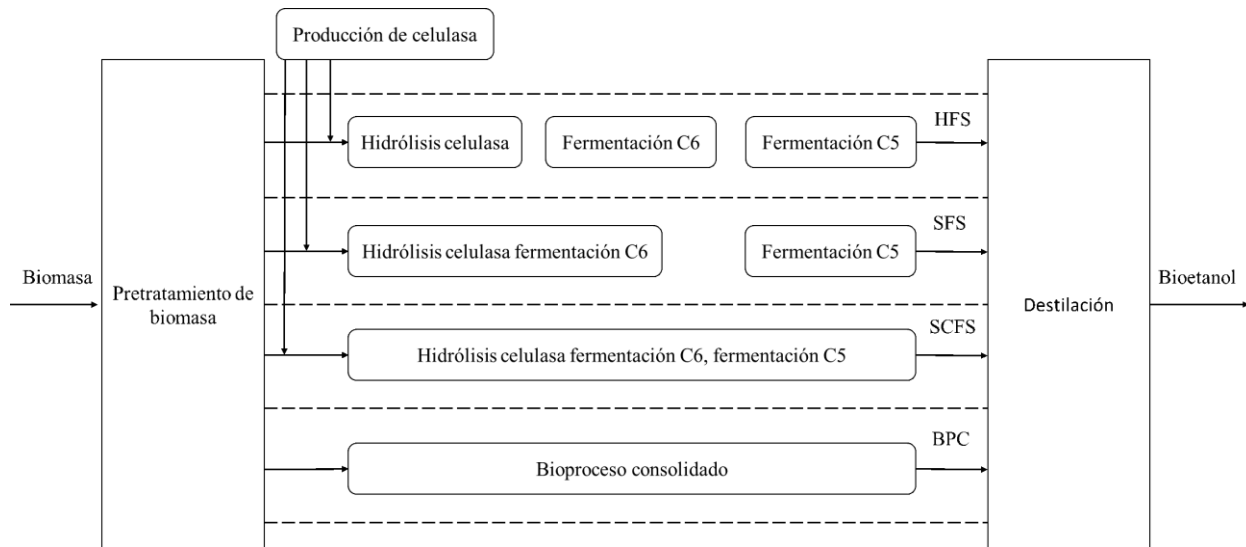


Figura 1.9 Esquemas para la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol [55].

Las rutas de HFS, SFS y SCFS requieren la producción externa de enzimas, mientras que en el BPC no. Además, SCFS y BPC son los únicos esquemas que pueden tener hidrólisis, fermentación de azúcares hexosa y pentosa, todos en el mismo reactor.

1.4.1 Hidrólisis y fermentación separada (HFS)

En este esquema la hidrólisis (sacarificación) y fermentación de la biomasa son realizadas en reactores separados y de manera secuencial, es decir, la fermentación empieza cuando el proceso de hidrólisis sea completado [55], requiriéndose la adición externa de celulasas.

Tienen la ventaja de optimizar la sacarificación, ya que se lleva a cabo a la temperatura óptima de la enzima y la fermentación al encontrarse en procesos separados, sin embargo, esto igual es una desventaja, puesto que los procesos separados aumentan los costos de producción y la posibilidad de contaminación durante el manejo [56,57].

1.4.2 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS)

Es el esquema por el cual la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente en el mismo reactor, con la adición externa de celulasas para hidrolizar la fracción de celulosa a glucosa. La hidrólisis y fermentación de hexosas se realiza en un reactor separado al utilizado en la fermentación de las pentosas presentes en la materia [1,55,57].

Tiene la ventaja que los azúcares resultantes de la sacarificación se convierten inmediatamente en etanol mediante la fermentación, evitando inhibiciones. Una desventaja es que la temperatura y pH óptimos de trabajo para las enzimas encargadas de la sacarificación y los microorganismos fermentativos son diferentes, disminuyendo la eficiencia en ambos procesos [1,57].

1.4.3 Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea (SCFS)

Este esquema es muy similar al SFS, combina la hidrólisis enzimática y la co-fermentación de azúcares hexosa y pentosa, simultáneamente mediante las enzimas específicas, en un solo reactor. Este esquema necesita de la adición de celulosa externa [1,55,58].

La ventaja que el esquema SCFS ofrece es el potencial de agilizar los tiempos de los procesos, lo que reduce los costos de capital [57], sin embargo, presenta las mismas desventajas de la SFS en cuanto las diferentes temperaturas de operación de las enzimas y los organismos fermentativos, así como la posibilidad de inhibición entre ellas mismas.

1.4.4 Bioproceso Consolidado (BPC)

Este esquema para la conversión de biomasa presenta la combinación y simplificación de múltiples pasos de procesamiento, producción de enzimas amilasas, enzima celulasa, hidrólisis enzimática y

fermentación, en un solo reactor, utilizando una sola especie de microorganismo o un consorcio de microorganismos [1,57,59]. Ofrece oportunidades de reducción de costos al eliminar la necesidad de añadir enzimas externas y de requerimientos energéticos, ya que reduce la cantidad de procesos y reactores necesitados para la sacarificación y la fermentación de pentosas y hexosas. A pesar de las ventajas que ofrece este esquema, diversas limitantes no han permitido su implementación, entre ellas se encuentra que generalmente requieren periodos largos de fermentación (entre 3 a 12 días). De igual manera, al utilizar microorganismos nativos se obtienen rendimientos y productividad baja en comparación con los microorganismos genéticamente modificados. Sin embargo, estos presentan una problemática, ya que en algunos países son fuertemente restringidos dada la preocupación por los riesgos ambientales y de salud que se asocian a estos [59–61].

1.4.4.1 Ingeniería genética de microorganismos individuales y de consorcios sintéticos

El área principal de investigación ha sido la ingeniería de microorganismos que incorporan todas las funcionalidades biológicas requeridas, ya sea en un huésped o en un consorcio de microorganismos. Las limitadas herramientas de la Biología Molecular y la complejidad para realizar manipulaciones genéticas, por ejemplo, en las rutas metabólicas, ya que el sistema típico de celulosa comprende la interacción sinérgica de diferentes enzimas, que necesitan ser co-expresadas y secretadas por los microorganismos modificados genéticamente. Estas dificultades, en conjunto con las restricciones impuestas por países, restringen los esfuerzos de Ingeniería Genética [58,62].

En la búsqueda microorganismos ideales para BPC se han aplicado dos estrategias principales: la estrategia nativa y recombinante. La estrategia nativa consiste en la identificación de microorganismos celulolíticos anaeróbicos (que fermentan naturalmente la celulosa en alcoholes y ácidos orgánicos mixtos) y su mejora en la producción de biocombustibles. Esto se realiza mediante metodologías como la evolución adaptativa (mejoramiento a la tolerancia en la concentración de etanol), limitando vías competidoras para dirigir el metabolismo hacia la producción de etanol, el desarrollo de sistemas de bioprocesamiento y fermentación, de igual manera el continuo aislamiento y caracterización de nuevas cepas con capacidades de realizar un BPC [4,58,62]. La tecnología recombinante se centra en la mutagénesis dirigida, la ingeniería genética y metabólica. Parte de microorganismos con buenas propiedades hidrolíticas para que sean fermentadores o bien, microorganismos fermentados para que sean hidrolíticos. Con el fin de ampliar su gama de

sustratos con la modificación para producir celulasas y/o hemicelulasas y permitir la fermentación de estas a biocombustibles. [1,58,62].

El enfoque de consorcios sintéticos se centra en dividir las funciones bioquímicas requeridas en microorganismos huéspedes que cuando se cultivan conjuntamente forman un consorcio microbiano sintético capaz de convertir, en un solo paso, celulosa y hemicelulosa en los productos deseados. Microorganismos especializados en hexosa y pentosa, cada uno de los cuales metaboliza exclusivamente su fuente de carbono respectiva [58]. Para la aplicación exitosa de consorcios microbianos se requiere establecer sistemas estables con la funcionalidad, el control del proceso, la eficiencia necesaria y comprender las interacciones entre microorganismo en el consorcio, ya que estos interactúan con diferentes mecanismos, como la simbiosis, la cooperación y la competencia directa [58,62].

1.4.4.1 Microorganismos de interés en BPC

Se han reportado diversos microorganismos utilizados en BPC para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico y de almidón. Se han utilizado microorganismos que secretan las enzimas lignocelulolíticas requeridas, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Humicola insolens* y como cepas fermentadoras levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* o *Kluyveromyces*) o bacterias (especies de *Clostridium*) [61].

En la Tabla 1.4 se presenta una lista ejemplos (adaptado del trabajo reportado por Salehi Jouzani y col. [62]) de microorganismos, el sustrato y la estrategia utilizada para el desarrollo de un BPC. Entre estas, se encuentra el hongo *Trametes hirsuta*, el cual ha sido reportado que tiene la capacidad de producción directa de etanol a partir de una variedad de hexosas como glucosa, manosa, celobiosa y maltosa; de igual manera, sin hidrólisis ácida o enzimática previa es capaz de fermentar almidón, salvado de trigo y paja de arroz alcanzando el 89.2%, 78.8% y 57.4% de producción teórica de etanol [63], lo que lo convierte en candidato para su aplicación en un BPC. Por consiguiente, se ha demostrado la capacidad de *T. hirsuta* Bm-2 para producir directamente etanol a partir de harina de semilla de ramón, un sustrato compuesto por un 61% de almidón, en un solo reactor mediante un BPC [4,15].

Tabla 1.4 Sistemas BPC y la tecnología utilizada en los microorganismos para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico y con almidón.

Biomasa	Microorganismo	Tecnología
---------	----------------	------------

Papel filtro	<i>Clostridium thermocellum</i>	Nativa
Glucosa	<i>T. suaveolens</i>	Nativa
Almidón	<i>T. versicolor</i>	Nativa
Almidón y salvado de trigo	<i>T. hirsuta</i>	Nativa
Almidón soluble de papa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SBCF2	Recombinante
Almidón (50 g/L)	<i>S. cerevisiae</i> SR93	Recombinante
Almidón de Papa	Cepa mutante de <i>Candida albicans</i> OMC3E6	Mutación
Celulosa	<i>C. thermocellum</i> y <i>C. thermolacticum</i>	Consortio

Nota: Adaptado de Salehi Jouzani, G y col. [62].

1.5 La biorrefinería

El concepto de biorrefinería es análogo a las refinerías tradicionales de petróleo. Las biorrefinerías conforman un proceso integrado de conversión de biomasa a través de diversos procesos, mediante tecnologías, para la generación de productos comercializables como biocombustibles, bioenergía, alimentos, productos químicos y materiales de base biológica [1,7,8,64]. De igual manera se pueden generar subproductos de los procesos, lo cuales pueden presentar potencial como productos destinados a la farmacéutica, alimento animal, plataforma para otras biorrefinerías, entre otras. En la Figura 1.10 se presenta un esquema general de una biorrefinería. Se puede apreciar como la materia prima pasa por un pretratamiento, estos pueden ser de varios tipos, para luego convertirse en la plataforma de la biorrefinería, ésta por medio de diversos procesos se convierte en los productos finales.

Las principales características de una biorrefinería son [64]:

- La generación acoplada de energía (biocombustibles líquidos o gaseosos) y materiales (productos químicos, alimentos y piensos).
- Una combinación de varios pasos del proceso (procesos mecánicos como el prensado y procesos termoquímicos como la gasificación).
- El uso de diferentes materias primas de cultivos dedicados y residuales.

Los recursos de biomasa deben utilizarse de manera energéticamente eficiente y sostenible para obtener productos (alimentos o piensos, productos químicos y materiales) y energía (biocombustibles y calor). Los recursos de biomasa se fraccionan en sus compuestos intermedios

(como proteínas, azúcares, aceites y fibras / ligninas) que son sometidos a diferentes procesos para obtener energía y productos comercializables [64].

Algunos procesos o la tecnología utilizada para la obtención de productos son de alto costo, sin embargo, la producción de compuestos de alto valor y la utilización de los subproductos generados con enfoque en sectores como productos químicos, cosméticos o medicamentos podría superar cualquier inversión mayor requerida en esta generación [8].

Desde el punto de vista de la sostenibilidad, el concepto de biorrefinería tiene como objetivo lograr una producción cero de residuos y una economía circular, utilizando los residuos como materia prima [8]. Actualmente se está aplicando el concepto de biorrefinería para empezar a sustituir los materiales derivados del petróleo.

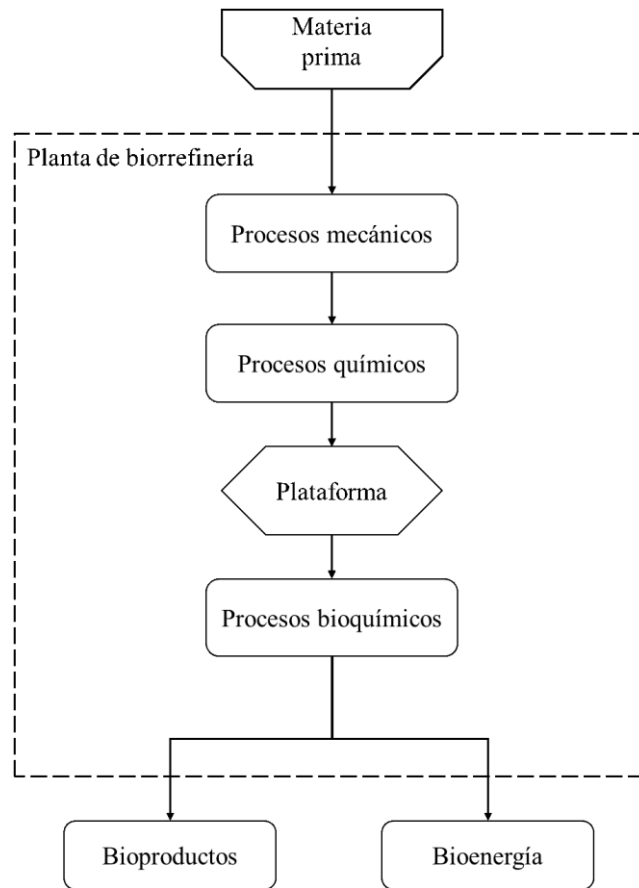


Figura 1.10 Esquema general de una biorrefinería [64].

1.5.1 Clasificación de las biorrefinerías

Existen diferentes enfoques para la clasificación de las biorrefinerías. Estas han sido clasificadas en la literatura por diferentes condiciones, entre ellas se encuentran la materia prima (primera, segunda y tercera generación), el proceso (físico, químico, biológico), el producto final (bioetanol, hidrógeno, glicerina), el intermedio (por ejemplo, gas de síntesis, lignocelulósico, de aceite vegetal) [1,7,8,64].

1.5.1.1 Clasificación de biorrefinerías por la materia prima

Los principales desafíos a los que se enfrenta la producción comercial de biocombustibles y bioproductos es la disponibilidad de materia prima. Es esencial para el funcionamiento de una biorrefinería la disponibilidad constante de materia prima. Es fundamental que esté disponible durante todo el año o se pueda almacenar en las cantidades necesarias para su procesamiento, manteniendo sus características. Las variaciones estacionales de producción u obtención de la materia prima resultan en un procesamiento ineficaz [7,8,64].

Las biorrefinerías trabajan con una gran diversidad de materias primas para la obtención de productos y se pueden clasificar por el origen de la materia prima utilizada. Desde cultivos energéticos, residuos agrícolas y ganadería, de procesamientos industriales, residuos urbanos y la biomasa obtenida mediante microalgas y cianobacterias. En cuanto los cultivos energéticos, ya que los recursos de tierra son finitos, lograr un alto rendimiento de combustible por unidad de tierra es vital para la producción sostenible de grandes cantidades de biomasa.

– Primera generación

La ventaja de este tipo de biorrefinerías es la fácil fermentación de la materia prima con un pretratamiento mínimo requerido. La desventaja es que la materia prima utilizada puede entrar en competencia con la producción de alimentos para consumo humano y / o animal o con tierras agrícolas dedicadas al cultivo de las plantas utilizadas como materia prima [8].

– Segunda generación

La ventaja que presentan estas biorrefinerías es la no competencia con alimentos o tierras de cultivo para la alimentación humana o animal. Además, el proceso de biorrefinería es un método alternativo para algunas de las estrategias convencionales para el manejo de residuos sólidos, como el vertido o la quema. La desventaja es que la materia prima varía entre las fácilmente

biodegradables hasta sustratos más complejos que requieran un paso de pretratamiento para descomponer los carbohidratos complejos en azúcares simples [8].

- Tercera generación

La ventaja es la no competencia con alimentos o tierras de cultivo. Además, la misma cantidad de biomasa producida en esta generación, en comparación con la primera generación, se puede obtener más rápidamente, debido a los diferentes períodos de crecimiento de cultivos y microalgas. La principal desventaja es la tecnología compleja involucrada, algunas de las cuales aún están en investigación y desarrollo [8].

1.5.1.2 Clasificación por la Tarea 42 de Bioenergía de la Agencia Internacional de Energía (AIE)

Este concepto de biorrefinería se utiliza en la clasificación realizada por la Tarea 42 de Bioenergía de la Agencia Internacional de Energía (AIE). Las biorrefinerías se clasifican en esta oficina como plataformas (como azúcar o gas de síntesis), productos (energía o materiales, cultivos o residuos) y procesos de conversión (bioquímicos, termoquímicos, químicos o mecánicos) [8,64].

- Plataformas

Las plataformas son la característica más importante en este tipo de clasificación. Productos intermedios en la estructura de la biorrefinería que pueden transformarse en otros productos intermedios o finales, vínculos entre diferentes conceptos de biorrefinería, o productos finales de una biorrefinería, por ejemplo, los aceites extraídos por presión de semillas, celulosa y hemicelulosa de biomasa lignocelulósica, gases de síntesis, almidón, lípidos obtenidos de algas, etc. [7,64]

El número de plataformas involucradas es una indicación de la complejidad del sistema. Las plataformas pueden representar mezclas de compuestos o compuestos más aislados. En la Figura 1.11 se presentan las posibles plataformas que puede tener una biorrefinería.

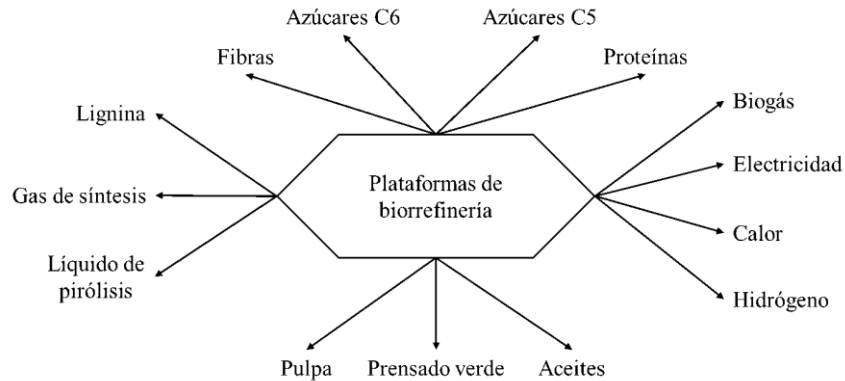


Figura 1.11 Posibles plataformas de una biorrefinería [64].

– Productos

Los productos son el resultado del fraccionamiento y procesamiento de la biomasa inicial. Los dos grupos de productos de las biorrefinerías son la energía (bioetanol, biodiesel, electricidad, calor y biocombustibles sintéticos), y otros productos (como materiales, químicos, y alimentos).

– Procesos

Los procesos son las técnicas aplicadas a la materia prima con la finalidad de transformarlas a productos. Se puede aplicar una clasificación debido a cuatro procesos principales de conversión [1,64]: bioquímicos, termoquímicos, químicos y mecánicos.

1.5.2 Nomenclatura de la descripción de una biorrefinería

Al describir una biorrefinería, la plataforma y las materias primas se toman en consideración y se especifican en el nombre; además, también se pueden nombrar los productos primarios. La denominación de un sistema de biorrefinería consta de los siguientes cuatro elementos [64]:

- Nombre y número de las plataformas
- Materia prima
- Productos
- Procesos opcionales

Tomando de ejemplo la Figura 1.12, donde se presenta un esquema de biorrefinería a partir de plantas oleaginosas, la nomenclatura para este sistema es: “Biorrefinería de 1-Plataforma (aceite) a partir de cultivos de semillas oleaginosas para biodiesel, glicerina y alimento mediante prensado, esterificación y destilación”, en inglés “1-platform (oil) biorefinery using oilseed crops for biodiesel, glycerin, and feed via pressing, esterification, and distillation”

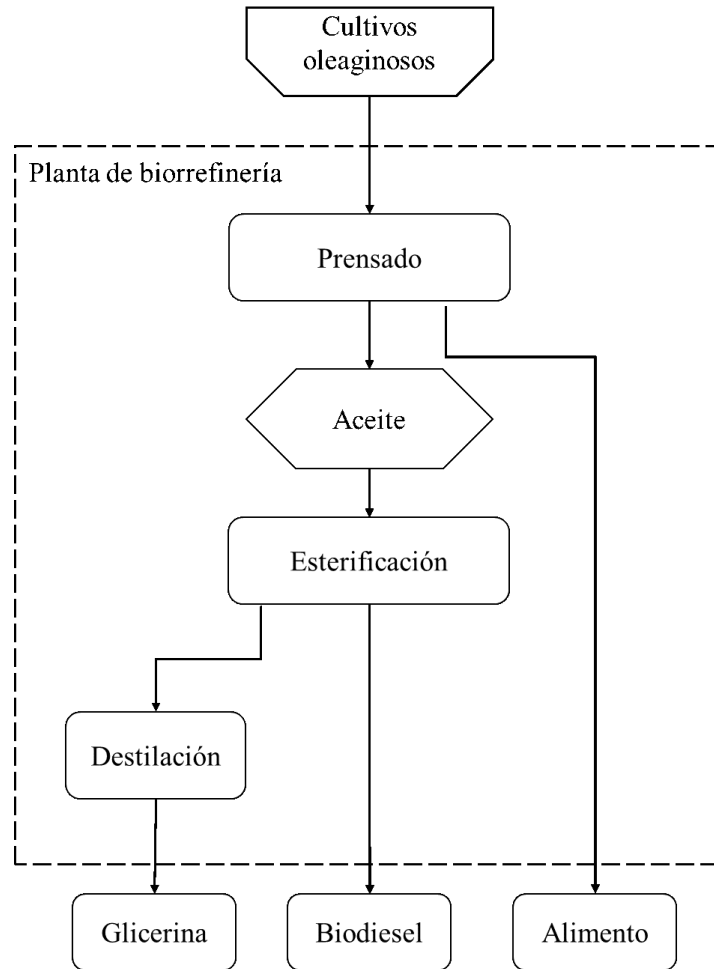


Figura 1.12 Esquema simple de una biorrefinería a partir de cultivos de semillas oleaginosas [64].

1.5.3 La biorrefinería a partir de almidón.

Las materias primas para las biorrefinerías de almidón incluyen cultivos de cereales como el maíz, trigo, arroz, así como la papa y la yuca. Después del tratamiento mecánico, el almidón se suspende en agua y se separan las fibras y las proteínas; estos últimos subproductos se utilizan normalmente para la producción de alimento. El almidón se puede comercializar directamente o después de una modificación química o física para la industria alimentaria, papel y cosméticos. Otra opción surge de la hidrólisis del almidón, lo que da como resultado soluciones de dextrosa o glucosa que pueden utilizarse para la producción de etanol y otros productos de la fermentación como el ácido láctico o succínico [7]. En la Figura 1.13 se presenta un esquema de biorrefinería de almidón a partir de maíz en la que se presentan estas opciones.

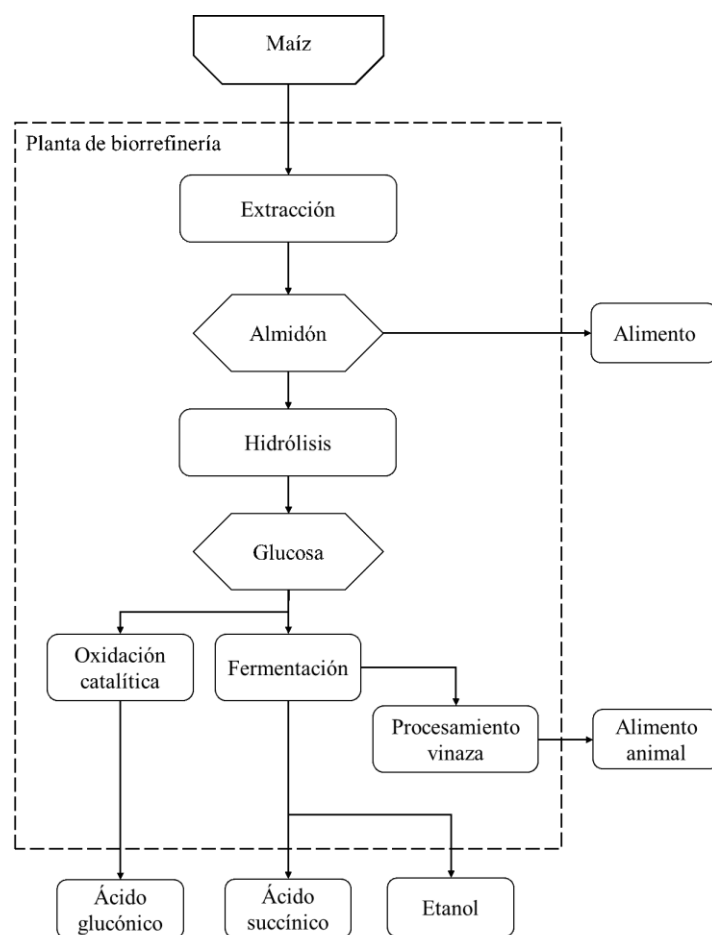


Figura 1.13 Esquema biorrefinería de almidón a partir de maíz [7].

En la Tabla 1.5 se presentan algunos ejemplos de biorrefinerías a partir de almidón existente en los que los productores extienden sus cadenas de valor a diversos productos. Los biocombustibles y los productos químicos de base biológica deben competir en costo y rendimiento con los petroquímicos y los combustibles derivados del petróleo [48].

Tabla 1.5 Compañías con biorrefinería de almidón [48].

Compañía	Materia prima	Producto
OPXBIO-Dow	Dextrosa (maíz), sacarosa (caña)	Ácido acrílico
Chemical DuPont	Dextrosa (maíz)	1,3-propanediol (POD)
BIOAMBER	Maíz, trigo, yuca, arroz, caña de azúcar, remolacha dulce.	Ácido succínico
Myriant	Semilla de sorgo, sémola, rastrojo de maíz, pellets de madera	Ácido succínico
Gevo68 million liter	Maíz, trigo, sorgo, cebada y caña	Iso-butanol

1.5.4 BPC para la producción de etanol.

El concepto de BPC ha sido propuesto para la optimización de las biorrefinerías [1,7]. El BPC ofrece la mayor reducción de costos de cualquier mejora de proceso considerado hasta la fecha en la biorrefinerías, estos beneficios económicos mejoran la viabilidad económica de las biorrefinerías. Los ahorros de costos logrados por BPC son el resultado de la reducción de los costos de capital y los costos operativos que se producen cuando se elimina el paso dedicado a la producción de enzimas.

El problema con el BPC es la complejidad del microorganismo necesitado para poder realizar el proceso en un solo paso, la limitación de las técnicas de biotecnología para modificar microorganismos ha producido avances, sin embargo, microorganismos para aplicaciones comerciales aún no están disponibles [1,7]. Olguin-Maciel y col. [15] presentó un estudio de la cepa nativa de hongo *T. hirsuta* Bm-2 para la producción de etanol a partir de harina de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*), los resultados demuestran la capacidad de este hongo para realizar un BPC sin usar enzimas ni fuentes de nitrógeno externas con la que se estimó una producción de 123.4 mL de etanol por kg de harina de semilla de ramón.

1.6 Economía circular

El sistema socioeconómico actual se basa en un modelo lineal, el cual asume la existencia de una fuente ilimitada de recursos naturales, al igual que una capacidad ilimitada del medio ambiente para la absorción de desechos y contaminación [10]. Para evitar el agotamiento de los recursos naturales y de la capacidad del medio ambiente se necesita un nuevo modelo económico con el objetivo de disminuir el consumo y mejorar el aprovechamiento de los recursos, al mismo tiempo, reduciendo la generación de desechos e incentivando la utilización de estos en procesos de reutilización y reciclaje [10,11].

La economía circular generalmente se modela como un ciclo de extracción y transformación de recursos y la distribución, uso y recuperación de bienes y materiales (Figura 1.14). Primero, las empresas toman recursos del medio ambiente para transformarlos en productos y servicios, estos luego son distribuidos a los consumidores u otras empresas en puntos de venta, y los productos / servicios son utilizados por los consumidores en el mercado. En este punto, el ciclo es completado a través de la recuperación de bienes [11].

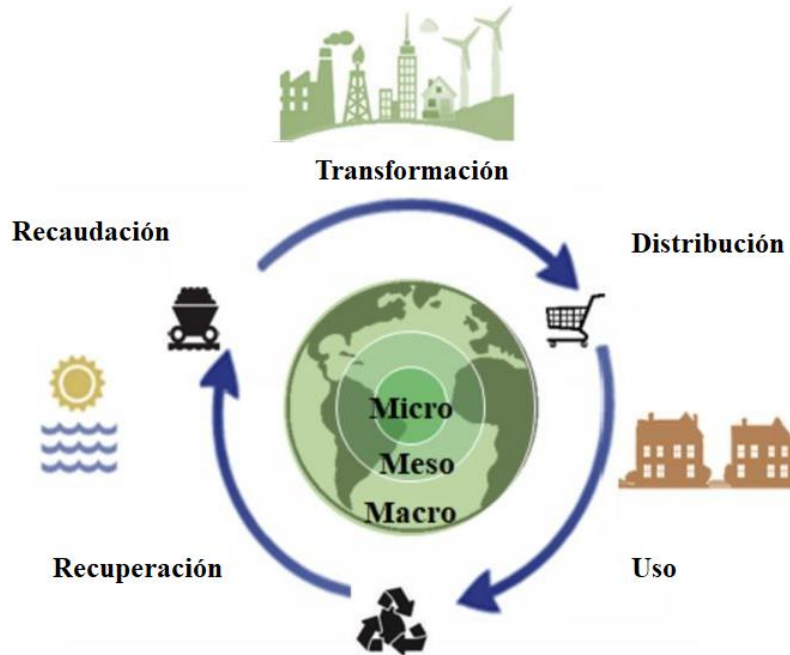


Figura 1.14 Ciclo de la economía circular [11].

La economía circular se basa en 4 principios: (1) preservar y mejorar el capital natural, controlando las existencias finitas y equilibrando los flujos de recursos renovables, (2) optimizar el rendimiento de los recursos, haciendo circular productos, componentes y materiales al más alto nivel de uso en todo momento, (3) un enfoque multinivel para la utilización de recursos y su estrecha relación con la forma en que la sociedad innova, y (4) promover la eficiencia del sistema identificando y diseñando externalidades negativas [10,11].

Existen diversas definiciones sobre la economía circular, tanto de instituciones oficiales como organizaciones, asociaciones no oficiales (no gubernamentales, sin fines de lucro, etc.) así como científicos y profesionales sobre el tema. Prieto-Sandoval [11] realizó una revisión del estado del arte en cuanto al concepto de economía circular para establecer una definición consensuada, como resultado definió a la economía circular como un sistema económico que representa un cambio de paradigma en la forma en que la sociedad humana se interrelaciona con la naturaleza y tiene como objetivo prevenir el agotamiento de los recursos, cerrar los circuitos de energía y materiales, y facilitar el desarrollo sostenible a través de su implementación a nivel micro (empresas y consumidores), meso (agentes económicos integrados en simbiosis) y macro (ciudad, regiones y gobiernos).

JUSTIFICACIÓN

El bioproceso consolidado a partir de la harina de semilla de ramón integra en un solo paso la producción de enzimas para la hidrólisis del sustrato y la fermentación a etanol, sin embargo, presenta rendimientos menores y tiempos de espera largos en comparación a otros tipos de procesos de producción de etanol. A pesar de esto, presenta una ventaja: se producen co-productos (metanol, micelio, harina residual, y de la destilación una vinaza). Estos co-productos representan un área de oportunidad para su utilización.

Por esto, se propone valorizar la semilla de ramón bajo un concepto de biorrefinería. Evaluar los efectos de la remoción de compuestos solubles en agua presentes en la harina de semilla de ramón en la producción de etanol y de los co-productos obtenidos a través de un BPC. Con el objetivo de plantear un esquema de biorrefinería para el aprovechamiento integro de la semilla de ramón, destinando a los co-productos obtenidos como productos de valor agregado o su destinación a otros procesos para la generación de más productos.

HIPÓTESIS

La extracción de compuestos solubles en agua presentes en la harina de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*), incrementará la producción de etanol y co-productos de valor agregado a través de un bioproceso consolidado bajo un concepto de biorrefinería.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de realizar extracciones con agua sobre harina de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) en la producción de etanol y co-productos (metanol, micelio, harina residual) a través un bioproceso consolidado utilizando *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1 bajo un concepto de biorrefinería.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar una metodología para la extracción de compuestos solubles en agua presentes en la harina de semilla de ramón.

Caracterizar fisicoquímicamente e identificar mediante HPLC los compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos/acuosos.

Evaluar el efecto de la remoción de compuestos solubles en la producción de etanol y en la obtención de co-productos en un bioproceso consolidado.

Caracterizar fisicoquímicamente los co-productos obtenidos del bioproceso consolidado para su posible aprovechamiento bajo un concepto de biorrefinería.

Plantear una estrategia de aprovechamiento de la harina de semilla de ramón a través de un bioproceso consolidado bajo un concepto de biorrefinería.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia experimental

El trabajo realizado se dividió en tres etapas (Figura 2.1). La primera etapa abarcó la obtención y acondicionamiento del fruto de ramón para su conversión en harina de semilla de ramón (HSR). Aplicación y evaluación mediante análisis estadístico del tratamiento de extracción de compuestos solubles en agua presentes en la HSR y la cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC en la fracción líquida. La segunda etapa consistió en la realización de un bioproceso consolidado (BPC) utilizando la fracción sólida (HSR) seleccionada en la etapa 1. A la par se realizó una cinética de azúcares reductores, enzimática y fenoles totales. Por último, la etapa 3 consistió en la cuantificación de etanol y caracterización de los subproductos obtenidos en el BPC.

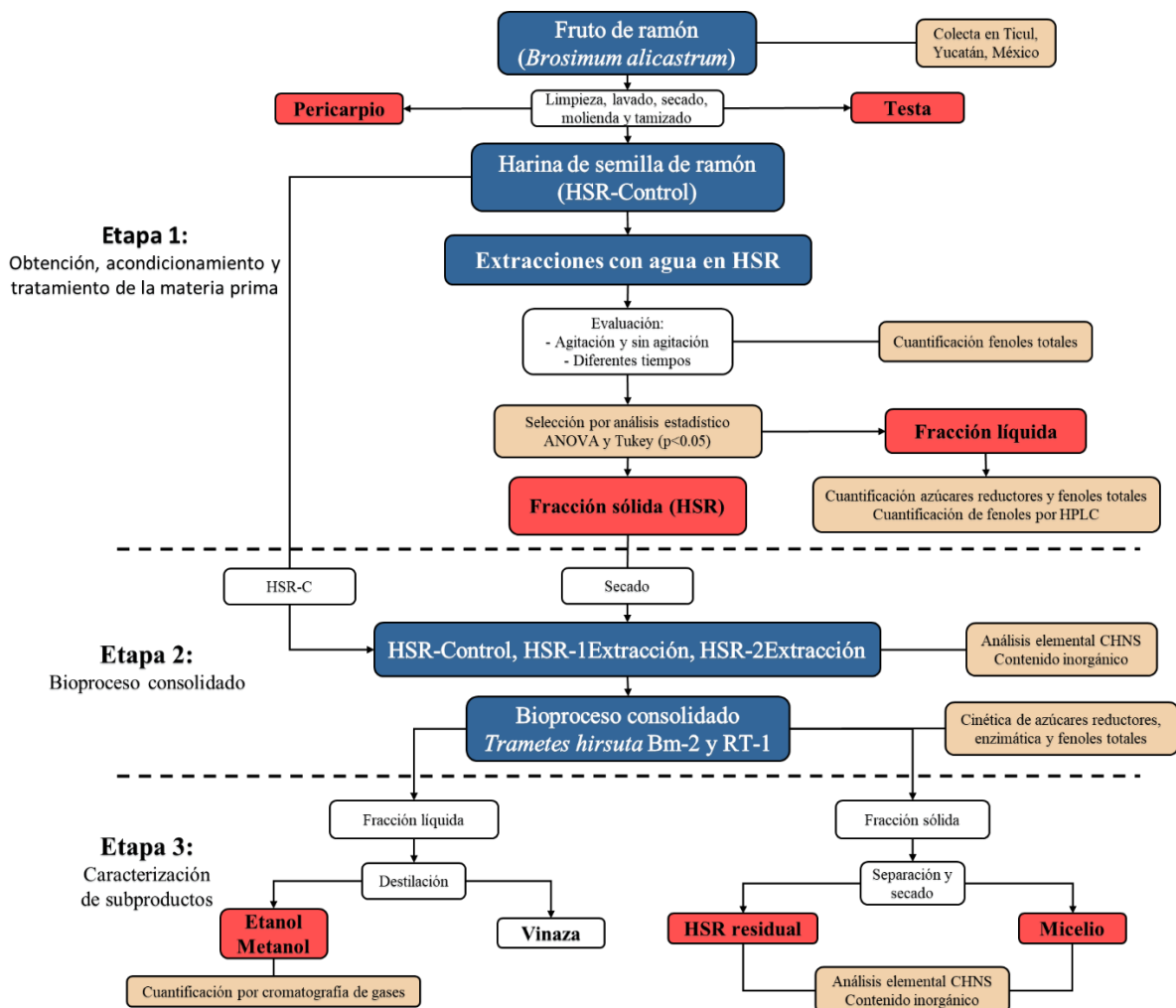


Figura 2.1 Diagrama de la estrategia experimental empleada en este trabajo.

2.2 Harina de Semilla de Ramón (HSR).

Para la realización de este trabajo fue utilizada harina de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*), la cual fue obtenida a partir de frutos de ramón con diámetro mayor a 2 cm (color amarillento a anaranjado rojizo) recolectados en Ticul, Yucatán, México. Los frutos fueron lavados con agua purificada para remover impurezas, posteriormente el pericarpio fue separado de las semillas y almacenado a 4 °C. Las semillas obtenidas fueron secadas a 70 °C por 72 h en un horno Binder, Fed modelo 115® (Tüttligen, Alemania), posterior al secado la testa de la semilla fue separada y almacenada en bolsas Ziploc®. Las semillas secas y limpias se molieron en una licuadora comercial WARING® Laboratory CB15, la harina obtenida fue tamizada. El tamaño de partícula utilizado fue entre el rango de 106 a 300 µm. Esta HSR fue utilizada como el control (HSR-C).

2.2.1 Extracción de compuestos solubles en agua.

En la Tabla 2.1 se presentan las 2 metodologías evaluadas para las extracciones de compuestos solubles en agua de la HSR: sin agitación y agitación a 150 rpm durante 2, 4 y 6 h en oscuridad a 25 °C; en ambos casos las pruebas se realizaron por triplicado. Las extracciones se realizaron mediante matraces de 250 mL, en el cual se preparó una solución de HSR-C y agua destilada con una concentración del 14 % (p/v). Con respecto a la metodología sin agitación, la solución fue homogenizada con ayuda de una espátula de acero inoxidable y dejada en reposo en oscuridad a 25 °C durante el tiempo correspondiente. En cuanto a la agitación, los vasos se colocaron en una incubadora rotatoria modelo ZHWY-200D (Zhicheng, Shanghai, China) en agitación a 150 rpm en oscuridad a 25 °C durante el tiempo correspondiente.

Tabla 2.1 Relación de método de extracción: sin agitación y con agitación a diferentes tiempos.

Método extracción	Tiempo	Condiciones
Sin agitación	2 h	14% (p/v) de HSR-C/agua
	4 h	14% (p/v) de HSR-C/agua
	6 h	14% (p/v) de HSR-C/agua
Agitación	2 h	14% (p/v) de HSR-C/agua, agitado 150 rpm
	4 h	14% (p/v) de HSR-C/agua, agitado 150 rpm
	6 h	14% (p/v) de HSR-C/agua, agitado 150 rpm

Nota: Las extracciones fueron realizadas en oscuridad a 25 °C.

Mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de medias Tukey ($p < 0.05$) con respecto al contenido de FT se determinaron las mejores condiciones para proceder con las extracciones. Esta resultó ser la metodología de 14% (p/v) de HSR/agua agitado a 150 rpm por 2 h en oscuridad a 25 °C.

Se realizó una segunda evaluación. En esta, se determinó la cantidad de extracciones a realizar sobre la HSR, con base al contenido de FT, mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de medias Tukey ($p < 0.05$). Se utilizó la metodología seleccionada previamente siguiendo la relación dada por la Tabla 2.2. En un vaso de precipitado de 1 L donde se preparó una solución de HSR y agua destilada con una concentración del 14 % (p/v), posteriormente se colocó en agitación en oscuridad a 25 °C por 2 h a 150 rpm en incubadora rotatoria. La fase acuosa se recuperó por filtración con una malla de nailon de 250 μm , mientras que la fase sólida de HSR (denominada HSR-1E) restante se secó a 70 °C por 72 h. Se realizó una segunda extracción sobre la HSR-1E, manteniendo las mismas condiciones descritas en la primera extracción, obteniendo una harina denominada HSR-2E. Esta extracción secuencial fue continuada sobre HSR-2E, obteniendo una harina con 3 extracciones (HSR-3E) y posteriormente sobre HSR-3E, obteniendo una harina con 4 extracciones (HSR-4E). Las fases acuosas de cada extracción fueron recuperadas y filtradas. Con base al análisis estadístico se procedió a utilizar 1 y 2 extracciones secuenciales de 14% (p/v) de HSR/agua, agitado a 150 rpm por 2 h en oscuridad a 25 °C. Por consiguiente, las harinas utilizadas para los experimentos son HSR-C, HSR-1E y HSR 2-E.

Tabla 2.2 Relación de harina de semilla de ramón y número de extracciones.

#Extracciones	Fracción sólida	Fracción líquida	Condiciones
1	HSR-1E	E1	14% (p/v) de HSR-C/agua, agitado 150 rpm por 2 h
2	HSR-2E	E2	14% (p/v) de HSR-1E/agua, agitado 150 rpm por 2 h
3	HSR-3E	E3	14% (p/v) de HSR-2E/agua, agitado 150 rpm por 2 h
4	HSR-4E	E4	14% (p/v) de HSR-3E/agua, agitado 150 rpm por 2 h

Nota: Posterior a cada extracción la harina correspondiente fue secada a 70 °C por 72h. Las extracciones fueron realizadas en oscuridad a 25 °C.

2.3 Cualificación y cuantificación de compuestos en la fracción líquida.

2.3.1 Azúcares Reductores (AR)

Se realizaron las cuantificaciones de AR para las extracciones de HSR y en el BPC mediante el método de Miller [65] con ligeras modificaciones. La metodología modificada consistió en añadir 1 mL (con dilución adecuada) de muestra, la cual se le adicionan 1.5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La mezcla se hirvió durante 5 minutos, posteriormente se sumergió en un baño de agua fría a 4 °C para detener la reacción e inmediatamente se agregan 7.5 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm, en un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer Basic, Hamburgo, Alemania) y la concentración se determinó calculando los valores con base a una curva estándar de glucosa expresada en mg/mL.

2.3.2 Fenoles Totales (FT)

La concentración de FT en las extracciones de HSR y en el BPC se determinó mediante la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu [66]. Se mezclaron 100 µL de muestra, adicionada con 1500 µL de agua destilada y 100 µL de reactivo Folin (10% v/v). La mezcla se incubó en oscuridad a 40 °C por 5 min. Inmediatamente, se añadió 300 µL de carbonato de sodio al 75% y se incubó en oscuridad a 40 °C por 30 min. Finalizado el tiempo se leyó la absorbancia a 740 nm en un espectrofotómetro. El contenido fenólico de las muestras se expresó a través de una curva estándar como equivalentes de ácido gálico (EAG).

2.3.3 Actividad enzimática lacasa

La actividad enzimática lacasa se determinó mediante la oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) [67]. La mezcla de reacción contenía 100 µL de buffer de acetato de sodio 1 M (pH 4.5), 100 µL de ABTS (5 mM) y 700 µL de agua destilada y se incubó en oscuridad a 40 °C durante 5 min. Finalizada la incubación se agregó 100 µL de muestra (proveniente del BPC) para un volumen total de reacción de 1 mL. La mezcla se incubó en oscuridad a 40 °C durante 20 min. La oxidación del ABTS se determinó por el incremento de la absorbancia a 420 nm mediante un espectrofotómetro. Una unidad de enzimática de la lacasa (U_L) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto en las condiciones del ensayo. La cantidad de enzima producida fue expresada como U_L /mL.

2.3.4 Actividad enzimática α -amilasa

La actividad enzimática α -amilasa se determinó por el método descrito por Wang et al. [68]. La mezcla para el análisis consistió de 0.9 mL de almidón soluble de papa (1% p/v) (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) en buffer de fosfato 50 mM (pH 5.0) como sustrato y 0.1 mL de muestra (proveniente del BPC). La mezcla se incubó durante 10 min a 75 °C, al término se transfieren a 4 °C para detener la reacción. La hidrólisis del almidón se determinó a través de la cuantificación de AR producida durante la incubación por el método de DNS de Miller previamente descrito. La cantidad de enzima producida se expresó como U_{α} /mL, definiendo una unidad enzimática de la α -amilasa (U_{α}) como la cantidad de enzima que libera un μ mol de AR equivalente a glucosa por min bajo las condiciones del ensayo.

2.4 Cuantificación de fenoles por HPLC

Para la cuantificación de fenoles por HPLC de la fase líquida de las extracciones de HSR, las muestras se filtraron con membrana de Nylon (Agilent) de 45 y 20 μ m, posteriormente diluidas al 50% en una mezcla de 50% Acetonitrilo y 50% agua ultrapura. La separación se llevó a cabo en un cromatógrafo de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) modelo 1260 INFINITY II con inyector manual (Agilent Technologies, GA, EAU) equipado con detector UV y una columna Eclipse Zorbax C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m (Agilent Technologies, GA, EAU). Se inyectaron 20 μ L de muestra. La fase móvil consistió en una mezcla de 86% Acetonitrilo, 14% agua ultrapura y 0.1% de ácido fórmico, con un flujo de 0.600 mL/min, la temperatura de la columna es de 40 °C y el detector UV a 290 nm. Se realizó una curva de calibración con una mezcla de estándares de ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico y siringaldehído (Agilent, grado HPLC) con tiempos de retención de 5.2, 15.4, 16.1, 27.65 y 30.9 minutos respectivamente.

2.5 Caracterización para la HSR y micelio generado en el BPC

2.5.1 Determinación de humedad

El contenido de humedad se realizó siguiendo el procedimiento TP-510-42622 establecido por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable [69]. Consistió en depositar 1 g de muestra secada a 70 °C por 72 h en un crisol a peso constante, el crisol con la muestra se colocó a secar en un horno a 105 °C por 24 h, posterior se registró el peso del crisol y la muestra a peso constante. El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente ecuación y es expresado como porcentaje del peso de la muestra seca mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso}_{\text{crisol+peso muestra}} - \text{Peso}_{\text{crisol+muestra peso constante}}}{\text{Peso}_{\text{crisol+muestra}}} \times 100$$

2.5.2 Determinación de cenizas en biomasa

El contenido de cenizas fue realizado siguiendo el procedimiento TP-510-42622 establecido por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable [69]. El cual consistió en la incineración de una muestra de biomasa depositada en un crisol en una mufla programada con una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta llegar a 105 °C y se mantuvo por 12 min; seguida de una rampa de 10 °C/min hasta los 250 °C y se mantuvo por 30 min y por último una rampa de 20 °C/min hasta los 575 °C manteniendo por 180 min. Una vez finalizado el tiempo, dejar que disminuya la temperatura hasta 105 °C y mantener a 105 °C hasta que se retire el crisol para su registro de peso. El contenido de cenizas es expresado como el porcentaje de residuos que queda después de la oxidación mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{\text{Peso}_{\text{crisol+cenizas}} - \text{Peso}_{\text{crisol}}}{\text{Peso}_{\text{crisol+muestra peso constante}}} \times 100$$

2.5.3 Contenido de proteína

El contenido de proteína se determinó de forma indirecta a partir del contenido de nitrógeno total (N) presente en la muestra y el factor de Jones de 6.25 [70] mediante la ecuación:

$$\text{Contenido de proteína} = \text{Nitrógeno total} \times 6.25$$

2.5.4 Análisis elemental CHNS

Se realizó la caracterización de la biomasa a través del análisis elemental (Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno y Azufre) mediante un analizador elemental orgánico Thermo Scientific FLASH 2000 (Waltham, MA, EEUU). Las mediciones fueron realizadas por duplicado y se reportó el valor promedio [71].

2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

La estructura de la HSR-C y los efectos ocasionados durante el bioproceso, se observaron en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6360LV, JEOL (Tokio, Japón). Las muestras se

colaron en un barril metálico con cinta adhesiva de doble cara y recubiertas con una capa de oro de 15 nm para su observación en 20 kV a distintos aumentos [15].

2.7 Condiciones del Bioproceso Consolidado (BPC)

Se utilizaron dos cepas de *Trametes hirsuta*, Bm-2 y RT-1, las cuales fueron aisladas y caracterizadas previamente por Tapia-Tussell [72]. Las cepas se mantuvieron mediante resiembras periódicas en cajas Petri con medio PDA en una incubadora Labnet modelo 211DS (Edison, NJ, EEUU) a 35 °C

Las condiciones del BPC son las descritas por Olguin-Maciél, E et al. [15] en cuanto al porcentaje de carga HSR/agua destilada (p/v) óptimo y temperatura de incubación. Los experimentos de BPC se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de una suspensión individual para HSR-C, HSR-1E y HSR-2E y agua destilada con un porcentaje de carga 14% (p/v). Los matraces fueron tapados con doble hoja de papel aluminio y se esterilizaron a presión constante de 0.1 MPa, 121 °C por 20 minutos en una autoclave modelo SM510 (Yamato Sterilizer, Tokio, Japón). Terminada la esterilización, los matraces se enfriaron a temperatura de 25 °C. Los matraces se inocularon con un disco de micelio de 1 cm de diámetro de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1 crecidos durante 4 días en placas Petri con medio PDA incubadas a 35 °C. Posteriormente, se incubaron a 35 °C durante 12 días en oscuridad sin agitación en una estufa de cultivo BINDER modelo BD Avantgarde (Tuttlingen, Alemania). La relación de cepa de *T. hirsuta* inoculada y la harina de semilla de ramón empleada en el bioproceso consolidado se presenta en la Tabla 2.3. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Comenzando en el día de incubación y cada 3 días se tomó una muestra de 1 mL de los matraces para las cuantificaciones de AR, FT y actividad enzimática α -amilasa y lacasa.

Una vez terminado el BPC, la biomasa del micelio se retiró del matraz y se lavó con agua destilada tres veces y secado a 70 °C. La fracción líquida y la HSR residual se separaron mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 min. La fracción líquida se filtró con papel filtro y se almacenó a 4 °C; en cuanto a la HSR residual fue secada a 70 °C por 72 h. Ambas fracciones se caracterizaron de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

Tabla 2.3 Relación de cepa de *T. hirsuta* inoculada y la harina de semilla de ramón empleada en el bioproceso consolidado.

<i>T. hirsuta</i>	Muestra	Condiciones
Bm-2	BPC-C	14% (p/v) de HSR-C/agua
	BPC-1E	14% (p/v) de HSR-1E/agua
	BPC-2E	14% (p/v) de HSR-2E/agua
RT-1	BPC-C	14% (p/v) de HSR-C/agua
	BPC-1E	14% (p/v) de HSR-1E/agua
	BPC-2E	14% (p/v) de HSR-2E/agua

Nota: Incubación a 35 °C sin agitación por 12 días.

2.8 Destilación

La fase acuosa del BPC se separó por centrifugación a 4000 rpm por 10 min en una centrífuga de laboratorio modelo Centrificient IV (CRM Globe, Tlacoquemécatl, México). Se tomaron 25 mL de muestra y se mezclaron en un matraz bola de 100 mL con 25 mL de agua destilada. Se procedió a destilar a 95 ± 2 °C hasta que se recuperaron 25 mL de una mezcla de etanol y agua.

2.9 Cuantificación de etanol y metanol por Cromatografía de Gases (CG)

Para determinar la concentración de etanol y metanol se utilizó un cromatógrafo de gases PerkinElmer modelo Clarus 690 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) equipado con detector de ionización de flama y con columna PerkinElmer Elite-WAX (L 30 m, ID 0.25, DF 0.25). El gas acarreador fue nitrógeno con presión de 5 psi y split de 10 mL/min. Las condiciones del horno fueron las siguientes: temperatura inicial 30 °C por 1 min; una rampa de 3 °C/min hasta llegar a 50 °C y se mantuvo por 3 min; seguida de una rampa de 15 °C/min hasta los 70 °C y se mantuvo por 3 min y por último una rampa de 30 °C/min hasta los 100 °C manteniendo por 4 min. La temperatura del inyector fue de 120 °C y del detector de ionización de flama en 200 °C. Se inyectaron muestras de 1 µL. Se realizó una curva de calibración con estándares de etanol y metanol de grado analítico.

2.10 Análisis estadístico

Los cálculos de desviación estándar, así como el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de medias Tukey ($p < 0.05$) para determinar las diferencias significativas de los datos obtenidos,

fueron realizados mediante el programa OriginPro® 2021 Graphing & Analysis (OriginLab, Massachusetts, EEUU).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Harina de Semilla de Ramón (HSR)

3.1.1 Rendimiento fruto de ramón

Tomando de referencia 1 kg de fruto húmedo se obtuvieron 709.6 g de semilla húmeda y 290.4 g de pericarpio, esto representa el 70.96% y 29.04% respectivamente del peso total del fruto húmedo. A partir de los 709.6 g de semilla húmeda se obtuvo posterior al secado 45.12 g de testa y 276.38 g de semilla seca, esto indica que la semilla de ramón tiene un contenido de humedad del 61.05%. La semilla limpia fue sometida al proceso de molienda y tamizando, de dicho proceso se obtuvo 262.32 g de harina de semilla de ramón, esta disminución se debe a mermas durante el proceso.

Esto representa un rendimiento en la producción de harina de semilla de ramón del 26.23% a partir del fruto húmedo recolectado; por otro lado, tomando como referencia la semilla húmeda, se obtuvo un rendimiento del 36.96%. Se estimó la producción de pericarpio, testa y HSR con base a la producción media de fruto por árbol de ramón, la cual es de 95.5 kg al año [16], lo que resulta en un rendimiento estimado de 27.73 kg de pericarpio, 4.30 kg de testa y 25.05 kg de HSR por árbol de ramón por año.

3.1.2 Extracciones de compuestos solubles en agua en harina de semilla de ramón (HSR)

En la Figura 3.1 se observa que la concentración de FT fue significativamente mayor en los tratamientos con agitación con respecto a los sin agitación. En cambio, en ambos tratamientos se encontró que no existe una diferencia significativa en la concentración de FT entre los tiempos de extracción (2, 4 y 6 h). Con base en estos resultados, el procedimiento seleccionado para las extracciones fue de 2 h de agitación a 150 rpm bajo condiciones de oscuridad a 25 °C.

Se procedió evaluar el número de extracciones secuenciales sobre una muestra de HSR (Figura 3.2), con esto se determinó que en las dos primeras extracciones (1E y 2E) se obtiene el 94.55% de los compuestos fenólicos solubles en agua. Mientras que en la tercera extracción (3E) y cuarta extracción (E4) la concentración cae drásticamente hasta 0.19 y 0.02 gEAG/L respectivamente, en donde el análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa entre estos. A partir de este análisis, se procedió a realizar HSR con una extracción (HSR-1E) y con doble extracción

secuencial (HSR-2E) que fueron utilizadas en el BPC en conjunto con una HSR control (HSR-C) a la cual no se le realizaron extracciones.

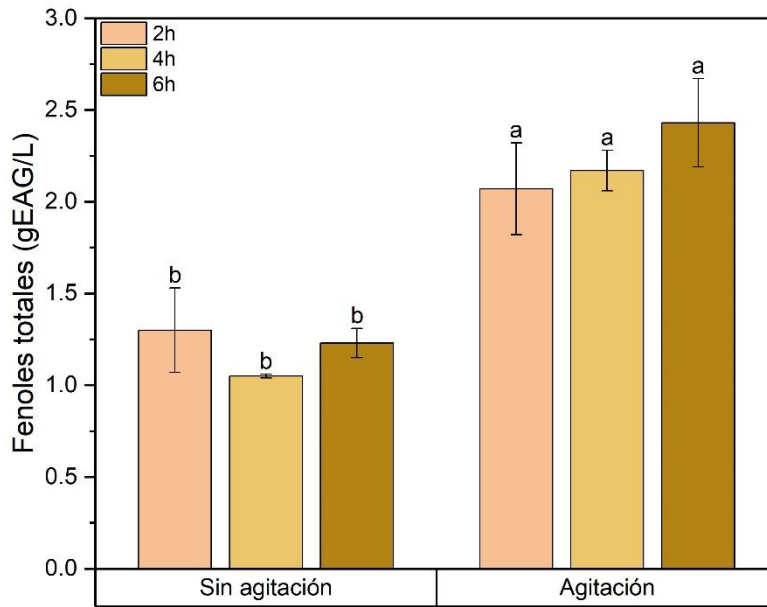


Figura 3.1 Compuestos fenólicos totales recuperados de una solución HSR/agua destilada al 14% (p/v) con diferentes tratamientos y tiempos. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Los valores de las columnas de un mismo tratamiento que comparten la misma letra no son significativos ($p < 0.05$).

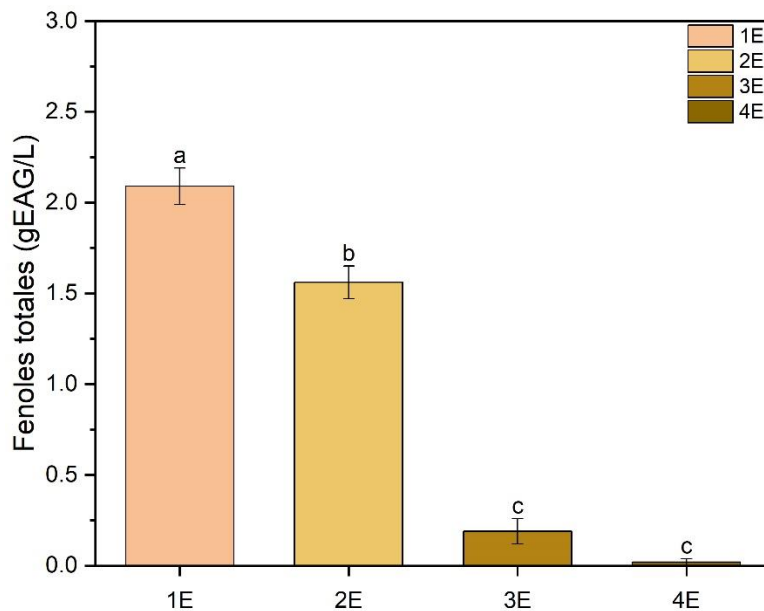


Figura 3.2 Compuestos fenólicos recuperados en extracciones secuenciales. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.5$).

En la primera extracción sobre HSR-C se recuperó el 81.06% del peso inicial y 250 mL de líquido, 18.94% del peso fue desplazado por el agua destilada. La HSR recuperada se secó a 70 °C por 72 h y se obtuvo HSR-1E. En la segunda extracción realizada en HSR-1E se recuperó el 90.36% del peso de HSR-1E inicial y 250 mL de líquido, el 9.64% del peso fue desplazado por el agua destilada. La biomasa fue secada y se obtuvo (HSR-2E). Los líquidos de extracción se filtraron y almacenados en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

La caracterización de los compuestos solubles en agua, incluyó fenoles totales y azúcares reductores (Tabla 3.1), cuya concentración decreció significativamente con respecto a las extracciones en secuencia. Así mismo, se apreció una disminución del pH, esto sugiere que la HSR podría contener agentes que modifican su pH, los cuales fueron removidos en las extracciones.

Tabla 3.1 Cuantificación de fenoles totales, azúcares reductores y pH de la fracción líquida de las extracciones de HSR.

Muestra	FT (gEAG/L)	AR (g/L)	pH
1E	2.32±0.11 ^a	3.21±0.56 ^a	5.03±0.02 ^a
2E	1.56±0.05 ^b	1.80±0.20 ^b	4.91±0.02 ^b

Nota: Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05).

En la Figura 3.3 A) se muestra el cromatograma obtenido en los estándares. En la Figura 3.3 B) y C) se muestran los cromatogramas de las extracciones para HSR-1E y HSR-2E respectivamente. Se detectaron en las muestras 12 picos definidos. De los cuales fueron identificados 5 compuestos fenólicos: ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico y siringaldehído. Con base al tiempo de retención de los picos no identificados en este trabajo, pueden ser atribuidos a otros compuestos fenólicos reportados como ácido clorogénico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido sinápico, ácido ferúlico, catequina, quercetina entre otros [30,31,73].

En la Tabla 3.2 se presentan las concentraciones encontradas de los compuestos fenólicos identificados en las extracciones de HSR. Entre los compuestos identificados se encontró mayor concentración de ácido gálico con 2.75 y 1.19 g/kg de HSR seca para 1E y 2E respectivamente. Esta concentración es mayor a las reportadas a partir de un kg de HSR (27.06 [30], 12.9 y 18.8 [31] mg). El ácido gálico presenta características antioxidantes, anticancerígenas, y efecto

neuroprotector. Se ha explorado su aplicación en la farmacología, como enfermedades cardiovasculares, los trastornos neurodegenerativos y el envejecimiento, prevención del daño al hígado, cáncer de pulmón (adenoma), entre otros. Por esto, se ha convertido un compuesto de interés en el desarrollo de fármacos, por ejemplo, en la producción de mescalina (alcaloide alucinógeno) y la trimetoprima (antibiótico). Se utiliza en la industria alimentaria (antioxidantes y conservantes), de las tintas y colorantes. Al calentarse se convierte en pirogalol, el cual se utiliza en laboratorios para absorber oxígeno y la producción de reveladores fotográficos. De igual manera, el ácido gálico es un compuesto utilizado como estándar en la cuantificación de FT por la metodología Folin-Ciocalteu [66,74,75].

Se encontró un contenido bajo de ácido cafeico, ácido *p*-cumárico y ácido vanílico para HSR-1E y HSR-2E. Para el ácido cafeico se encontró una concentración baja (0.43 y 0.10 mg/kg de HSR) en comparación con lo reportado en 1 kg de HSR (17.10 y 6.50 mg) [24,30]. La importancia de este compuesto recae en sus capacidades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Por ejemplo, la actividad anticancerígena de este compuesto contra el hepatocarcinoma (tipo de cáncer), gracias su efecto contra la carcinogénesis al prevenir la formación de compuestos N-nitrosaminas (compuestos cancerígenos) [76].

Así mismo, se encontró un contenido bajo de ácido *p*-cumárico (6.43 y 0.91 mg/kg) en comparación de los 13.5 mg/kg de HSR por Ozer [30]. Se ha estudiado su uso en la industria cosmética como regulador en la hiperpigmentación, ya que se ha demostrado su capacidad de actuar como inhibidor de la enzima tirosinasa involucrada en la síntesis de melanina [77].

El contenido de ácido vanílico fue de 31.46 y 10.22 mg/kg HSR, este valor es menor a lo reportado a partir de 1 kg de HSR (103.9 [30], 240.3 y 295.7 [31] mg). Se detectó la presencia de siringaldehído, un compuesto no reportado previamente en la literatura y de suma importancia en la industria de saborizantes y fragancias, así como precursor de químicos especializados y medicamentos antibacterianos [78].

Las diferencias en las concentraciones respecto a lo reportado pueden ser atribuidas al lugar y temporada de recolección de los frutos de ramón, así como los efectos climáticos y otros tipos de estrés a los que el árbol estuvo sometido, dado que la producción de compuestos fenólicos está relacionada con la protección de las plantas al encontrarse bajo ciertos tipos de estrés [36,79].

Tabla 3.2 Compuestos fenólicos identificados en las extracciones de HSR por HPLC.

Muestra	Ácido gálico (g/kg HSR seca)	Ácido cafeico	Ácido vanílico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Siringaldehído
		(mg/kg HSR seca)			
HSR-1E	2.75±0.05a	0.43±0.04a	31.46±2.99a	6.43±0.65a	26.14±3.05a
HSR-2E	1.19±0.03b	0.10±0.02b	10.22±1.43b	0.91±0.35b	9.76±0.70b

Nota: Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$).

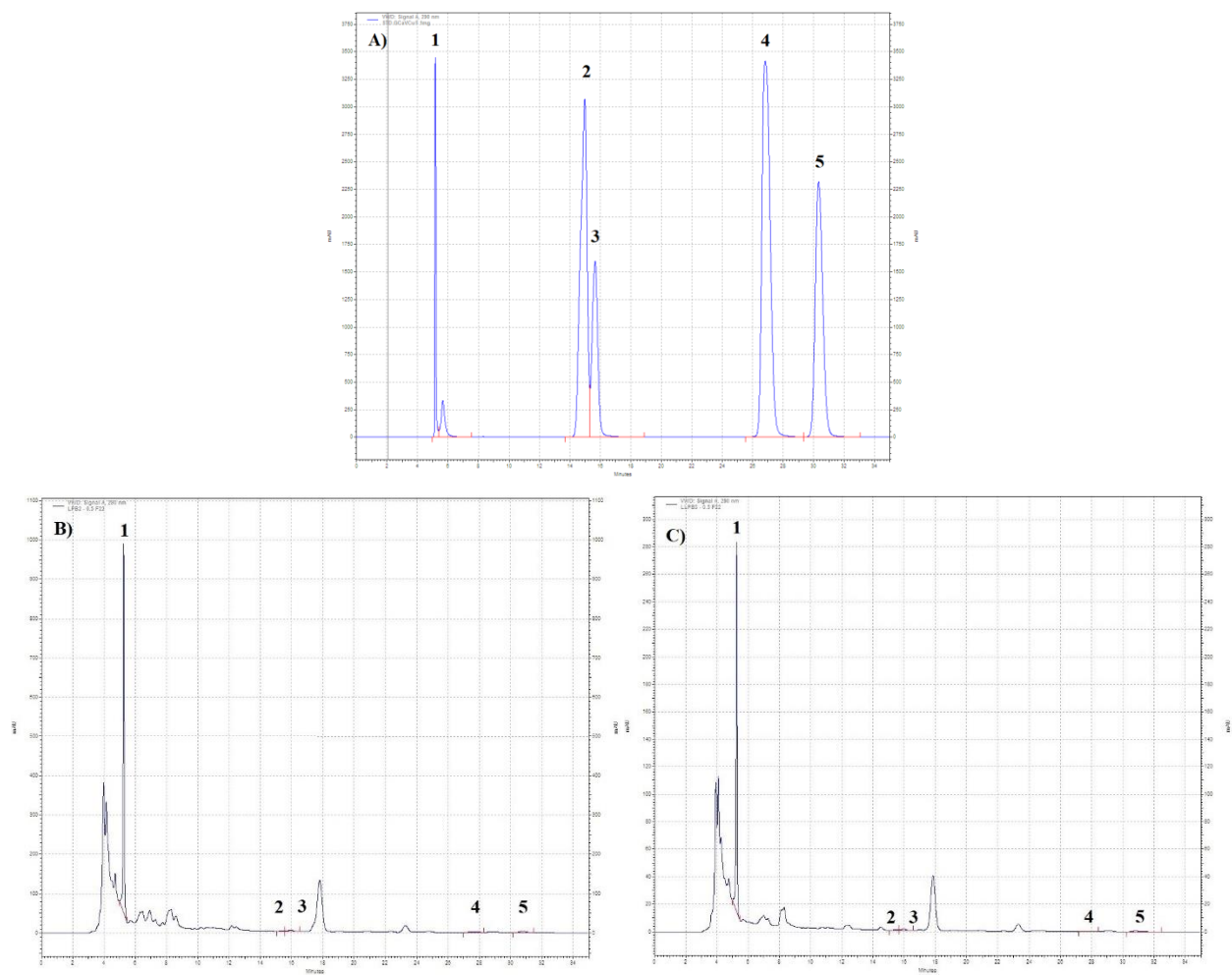


Figura 3.3 Cromatogramas obtenidos por HPLC. A) Mezcla de estándares utilizados, B) Extracción HSR-1E, C) Extracción HSR-2E. 1= Ácido gálico, 2= Ácido cafeico, 3= Ácido vanílico, 4= Ácido *p*-cumárico y 5= Siringaldehído.

3.1.3 Caracterización de HSR resultante de la extracción (fracción sólida).

En la Figura 3.4 se observan las muestras de HSR utilizadas en este estudio, se aprecia un cambio en la tonalidad con respecto a HSR-C disminuyendo hasta HSR-2E; y fue adquiriendo una sensación más suave y fina respectivamente. Los resultados obtenidos de la caracterización de la HSR se presenta en la Tabla 3.3, se presentó una variación de la humedad con respecto al número de extracciones, siendo la HSR-C la menor con un 2.92% de humedad. Este valor es menor al presentado por R. Subiria-Cueto y col. [80] de 13.3 y de 3.72% por E. Pérez-Pacheco y col. [81] el cual almacenó la HSR preparada en un frasco de vidrio hasta su utilización, por lo que esta diferencia se debe al tipo de manejo al momento de la preparación de la muestra. Se presentó un incremento de la humedad con el número de extracciones, alcanzando un máximo de 3.98% para HSR-2E.

La HSR-C presenta un mayor contenido de material inorgánico, representado por el contenido de cenizas, de un 4.03% en comparación con el 3.41% reportado por Pérez-Pacheco y col. [81]. Al realizar extracciones sobre HSR se remueven compuestos solubles e igual se desplaza materia inorgánica, como resultado se aprecia una disminución en el contenido de cenizas de 2.45% en HSR-1E a 1.73% en HSR-2E, respectivamente. Se ha reportado una reducción del 38% del contenido de cenizas en biomasa de macroalgas (cultivadas en infraestructura al aire libre) utilizando lavados con agua a 25 °C y de 83.4% con extracciones alcalinas de NaOH al 1.5% a 25 °C [82]. De igual manera, en el caso de biomasa de Sorgo con lavados de agua se logró reducir en un 20% el contenido de cenizas [83]. Diferentes estudios han demostrado la importancia disminuir el contenido de cenizas para la mejora de los rendimientos de la biomasa y evitar daños a equipos por sus propiedades abrasivas. Los orígenes de las cenizas pueden provenir durante la cosecha y colecta, así como procesos biológicos de crecimiento [84].

En cuanto al contenido elemental orgánico, hubo variaciones significativas en el porcentaje nitrógeno (N) no así para el contenido del carbono (C). Los valores de nitrógeno hallados en HSR-C fueron significativamente mayores a los encontrados en HSR-1E y HSR-2E, siendo HSR-2E el tratamiento que presentó el menor porcentaje de N. En lo que respecta al porcentaje de hidrógeno no hubo variación significativa entre los tratamientos, y no se detectó la presencia de azufre. Como es posible observar en la Tabla 3.3 la relación de C:N aumenta significativamente desde HSR-C (19.85), siguiendo por HSR-1E (30.85) y hasta HSR-2E (39.18). Este aumento se puede atribuir a

la disminución de compuestos nitrogenados debido a las extracciones realizadas. En relaciones bajas (<20) de C:N la liberación de nitrógeno es más rápida que en niveles más altos (>30), sin embargo, los microorganismos necesitan un rango de equilibrio entre 20-30 para su crecimiento correcto [85,86]. Por lo tanto, la relación C:N de HSR-C se sitúa ligeramente por debajo del rango, la HRS-1E ligeramente por arriba del rango óptimo y, en cuanto la HSR-2E, se encuentra más alejado de este.

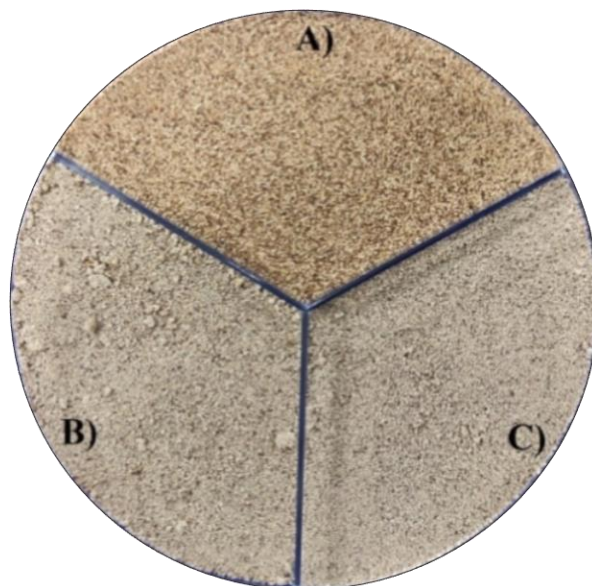


Figura 3.4 Fotografía de la HSR resultante de las diferentes extracciones. A) HSR-C, B) HSR-1E y C) HSR-2E.

Tabla 3.3 Humedad, contenido inorgánico (cenizas) y caracterización elemental de la HSR resultante de las diferentes extracciones.

HSR	Humedad	Cenizas	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno	C:N*
HSR-C	2.92±0.21 ^a	4.03±0.04 ^a	43.63±0.09 ^a	6.37±0.01 ^a	2.20±0.02 ^a	19.85 ± 0.16 ^a
HSR-1E	3.45±0.65 ^a	2.45±0.04 ^b	43.40±0.02 ^a	6.34±0.02 ^a	1.41±0.04 ^b	30.85 ± 0.97 ^b
HSR-2E	3.98±0.39 ^a	1.73±0.01 ^c	43.36±0.07 ^a	6.47±0.05 ^a	1.11±0.02 ^c	39.18 ± 0.92 ^c

Nota: Porcentaje en base seca, Sulfuro no detectado. *Relación Carbono:Nitrógeno adimensional. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05).

3.2 BPC con las cepas de *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1 empleando como sustrato HSR-C, HSR-1E y HSR-2E

Se realizaron los bioproceso consolidados empleando HSR-C (BPC-C), HSR-1E (BPC-1E) y con HSR-2E (BPC-2E) con las cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1. En la Tabla 3.4 se presenta las condiciones iniciales de los BPC previo a la inoculación de la cepa correspondiente. Se encontraron variaciones en la concentración de AR, FT y en el pH con respecto a la HSR utilizada. Estas diferencias en las condiciones iniciales se deben a las extracciones realizadas para la obtención de HSR-C, HSR-1E y HSR-2E.

Tabla 3.4 Condiciones iniciales en el BPC previo a la inoculación de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1.

<i>T. hirsuta</i>	Muestra	FT (g/L)	AR (g/L)	pH
Bm-2	BPC-C	2.29±0.06a	2.77±0.09ab	5.03±0.02a
	BPC-1E	1.44±0.15b	1.40±0.50bc	4.91±0.02b
	BPC-2E	0.78±0.20c	0.48±0.15c	4.85±0.01bc
RT-1	BPC-C	2.43±0.36a	3.04±0.97a	5.00±0.03a
	BPC-1E	1.47±0.06b	1.35±0.36bc	4.91±0.03b
	BPC-2E	0.84±0.17c	0.65±0.42c	4.84±0.01c

Nota: Los resultados representan la media (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05).

Al término del BPC se presentaron variaciones significativas con respecto a los valores iniciales del pH para todos los experimentos (Figura 3.5). En el caso de Bm-2, los valores de pH finales para HSR-1E y HSR-2E no presentaron diferencias significativas, contrario a RT-1 que en todos los experimentos presentaron diferencias significativas en el pH. Este comportamiento de disminución en el pH difiere por el reportado por Olguin-Maciel [4] para un BPC con *T. hirsuta* Bm-2, en donde se mantiene un pH 5.1 a lo largo de todo el experimento, por consiguiente no le atribuye algún efecto sobre la producción enzimática α -amilasa, sin embargo, el rango de trabajo de esta enzima en cuanto pH es amplio (pH 3 a 10), dependiendo del microorganismo productor. Por otro lado, Zapata-Castillo [87] indica la estabilidad de las lacasas de *T. hirsuta* en un rango de pH de 3 a 7, con pH óptimo de 4.5. El rango inicial de pH en los BPC para ambas cepas fue de 5.02 – 4.83. El valor de pH alcanzado por Bm-2 al final del BPC fue de 4.52, 4.16, y 4.14; para

RT-1 4.18, 4.07 y 3.85 estos para HSR-C, HSR-1E y HSR-2E respectivamente. Para ambas cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1, los valores de pH iniciales y finales se encuentran en el rango de actividad enzimática α -amilasa y lacasa.

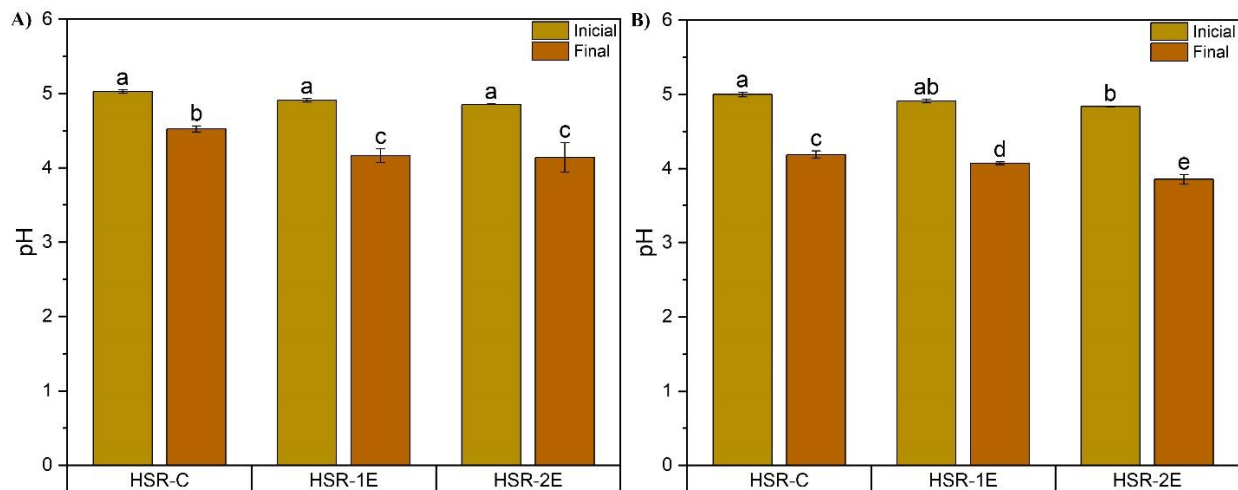


Figura 3.5 Condiciones de pH en la fracción líquida al inicio y final del BPC. A) *T. hirsuta* Bm-2 y B) *T. hirsuta* RT-1. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).

3.2.1 Cinética del contenido de fenoles totales, actividad enzimática y liberación de azúcares reductores durante el BPC.

La cinética de concentración de AR y actividad enzimática α -amilasa se presentan en la Figura 3.6 y Figura 3.7 para *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1 respectivamente. Durante el desarrollo del BPC se puede apreciar un aumento en la concentración de AR. En el día 9 de incubación se alcanzó la máxima concentración con Bm-2 de 25.67 y 20.95 g/L para HSR-C y HSR-1E respectivamente, para luego decrecer ligeramente al final del proceso. Por su parte, HSR-2E alcanzó su concentración máxima (14.48 g/L) hasta el final del BPC al día 12. Para la cepa RT-1 se presentó un comportamiento similar, sin embargo, a los 9 días se obtuvo las máximas concentraciones para HSR-C (34.75 g/L) y HSR-2E (19.30 g/L) y a los 12 días para HSR-1E (27.80 g/L).

En cuanto al perfil de la actividad enzimática α -amilasa, la cepa Bm-2 presentó un comportamiento similar con HSR-C, HSR-1E y HSR-2E a lo largo del experimento, pero con diferencias en las concentraciones alcanzadas. Al día 6 se puede observar un aumento en la actividad enzimática α -amilasa donde HSR-1E alcanza la concentración más alta (43.20 U _{α} /mL), a partir de ahí, se presentó un rápido decrecimiento hacia el día 9, sin embargo, fue seguido de un rápido incremento

de actividad hacia el día 12. Al final del experimento, los valores de la actividad enzimática para HSR-C, HSR-1E y HSR-2E no tuvieron diferencia significativa (47.23, 48.63 y 50.30 U_a/mL respectivamente). Respecto a la cepa RT-1, esta presentó un comportamiento similar a la cepa Bm-2 cuando se utilizó HSR-C. En el caso de HSR-1E y HSR-2E alcanzaron su máxima concentración al día 9 para luego decrecer ligeramente al final del BPC, alcanzando una concentración similar a HSR-C sin diferencias significativas (48.56 U_a/mL) valor ligeramente menor a los encontrados con la cepa Bm-2. Estas variaciones de concentración se podrían atribuir a las diferentes capacidades enzimáticas de *T. hirsuta*, las cuales se pueden atribuir a que se aislaron de diferentes hospederos [15,88,89]. Se observó que la cepa RT-1 presentó una mayor capacidad amilolítica para la liberación de AR, contrario a la cepa Bm-2 que mostró una mayor capacidad fermentativa sobre su capacidad hidrolítica.

El comportamiento de los perfiles de liberación de AR y actividad enzimática α -amilasa (Figura 3.6 y Figura 3.7) coinciden con el reportado por Olguin-Maciel y col. [15] y Garza [89] para Bm-2 y RT-1 respectivamente. Para los AR al día 8 y 9 se alcanza la mayor concentración de AR y coinciden con la disminución de actividad enzimática α -amilasa, este comportamiento parece más característico de la cepa Bm-2, pero no es tan marcado para la cepa RT-1. Esta disminución de la actividad puede ser asociada con la formación y liberación de compuestos por parte de las cepas de *T. hirsuta*, como pueden ser AR, compuestos fenólicos, etanol y metanol, que al interactuar con el medio pueden reducir la actividad o desnaturalizar a la enzima [4,90].

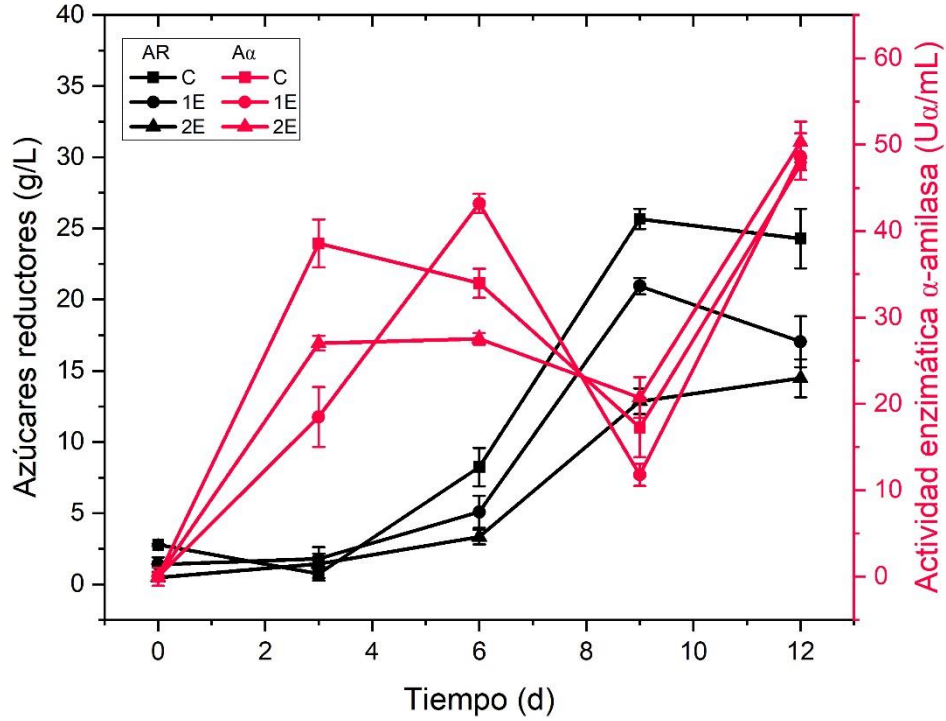


Figura 3.6 Cinética de liberación de azúcares reductores y actividad enzimática α -amilasa de la cepa de *T. hirsuta* Bm-2 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.

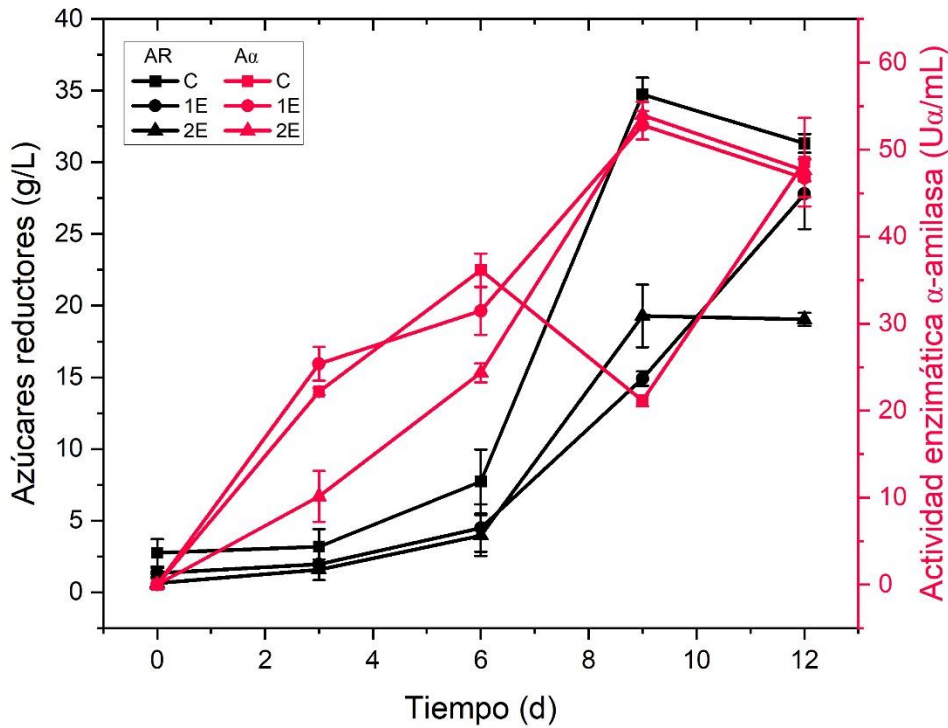


Figura 3.7 Cinética de liberación de azúcares reductores y actividad enzimática α -amilasa de la cepa de *T. hirsuta* RT-1 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.

En la Figura 3.8 para Bm-2 y Figura 3.9 para RT-1 se puede apreciar la cinética de la concentración de FT y actividad enzimática lacasa durante el BPC, donde ambas cepas presentaron un comportamiento similar a lo largo del experimento. Debido a las extracciones realizadas existe una diferencia significativa en la concentración de FT, siendo secuencialmente mayor en HSR-C, HSR-1 y HSR-2E, respectivamente. Sin embargo, durante el experimento se aprecia una tendencia de crecimiento en la concentración de FT hasta el día 9, posteriormente los valores finales disminuyeron a niveles similares a los valores iniciales de incubación. A pesar de ello, el análisis estadístico indica que, para cada HSR utilizada, no hay diferencia significativa entre las mediciones realizadas a lo largo del experimento. Esto difiere con lo reportado por Garza [89] para un BPC con RT-1 el cual presenta un perfil solo de aumento de FT de 0.2 a 0.9 gEAG/L, atribuidos a la liberación de compuestos por otras enzimas extracelulares producidas por las cepas [4,89].

El perfil de la actividad enzimática lacasa fue similar para Bm-2 y RT-1, sin embargo, los valores de actividad enzimática son mucho mayores en Bm-2, aproximadamente 30.35 veces mayor que RT-1 para los valores más altos al día 9. En general, la actividad enzimática presentó un crecimiento constante hasta el día 6. Pero para el día 9 se presentó un rápido un incremento de la actividad enzimática, con un promedio de 12.88 veces para los BPC con Bm-2 y de 7.88 veces para RT-1, con respecto al día 6. Para el día 12 los valores decrecieron drásticamente para Bm-2 (6.11 veces) y en RT-1 presentaron un decrecimiento más moderado (1.47 veces). *T. hirsuta* es una cepa capaz de producir enzima lacasa a partir de material lignocelulósico [72,88] en donde se observa que la cepa Bm-2 produce una mayor concentración a comparación de RT-1; de igual manera, se ha reportado la presencia de la enzima lacasa y su papel en un BPC utilizando como sustrato harina de semilla de ramón [15,89], donde, con RT-1 se alcanzó una mayor concentración de enzima lacasa a comparación de Bm-2. En este trabajo Bm-2 produjo una mayor concentración de enzima lacasa a comparación de RT-1, esta discrepancia se puede deber al origen y tiempo de recolección de las semillas de ramón con las que se obtuvo la HSR, esto se puede apreciar en el contenido de FT y las diferencias en el contenido de los compuestos fenólicos identificados (Tabla 3.2) con lo reportado [30,31]. Diversos estudios han demostrado que la presencia de compuestos fenólicos puede generar diversos efectos sobre las cepas, como el aumento, disminución o inhibición del crecimiento de la biomasa micelial [79,91–93], de igual manera el actuar como agentes inductores o inhibidores de la producción y actividad enzimática [72,79,94].

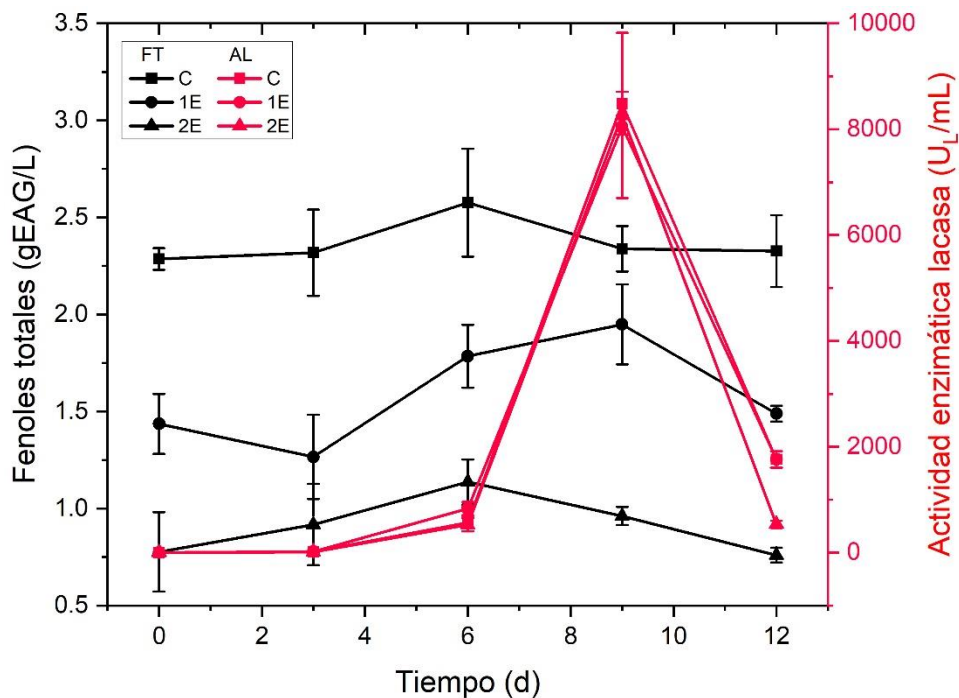


Figura 3.8 Cinética fenoles totales y actividad enzimática lacasa de la cepa de *T. hirsuta* Bm-2 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.

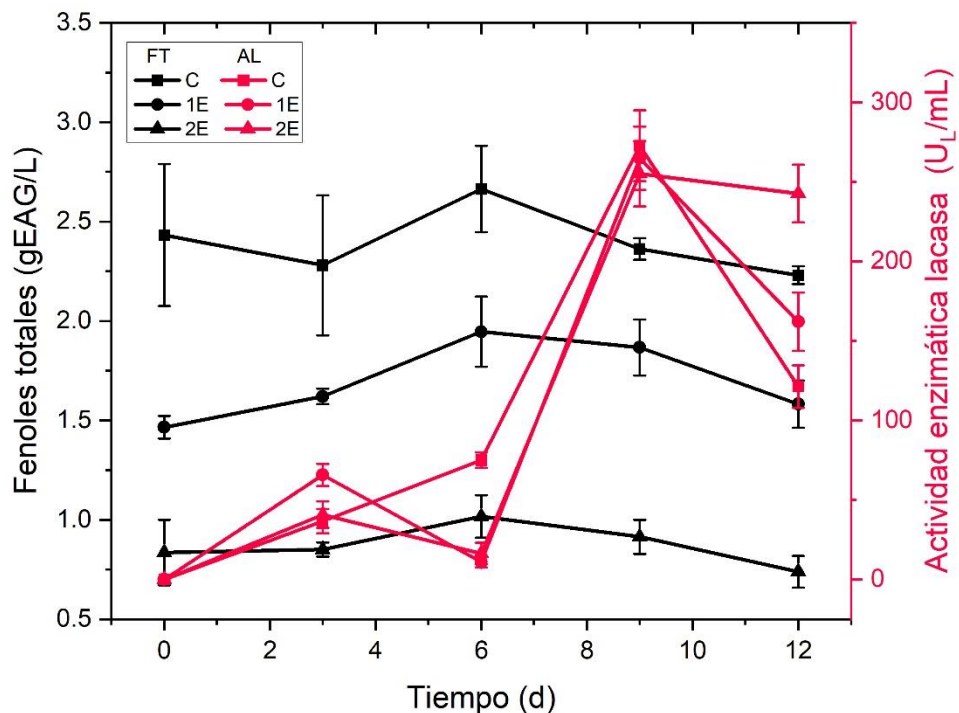


Figura 3.9 Cinética fenoles totales y actividad enzimática lacasa de la cepa de *T. hirsuta* RT-1 en BPC de HSR. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar.

3.3 Productos generados en el BPC.

Al finalizar el BPC se obtienen diversos productos provenientes de la fase líquida (compuestos fenólicos, azúcares libres, etanol y metanol) y sólida (harina residual y biomasa micelial) los cuales bajo el concepto de biorrefinería fueron recuperados y posteriormente caracterizados.

En lo que respecta al micelio producido durante el BPC por *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1, se encontró una disminución en la biomasa generada con respecto a la HSR utilizada (Figura 3.10). La producción máxima fue alcanzada con HSR-C, seguido por HSR-1E y HSR-2E para ambas cepas, sin embargo, la producción máxima es diferente, con Bm-2 se obtuvo un 11.81% y con RT-1 un 9.55% p/p respecto a la HSR inicial, este valor se asemeja al reportado por Olguin-Maciel y col. [15] con Bm-2 del 10% p/p respecto a HSR (equivalente a la HSR-C de este trabajo). La producción mínima alcanzada fue de 5.67% y 5.71% p/p con respecto a la HSR-2E inicial para Bm-2 y RT-1.

La diferencia en la producción de micelio entre las cepas se atribuye a las características de crecimiento, en el trabajo de Garza [89] describe que Bm-2 presenta un crecimiento rápido de micelio vigoroso y algodonoso, en cambio, RT-1 presenta un crecimiento más lento con presencia de anillos concéntricos. De igual manera, sus fuentes de aislamiento son diferentes, y su origen influye en el crecimiento y reconocimiento del sustrato [88,95]; Bm-2 proviene de madera en descomposición [72], mientras que RT-1 proviene de la planta viva *Acalypha gaumeri* [88].

En cuanto, la diferencia de producción de micelio con respecto a la HSR utilizada; como se demostró previamente, las extracciones tienen un efecto de remoción de AR, compuestos fenólicos, materia inorgánica y una disminución en el pH. Por ejemplo, Barchuk y col. [96] encontró una influencia significativa por parte del pH, temperatura y tiempo de incubación en el crecimiento y la actividad enzimática lacasa producida por *T. villosa* BAFC 2755, sin embargo, no se encontró correlación entre el crecimiento micelial y la actividad enzimática. Por otro lado, la disponibilidad de nitrógeno y la relación C:N juegan un papel importante en el crecimiento del micelio, ya que con una mayor disponibilidad de nitrógeno se espera una mejor eficiencia en el crecimiento [97]; en la Tabla 3.3 se presenta la disminución del contenido de nitrógeno y aumento de la relación C:N en la HSR debido a las extracciones realizadas, las cuales a menor contenido de nitrógeno coinciden con una disminución en la producción de biomasa micelial. La disponibilidad de AR en el medio juega un papel importante al presentar una fuente inmediata de energía, así como la

presencia de fenoles, taninos y alcaloides afectan al crecimiento [98], por ejemplo, se ha reportado que la presencia de ácido gálico incrementa el crecimiento de *Cryphonectria cubensis* patógeno causante de antracnosis (chancro) en eucaliptos [91], por contraparte, se ha reportado que disminuye el crecimiento de *Alternaria solani* patógeno causante de la enfermedad tizón temprano en el tomate. Este compuesto fue el encontrado en mayor concentración en las extracciones realizadas, por lo que su ausencia pudo afectar al crecimiento de las cepas de *T. hirsuta*. De igual manera, el agua es un solvente que no es capaz de extraer todos los compuestos fenólicos presentes en la HSR, por lo que los compuestos no extraídos pudieran jugar un papel en la reducción de la biomasa micelial generada. Por consiguiente, al remover dichos compuestos, el hongo se encuentra bajo condiciones diferentes que se refleja en una disminución de la biomasa producida.

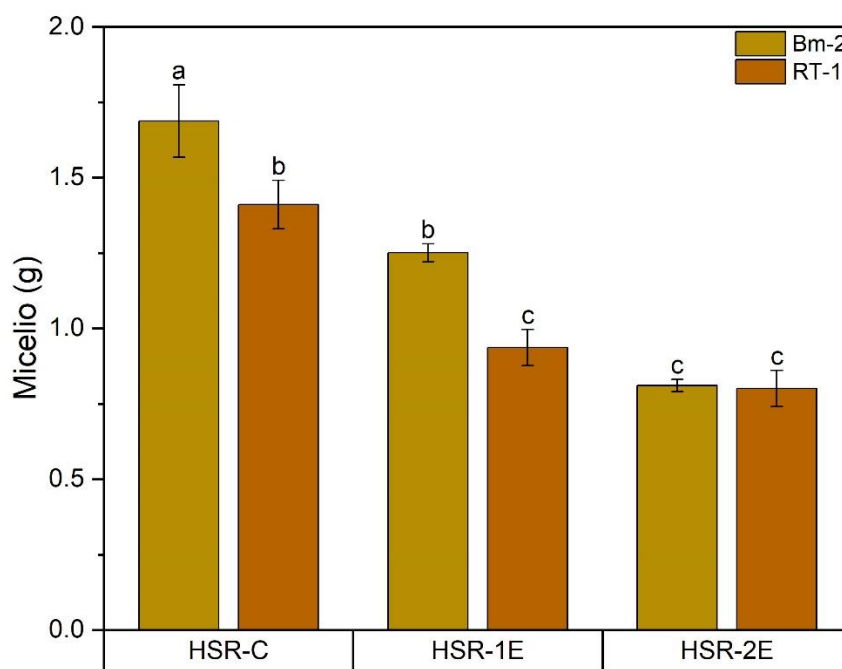


Figura 3.10 Biomasa en peso seco del micelio generado por las cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1 durante el bioproceso consolidado. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.5$).

Se detectó la presencia de cenizas en la biomasa micelial (Tabla 3.5); Bm-2 no presenta variaciones significativas entre los tratamientos, a diferencia de RT-1, donde el micelio generado del BPC-C presenta el mayor contenido de cenizas con 8.47% del peso seco, el cual disminuye un 52.53% en BPC-2. El contenido de cenizas en hongos comestibles varía entre el 1.27% hasta 10.08 % del peso seco [99,100]; las cepas de *T. hirsuta* de este estudio se encuentran dentro del rango. Se han detectado la presencia de diversos elementos no orgánicos en la composición de los hongos [101]

así como la presencia de compuestos fenólicos [102]. Algunas cepas de hongo cuentan con capacidad de biosorción de metales pesados [103], por lo cual se ha explorado la utilización del micelio seco de *T. versicolor* en la remoción de compuestos fenólicos presentes en agua de desecho [104]. Esto podría presentar una posible aplicación a la biomasa micelial generada durante el BPC.

Con base al análisis elemental orgánico del micelio presentado en la Tabla 3.5, se encontraron variaciones en el contenido de carbono y nitrógeno; no se detectaron variaciones en el contenido de hidrógeno y no se detectó presencia de azufre. En cuanto al contenido de carbono en ambas cepas se presentó un comportamiento similar, en cuanto al micelio de BPC-1E y BPC-2E no presentaron diferencia significativa, pero si con el control (BPC-C); los valores obtenidos se encuentran dentro del rango del 38% a 57% reportado para los filo (*filum*) *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, y *Zygomycota* [105]. En cuanto al contenido de N, RT-1 presentó un comportamiento de decrecimiento, alcanzando una disminución del 22.74% en BPC-1E y del 52.25% para BPC-2E con respecto al control (4.88%) del micelio seco, mientras que para Bm-2 el BPC-C presentó su mayor contenido de nitrógeno con 4.06%, el cual presentó diferencias significativas con BPC-1E y BPC-2E. Para ambas cepas, la relación de C:N aumentó con relación a los controles, siendo para RT-1 en BPC-2E la que presentó mayor relación (20.05).

En cuanto al contenido de proteína (Tabla 3.5), se aprecia que el micelio de RT-1 (30.48%) presentó un mayor contenido de proteína con respecto a Bm-2 (25.39%). Para ambas cepas, el mayor contenido fue alcanzado en BPC-C y se aprecia una disminución con respecto a las extracciones realizadas, de esta manera con BPC-2E se obtuvo el menor contenido de proteína. El contenido proteico en el micelio varía ampliamente, por ejemplo, en el trabajo de Yu y col. [99] se analizaron 23 tipos de hongos comestibles, de los cuales se encontró un rango de variación del contenido de proteína desde un 8.46% al 36.87%. Similar, se ha reportado para *T. hirsuta* un contenido de proteína del 26.06% [106] y, en específico de un 29% para el micelio de *T. hirsuta* Bm-2 producido mediante un BPC [4].

Tabla 3.5 Contenido inorgánico (cenizas), proteína y caracterización elemental del micelio de las cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1 generado en el BPC.

	Muestra	Cenizas	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno	Proteína	C:N
<i>T. hirsuta</i> Bm-2	BPC-C	6.08±0.73 ^a	45.60±0.03 ^a	7.04±0.01 ^a	4.06±0.16 ^a	25.39±0.99 ^b	11.23±0.44 ^a
	BPC-1E	4.55±0.05 ^a	46.78±0.43 ^b	7.23±0.23 ^a	2.62±0.10 ^b	16.37±0.64 ^c	17.88±0.86 ^b
	BPC-2E	4.35±0.26 ^a	46.71±0.04 ^b	7.77±0.26 ^a	2.62±0.11 ^b	16.38±0.66 ^c	17.84±0.73 ^b
<i>T. hirsuta</i> RT-1	BPC-C	8.47±0.01 ^a	44.31±0.12 ^a	6.75±0.08 ^a	4.88±0.14 ^a	30.48±0.90 ^a	9.09±0.29 ^a
	BPC-1E	5.31±0.17 ^b	46.28±0.16 ^b	6.99±0.28 ^a	3.77±0.04 ^b	23.57±0.24 ^b	12.27±0.17 ^b
	BPC-2E	4.02±0.33 ^c	46.81±0.39 ^b	7.55±0.23 ^a	2.33±0.01 ^c	14.59±0.01 ^c	20.05±0.17 ^c

Nota: Porcentaje respecto al peso seco de la biomasa micelial. Los resultados representan la media (n=2) y desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05).

Al final del BPC se recuperó la HSR residual. En la Figura 3.11 se presenta el peso seco de la HSR recuperada. Para *T. hirsuta* Bm-2 en BPC-C se recuperó el 53.14%, para BPC-1E el 67.31% y en BPC-2E el 66.38% de la HSR correspondiente inicial, estos dos últimos sin diferencia significativa. RT-1 presentó un mayor consumo de la HSR, ya que se recuperaron el 40.33, 57.62, 57.23% para BPC-C, BPC-1E, BPC-2E respectivamente, estos dos últimos nuevamente sin diferencia significativa. Sin embargo, estos valores están por encima del 30% recuperado reportado por Olguin-Maciél [15] para *T. hirsuta* Bm-2 con una HSR-C.

Como se evidenció previamente, RT-1 presenta una capacidad amilolítica mayor a Bm-2, hidrolizando una mayor cantidad de almidón a AR libres en el medio, lo que se refleja en un mayor consumo de la HSR inicial y por consiguiente una recuperación menor de HSR residual. Tanto Bm-2 como RT-1 presentan un mayor consumo de HSR-C en BPC-C, para luego presentar una disminución significativa en la utilización de la HSR, pero sin diferencia significativa entre BPC-1E y BPC-2E.

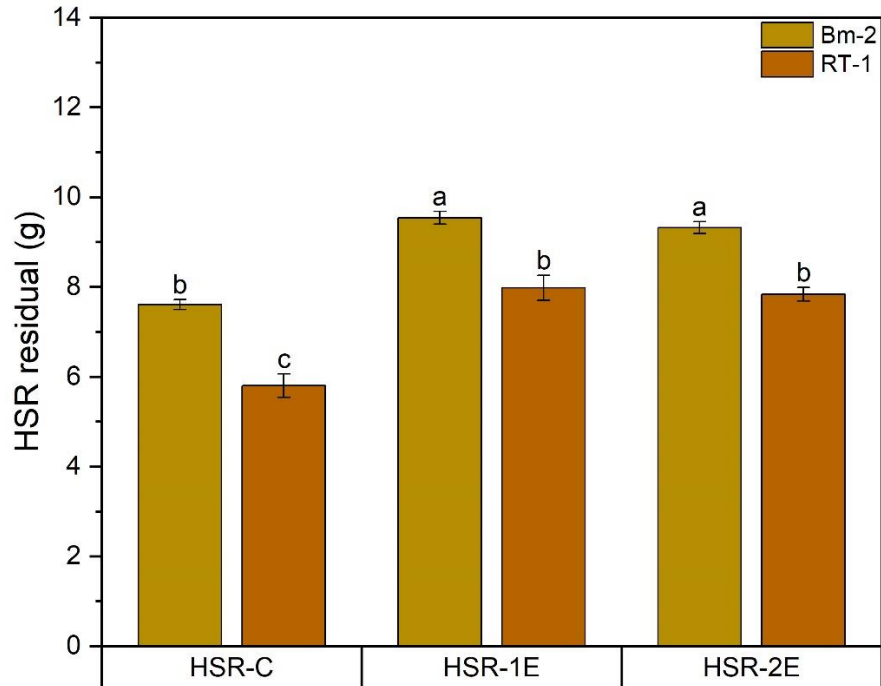


Figura 3.11 HSR residual recuperada en peso seco al final del BPC con las cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.5$).

En la Figura 3.12 se presenta la comparativa de la humedad, contenido inorgánico (cenizas) y análisis elemental de la HSR inicial (Tabla 3.3) y la HSR residual obtenido de los BPC con *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1. Se encontró diferencia significativa en el contenido de cenizas entre las HSR-C, HSR-1E y HSR-2E para Bm-2 y RT-1. Se presentó un ligero aumento en el contenido de cenizas (Figura 3.12 B) del 4.71 – 4.83%, 2.16 – 3.08% y 1.80 – 1.88% con los valores iniciales de HSR-C, HSR-1E y HSR-2E, para Bm-2 y RT-1, respectivamente. En cuanto al análisis elemental, se encontró una diferencia en el contenido de carbono entre el control y las extracciones 1E y 2E, por contrario, al comparar con la HSR inicial, solamente se encontró diferencia significativa entre las HSR control (Figura 3.12 C).

Se aprecia una disminución en el contenido de nitrógeno entre las HSR utilizadas. Los controles mostraron valores significativamente mayores a los tratamientos HSR-1E y HSR-2E para ambas cepas (Figura 3.12 D). Asimismo, HSR-1E fue significativamente mayor a HSR-2E. Por su parte, RT-1 alcanzó valores significativamente mayores a los encontrados con Bm-2 en HSR-1E y HSR-2E, respectivamente. Sin embargo, en la comparativa con HSR inicial (Figura 3.12 D) se aprecia un aumento en el contenido de nitrógeno para el caso de los controles en ambas cepas. Por otro

lado, RT-1 presenta en todos los experimentos un aumento significativo en el contenido de N. Este aumento en el contenido de nitrógeno se puede deber a la presencia de fragmentos de micelio, con contenido proteico, así como las enzimas liberadas [15] se encuentran presentes en la HSR residual. Este hecho se ve reflejado en la relación C:N (Figura 3.12 E), donde Bm-2 presenta niveles similares a la HSR inicial y RT-1 presenta una relación C:N menor. No se encontró diferencia entre el contenido de hidrógeno.

Estos cambios se pueden atribuir a que al tratarse de una HSR residual proveniente de un BPC parte del contenido orgánico fue consumido durante el BPC por *T. hirsuta* para su crecimiento, producción enzimática y fermentación, por lo que el contenido inorgánico y orgánico presentan una mayor o menor fracción porcentual de la biomasa residual en comparativa con la biomasa inicial. La relación C:N es importante, por ejemplo, en la digestión anaeróbica para la producción de biogás la fuente de carbono afecta al comportamiento fermentativo de los microorganismos debido al aumento en la generación de dióxido de carbono y disminución del pH, mientras el nitrógeno es un componente esencial para el crecimiento de estos, pero en altas concentraciones aumenta la formación de gas amoniacado que propicia el aumento en el pH [107,108]. Es por esto que se requiere de una relación C:N óptima, la cual se encuentra en el rango de 20-30 [107–109]. Para la producción de hidrogeno se ha reportado que el C:N óptimo ronda entre 30, 47 y 50 [110–112], por lo que según la aplicación planteada la HSR residual óptima a emplear varía, ya que los valores de C:N obtenidos en este estudio están en un rango de 16.48 a 41.84.

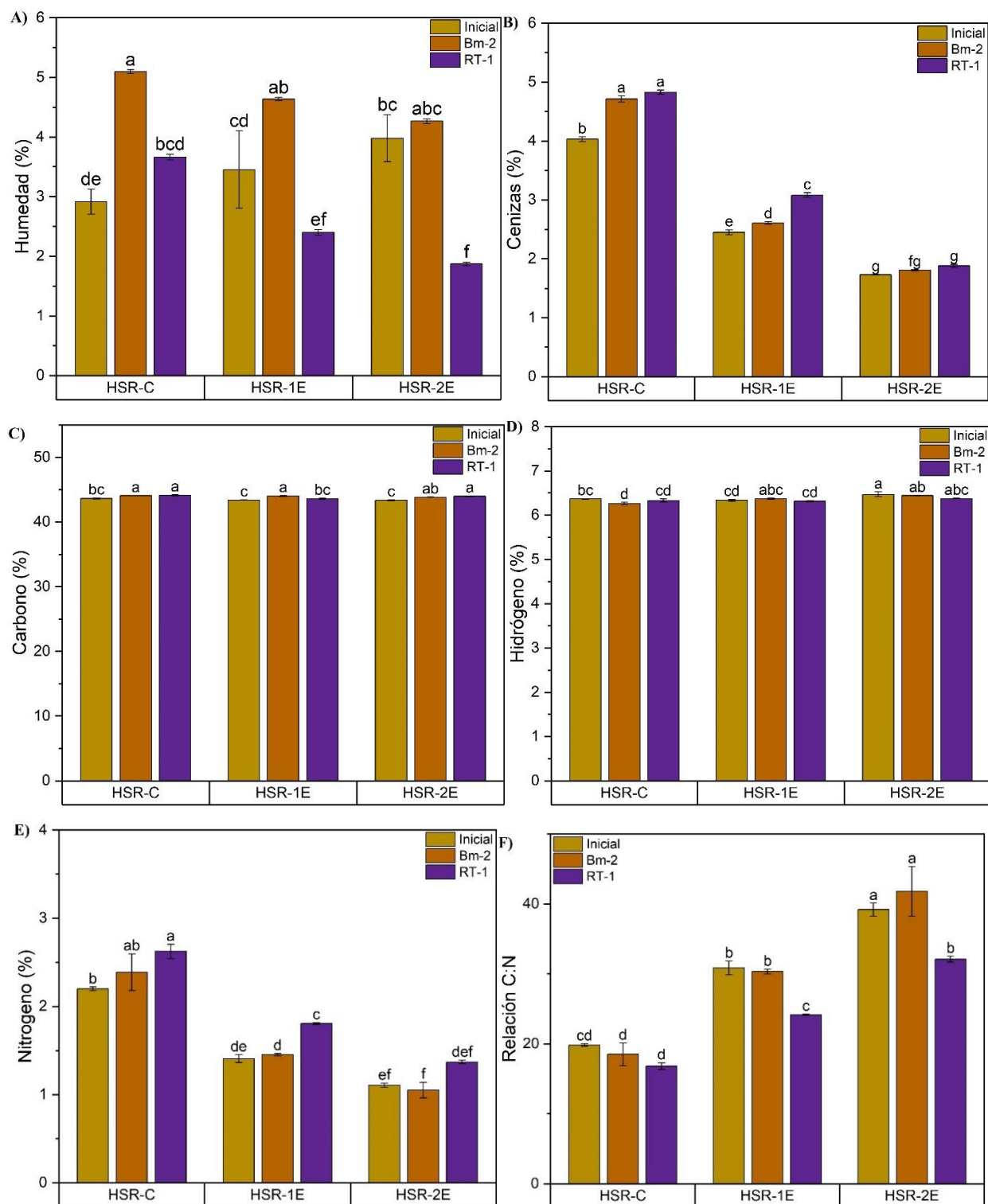


Figura 3.12 Comparativa de la humedad, contenido inorgánico (cenizas) y análisis elemental de la HSR inicial (previo al BPC) y la HSR residual obtenido de los BPC con *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1. No se detectó la presencia de azufre. Los resultados representan la media (n=2) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.5$).

Dada la cantidad de HSR resultante del BPC, se procedió a realizar una microscopía electrónica de barrido para observar el efecto de las cepas de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1 sobre la HSR. En la Figura 3.13 se presentan los resultados de una microscopía electrónica de barrido realizados a la HSR de BPC de los controles correspondientes de Bm-2 y RT-1. En la harina previo al BPC se observa claramente los gránulos de almidón (en círculo rojo) y señalados con una flecha naranja la matriz de fibroproteína, que envuelve a los gránulos [15,25], para el caso de la biomasa del BPC parte superior de la columna de harina dentro del matraz se aprecia la matriz de fibroproteína abierta y una ausencia de gránulos de almidón, mientras que para la BPC inferior se encuentran gránulos de almidón aún rodeados por la matriz, esto confirma la hipótesis Olguin-Maciel y col [15] que la HSR no se hidroliza por completo porque las enzimas no alcanzan a penetrar hasta la HSR depositada en la parte inferior del matraz.

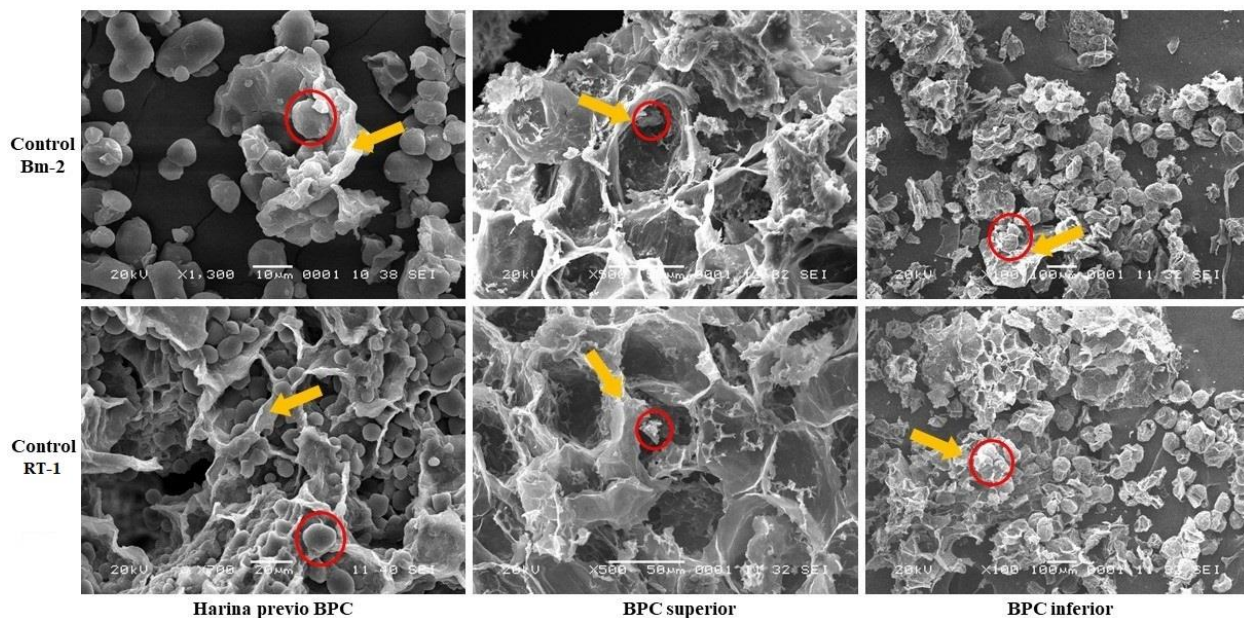


Figura 3.13 Microscopía electrónica de barrido para la HSR previo al BPC y la HSR residual recuperada al final del BPC en diferentes secciones del matraz. De flecha naranja la matriz de fibroproteína presente en la harina y en círculo rojo los gránulos de almidón.

Este refleja un área de mejora para la optimización del BPC, por ejemplo, se ha explorado la aplicación de agitación al día 7 de incubación en un BPC con RT-1 durante 24 h, con esta estrategia se alcanzó un aumento del 38.36% en la concentración de AR, este efecto se atribuye a que la agitación permitió una distribución homogénea de las enzimas en el sustrato, distribución de nutrientes y oxígeno [89] y para un BPC con Bm-2 al aplicar una agitación se logró disminuir en 24 h el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima de AR [4]. De igual manera, se

ha explorado la aplicación de estrategias de sacarificación y co-fermentación simultánea [89] y fermentación secuencial [4] obteniendo un aumento del 30% en la producción de etanol.

Otros productos obtenidos fueron etanol y metanol, cuya concentración fue medida por cromatografía de gases en muestras destiladas provenientes del final del BPC (12 días de incubación); los resultados se presentan en la Figura 3.14 y Figura 3.15 respectivamente. La concentración máxima de etanol fue encontrada con Bm-2 en BPC-1E con 14.14 g/L, lo que representa un aumento del 13.21% con respecto al BPC-C; se estimó una producción de etanol de 132.58 mL/kg de HSR-1E. Otro efecto obtenido fue la disminución en un 72.22% de la concentración de metanol respecto a BPC-C; de igual manera a partir de BPC-1E se recuperó la mayor cantidad de HSR residual (Figura 3.11) lo que pudiera indicar que existe una utilización más eficiente del sustrato, esto dada una mayor actividad enzimática α -amilasa (Figura 3.6), lo que se ve reflejado en la liberación de AR, con la cual se esperaría una conversión a etanol conforme se liberen estos AR, obteniendo de esta manera un etanol con menor presencia de metanol. *T. hirsuta* ha demostrado ser un hongo con capacidad de fermentar almidón directamente, alcanzando capacidades de conversión del 89.2% teórico [63]. Por otro lado, *T. hirsuta* Bm-2 ha demostrado ser capaz de producir etanol a partir de HSR mediante un BPC, obteniendo 123.4 mL/kg de HSR [15].

Para el caso de *T. hirsuta* RT-1 presenta una capacidad fermentativa baja e hidrolítica alta con respecto a Bm-2 [89]. Las extracciones realizadas no tuvieron efecto en la producción de etanol, siendo la máxima concentración de 4.16 g/L para BPC-2E, pero sin diferencia estadística contra BPC-C y BPC-1E. Esto se puede atribuir a que la presencia y ausencia de compuestos fenólicos no tienen efecto inductor ni inhibidor sobre la producción de etanol, sin embargo, para la producción de metanol si se presentó una ligera disminución de concentración para BPC-2E. Para ambos casos, la exploración de estrategias como agitación y/o co-fermentación podrían ayudar mejorar la producción de etanol. Las vinazas generadas durante el proceso de fermentación deben ser caracterizadas para su evaluación como producto precursor en otros procesos.

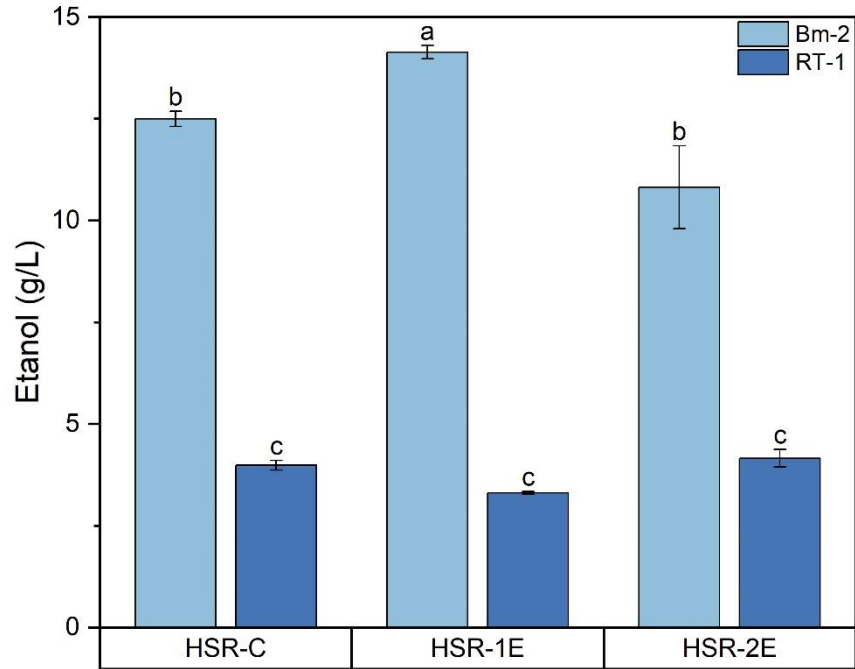


Figura 3.14 Producción de etanol alcanzada al día 12 de incubación. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).

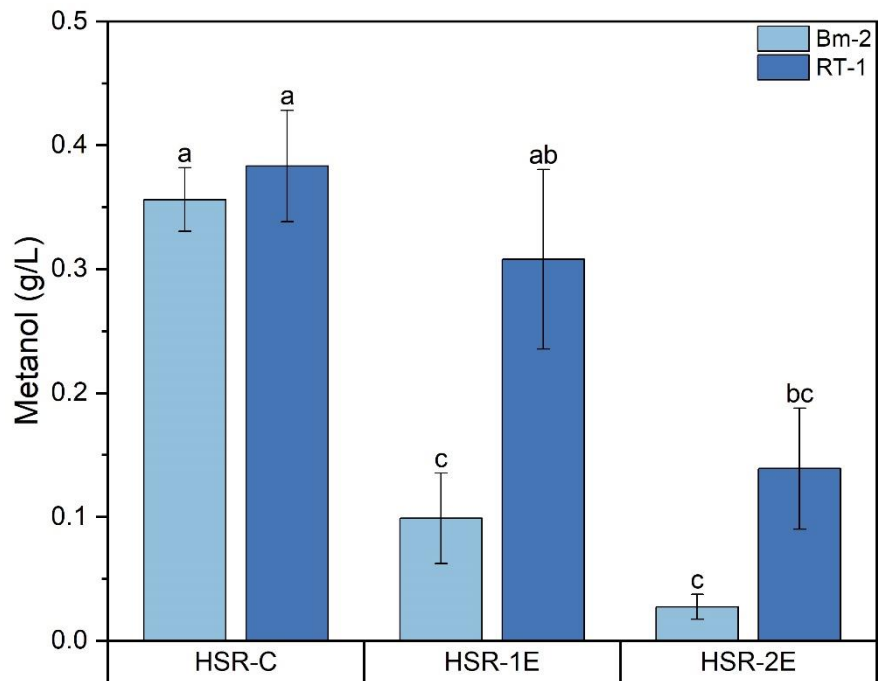


Figura 3.15 Producción de metanol al día 12 de incubación. Los resultados representan la media (n=3) y desviación estándar. Valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.5).

Con base a los resultados obtenidos y la nomenclatura propuesta por la Tarea 42 de Bioenergía de la Agencia Internacional de Energía (AIE) [64], se propone el siguiente modelo de biorrefinería (Figura 3.16) a partir del fruto de ramón (*Brosimum alicastrum*) la cual llevaría como nomenclatura: “Biorrefinería de 3 plataformas (harina de semilla, pericarpio y testa) a partir del fruto de *Brosimum alicastrum* para alimento, biocarbón, biogás, biohidrógeno, compuestos fenólicos, etanol, fertirriego, inductores y metanol mediante secado, extracciones, bioproceso consolidado, destilado, digestión anaeróbica y pirolisis”.

Este esquema parte del fruto de ramón, a partir del cual se obtienen 3 plataformas: HSR, pericarpio y testa. De los cuales, la semilla de ramón fue valorizada en este trabajo, en donde se propone el uso de las extracciones obtenidas, el micelio y la HSR residual del BPC. Así mismo, se mencionan propuestas para los posibles productos a obtener por medio del pericarpio y la testa.

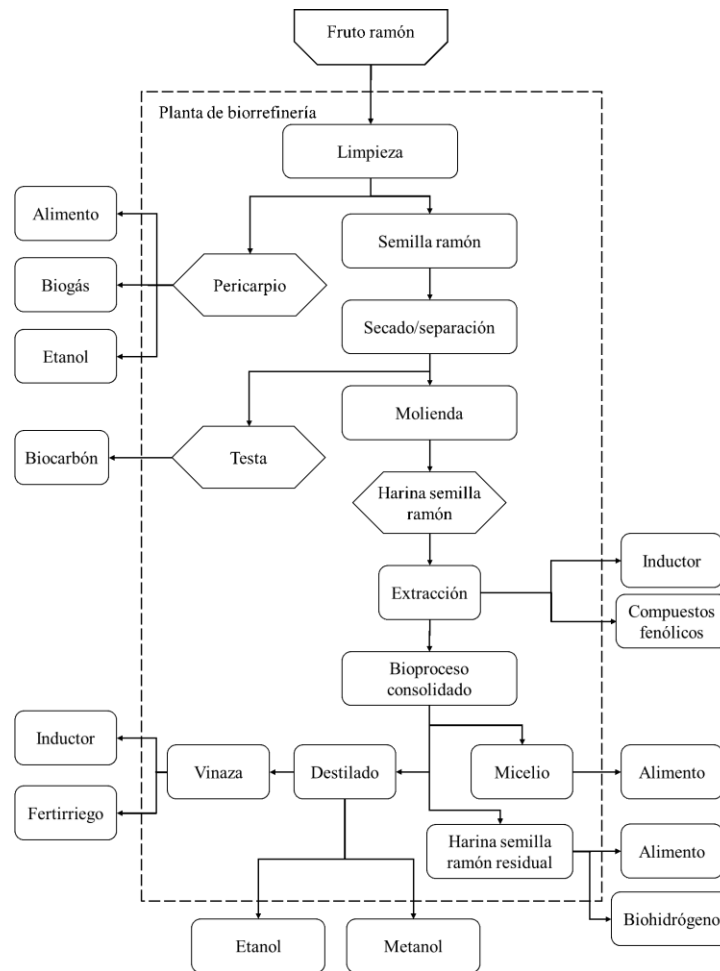


Figura 3.16 Modelo propuesto para una planta de biorrefinería a partir del fruto de ramón (*Brosimum alicastrum*). Aprovechamiento del pericarpio, testa y harina de semilla de ramón para la producción de etanol y productos de valor agregado.

CONCLUSIONES

A través de la metodología desarrollada de una extracción y doble extracción se obtuvo el 54.38% y 94.55%, respectivamente, de los compuestos solubles presentes en la harina de semilla de ramón.

Se demostró la presencia de compuestos fenólicos de interés y azúcares reductores presentes en las extracciones realizadas. Se identificó al ácido gálico como el compuesto fenólico con mayor concentración para 1E y 2E (2.75 y 1.19 g/kg de HSR).

Las cepas de *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1 fueron capaces de realizar un BPC a partir de la HSR-C, HSR-1E y HSR-2E sin necesidad de la adición de agentes externos.

La producción de etanol y co-productos variaron con respecto a la HSR utilizada. Con las extracciones se presentó una disminución en la generación de biomasa micelial y un aumento en la HSR residual.

La cepa de *T. hirsuta* Bm-2 presentó una mayor capacidad fermentativa con respecto a RT-1. Con HSR-1 se alcanzó la mayor concentración de etanol (14.14 g/L). Esto representa un aumento del 13.21% con respecto a HSR-C, con una menor utilización de HSR-1.

Para la cepa *T. hirsuta* RT-1, la remoción de compuestos solubles no tuvo un efecto significativo en la producción de etanol, sin embargo, presentó una mayor capacidad de sacarificación con respecto a Bm-2. Se obtuvieron los mejores resultados con HSR-C.

Mediante un esquema de biorrefinería se propone la utilización del pericarpio, testa y la harina de semilla de ramón como plataformas. Así mismo, el aprovechamiento de los compuestos solubles extraídos y los co-productos del BPC como productos de valor agregado o destinación a otros procesos para la generación de más productos.

PERSPECTIVAS

Caracterizar el pericarpio y la testa de la semilla de ramón para su utilización como materia prima en la producción de productos de valor agregado que contribuyan a mejorar el modelo de biorrefinería del fruto de ramón.

Explorar la aplicación de estrategias como agitación y/o co-fermentación que podrían ayudar a mejorar la producción de etanol al permitir una mejor interacción entre las enzimas y el sustrato.

Realizar la caracterización de las vinazas para su posible aplicación como fertirriego, producción de alimentos para animales, producción de biogás mediante digestión anaerobia entre otros.

Evaluar los productos obtenidos del BPC en sus posibles aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Qureshi, N., Hodge, D., Vertes, A. (2014). *Biorefineries Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels* (U.K: Elsevier Science)
- [2] Timilsina, G.R., Mevel, S., and Shrestha, A. (2011). Oil price, biofuels and food supply. *Energy Policy* 39, 8098–8105. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.10.004>
- [3] Ghoddusi, H. (2017). Price risks for biofuel producers in a deregulated market. *Renewable Energy* 114, 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.044>
- [4] Olguin Maciel, E. (2020). Bioproceso consolidado para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), utilizando el aislado nativo *Trametes hirsuta* Bm-2. Tesis de Doctorado, CICY, México.
- [5] Diario Oficial de la Federación (2016) Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5450011&fecha=29/08/2016. Consultado: Diciembre de 2020 (2016). 1–38.
- [6] Renó, M.L.G., Olmo, O.A. Del, Palacio, J.C.E., Lora, E.E.S., and Venturini, O.J. (2014). Sugarcane biorefineries: Case studies applied to the Brazilian sugar-alcohol industry. *Energy Conversion and Management* 86, 981–991. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.06.031>
- [7] Wagemann, K., and Tippkötter, N. (2019). *Biorefineries: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Switzerland: Springer Nature) <https://doi.org/10.1007/978-3-319-97119-3>
- [8] Bastidas-Oyanedel, J.-R., and Schmidt, J.E. (2019). *Biorefinery Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers* J.-R. Bastidas-Oyanedel and J. Ejbye Schmidt, eds. (Switzerland: Springer) <https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5>
- [9] Schmiele, M., Sampaio, U.M., and Pedrosa Silva Clerici, M.T. (2018). Basic principles: Composition and properties of starch. In *Starches for Food Application: Chemical, Technological and Health Properties* (Elsevier Inc.), pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809440-2.00001-0>
- [10] Kee, S.H., Chiongson, J.B. V., Saludes, J.P., Vigneswari, S., Ramakrishna, S., and Bhubalan, K. (2021). Bioconversion of agro-industry sourced biowaste into biomaterials via microbial factories – A viable domain of circular economy. *Environmental Pollution* 271, 116311. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116311>

- [11] Prieto-Sandoval, V., Jaca, C., and Ormazabal, M. (2018). Towards a consensus on the circular economy. *Journal of Cleaner Production* 179, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.224>
- [12] National Research Council (U.S.). Panel on Underexploited Tropical Plants with Promising Economic Value (1975). *Underexploited Tropical Plants with Promising Economic Value: Report* (Washington, D.C. USA: National Academy of Sciences)
- [13] Orantes García, C., Caballero Roque, A., and Velázquez Méndez, M.A. (2012). Aprovechamiento del árbol nativo *Brosimum alicastrum* Swartz (Moraceae) en la Selva Zoque Chiapas, México. *Lacandonia* 6, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.224>
- [14] Olguin-Maciel, 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., and Tapia-Tussell, R. (2017). *Brosimum alicastrum* as a novel starch source for bioethanol production. *Energies* 10. <https://doi.org/10.3390/en10101574>
- [15] Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Lappe-Oliveras, P.E., Barahona-Pérez, L.F., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R., Domínguez-Maldonado, J., Pacheco-Catalán, D., Ruíz, H.A., and Tapia-Tussell, R. (2019). Consolidated bioprocess for bioethanol production from raw flour of *Brosimum alicastrum* seeds using the native strain of *Trametes hirsuta* Bm-2. *Microorganisms* 7, 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110483>
- [16] Hernandez-Gonzalez, O., Vergara-Yoisura, S., and Larqué-Saavedra, A. (2014). Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula. *Bothalia Journal* 44, 70–81.
- [17] Hernández, O., Vergara, S., and Larqué, A. (2014). Primeras etapas de crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 6, 28–48.
- [18] Morales Ortiz, E.R., and Herrera Tuz, L.G. (2007). Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. Comisión Nacional Forestal, 1–18.
- [19] Berg, C.C. (1972). *Brosimum alicastrum* Sw. subsp. *alicastrum*. *Flora Neotropica Monograph* 7, 170–171.
- [20] Flores Muñoz, H.J., Reyes Sáenz, J.T., Rueda Sánchez, A., Gómez Cárdenas, M., Castillo Quiroz, D., and Castillo Reyes, F. (2018). Áreas potenciales para plantaciones forestales con *Brosimum alicastrum* Sw., con fines de restauración. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 9, 7–35. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i45.133>

- [21] SEMARNAT (2018). Principales beneficios de plantar árboles. <https://www.gob.mx/semarnat/es/articulos/principales-beneficios-de-plantar-arboles?idiom=es>. Consultado: Agosto de 2022. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- [22] Trujillo Nava, I.J., Negrete Hernández, J., García Arrazola, R., Úrsula, D., and Gimeno Seco, M. (2023). La nuez maya: una propuesta de alimento funcional en México. *Revista Digital Universitaria (RDU)* 24, 1–7. <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2023.24.1.7>
- [23] Sáyago-Ayerdi, S., Álvarez-Parrilla, E. (2018). Semilla de Ramón. In *Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados (Red ALSUB-CYTED)*, p. 24.
- [24] Tokpunar, H.K. (2010). Chemical composition and antioxidant properties of maya nut (*Brosimum alicastrum*). *AllTheses*, 13–39.
- [25] Jiménez Villareal, I.A. (2019). Efecto del ultrasonido en el proceso de sacarificación para la producción de bioetanol a partir de harina de Ramón. Tesis de Maestría, CICY, México.
- [26] Barquera Bibiano, Z. (2014). Obtención de bioetanol a partir de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw) Tesis de Maestría, CICY, México.
- [27] Peters, C.M., and Pardo-Tejeda, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico. *Economic Botany* 36, 166–175. <https://doi.org/10.1007/BF02858712>
- [28] Lozano, O., Shimada, A.S., and Avila, E. (1978). Valor Alimenticio De La Semilla Del Ramon (*Brosimum alicastrum*) para el pollo y el cerdo. *Técnica Pecuaria Mexicana* 34, 100–104.
- [29] Árevalo Salguero, A.I., and Bressani, R. (2013). Respuesta Glicémica de La Semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) En Mujeres de 16 a 25 Años de Edad, Residentes de La Ciudad Capital, Guatemala. *Revista* 25, 66–71.
- [30] Ozer, H.K. (2017). Phenolic compositions and antioxidant activities of Maya nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with commercial nuts. *International Journal of Food Properties* 20, 2772–2781. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1252389>
- [31] Moo-Huchin, V.M., Canto-Pinto, J.C., Cuevas-Glory, L.F., Sauri-Duch, E., Pérez-Pacheco, E., and Betancur-Ancona, D. (2019). Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of ramon nut (*Brosimum alicastrum*). *Chemical Papers* 73, 1647–1657. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00716-x>

- [32] Elaine, M.A., Buck, C. y Vall, K. (2009). *Pharmacology, A handbook for complementary healthcare professionals*, Churchill Livingstone, Elsevier, pp 149-166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06898-0.00021-9>
- [33] Basli, A., Belkacem, N., and Amrani, I. (2017). Health Benefits of Phenolic Compounds Against Cancers. In *Phenolic Compounds - Biological Activity* <https://doi.org/10.5772/67232>
- [34] Luna-Guevara, M.L., Luna-Guevara, J.J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H., and Ochoa-Velasco, C.E. (2018). Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. In *Studies in Natural Products Chemistry*, pp. 79–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>
- [35] Phenol Explorer (2021) Database on polyphenol content in foods. <http://phenol-explorer.eu/> Consultado: Junio de 2021 (2015).
- [36] de la Rosa, L.A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J., and Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (Elsevier Inc.), pp. 253–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- [37] Roleira, F.M.F., Varela, C.L., Costa, S.C., and Tavares-da-Silva, E.J. (2018). Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity. In *Studies in Natural Products Chemistry*, pp. 115–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00004-1>
- [38] Grigore, A. (2017). Plant Phenolic Compounds as Immunomodulatory Plant Phenolic Compounds as Immunomodulatory Agents Agents. In *Phenolic Compounds - Biological Activity*, M. Soto Hernandez, M. Palma Tenango, and M. del R. Garcia Materos, eds. (Intech), pp. 75–98. <https://doi.org/10.5772/66112>
- [39] Gonçalves, S., Romano, A., Gonçalves, S., and Romano, A. (2017). Inhibitory Properties of Phenolic Compounds Against Inhibitory Properties Phenolic Compounds Against Enzymes Linked with of Human Diseases Enzymes Linked with Human Diseases. In *Phenolic Compounds - Biological Activity*, M. Soto Hernandez, M. Palma Tenango, and M. del R. Garcia Materos, eds. (Intech), pp. 99–118. <https://doi.org/10.5772/66844>
- [40] Jahromi, S.G. (2019). Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. In *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds* <https://doi.org/10.5772/intechopen.84705>

- [41] Friedl, A., and Meyers, R.A. (2012). Encyclopedia of Sustainability Science and Technology. Springer, New York, NY, pp 987-1001. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0851-3_432
- [42] Energy International Agency (2021). Bioenergy. <https://www.iea.org/reports/renewables-2021/biofuels?mode=transport®ion=World&publication=2021&flow=Consumption&product=Ethanol>. Consultado: Noviembre de 2022.
- [43] Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* 51, 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- [44] Renewable Fuels Association (2022). PZEROING on NEW OPPORTUNITIES (2022 ETHANOL INDUSTRY OUTLOOK). <https://ethanolrfa.org/resources/annual-industry-outlook>. Consultado: Noviembre de 2022.
- [45] Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., and Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology* 199. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>
- [46] Olguin Maciel, E. (2015). Estudio para optimizar la obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.). Tesis de Maestría, CICY, México.
- [47] Sui, Z., and Kong, X. (2018). Physical modifications of starch M. Hill, ed. (Singapore: Springer Nature) <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0725-6>
- [48] Stichnothe, H., Meier, D., and de Bari, I. (2016). Biorefineries: Industry Status and Economics. In *Developing the Global Bioeconomy: Technical, Market, and Environmental Lessons from Bioenergy* (Elsevier Inc.), pp. 41–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805165-8.00003-3>
- [49] Drapcho, C.M., and Ph, D. (2008). *Biofuels Engineering Process Technology* [https://doi.org/10.1016/s1351-4180\(08\)70584-1](https://doi.org/10.1016/s1351-4180(08)70584-1)
- [50] Dayton, D.C., and Foust, T.D. (2020). Biomass Conversion. In *Analytical Methods for Biomass Characterization and Conversion*, pp. 37–61. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815605-6.00003-2>
- [51] Gemtos, T.A., Chouliaras, N., and Marakis, S. (1999). Vinasse rate, time of application and compaction effect on soil properties and durum wheat crop. *Journal of Agricultural Engineering Research* 73, 283–296. <https://doi.org/10.1006/jaer.1999.0419>

- [52] Carrilho, E.N.V.M., Labuto, G., and Kamogawa, M.Y. (2016). Destination of Vinasse, a Residue From Alcohol Industry: Resource Recovery and Prevention of Pollution. In *Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention* (Elsevier Inc.), pp. 21–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803837-6.00002-0>
- [53] España-Gamboa, E.I., Mijangos-Cortés, J.O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J.A.D., and Alzate-Gaviria, L.M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels* 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-82>
- [54] Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacís, R., and Solís-Pereira, S. (2015). Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. *Molecules* 20, 15147–15157. <https://doi.org/10.3390/molecules200815147>
- [55] Merklein, K., Fong, S.S., and Deng, Y. (2016). Biomass Utilization. In *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization* (Elsevier B.V.), pp. 291–324. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00011-X>
- [56] Putro, J.N., Soetaredjo, F.E., Lin, S.Y., Ju, Y.H., and Ismadji, S. (2016). Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances* 6, 46834–46852. <https://doi.org/10.1039/c6ra09851g>
- [57] Ishizaki, H., and Hasumi, K. (2013). Ethanol Production from Biomass. In *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems* (Elsevier), pp. 243–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404609-2.00010-6>
- [58] Minty, J.J., and Lin, X.N. (2015). Engineering Synthetic Microbial Consortia for Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Biomass into Valuable Fuels and Chemicals. In *Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels* (Elsevier B.V.), pp. 365–381. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59592-8.00018-X>
- [59] Scarlata, C.J., Davis, R.E., Tao, L., Tan, E.C.D., and Bidy, M.J. (2015). Perspectives on Process Analysis for Advanced Biofuel Production. In *Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels* (Elsevier B.V.), pp. 33–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59592-8.00003-8>
- [60] Olguin-Maciel, E., Singh, A., Chable-Villacis, R., Tapia-Tussell, R., and Ruiz, H.A. (2020). Consolidated bioprocessing, an innovative strategy towards sustainability for biofuels

- production from crop residues: An overview. *Agronomy* 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111834>
- [61] Wilkinson, S., Smart, K.A., James, S., and Cook, D.J. (2017). Bioethanol Production from Brewers Spent Grains Using a Fungal Consolidated Bioprocessing (CBP) Approach. *Bioenergy Research* 10, 146–157. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9782-7>
- [62] Jouzani, G.S., and Taherzadeh, M.J. (2015). Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: A comprehensive review. *Biofuel Research Journal* 2, 152–195. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.4>
- [63] Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N., and Yanase, H. (2011). Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.12.001>
- [64] Hingsamer, M., and Jungmeier, G. (2018). Biorefineries. In *The Role of Bioenergy in the Emerging Bioeconomy: Resources, Technologies, Sustainability and Policy* (Elsevier Inc.), pp. 179–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813056-8.00005-4>
- [65] Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- [66] Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144.
- [67] Johannes, C., and Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 524–528. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.524-528.2000>
- [68] Wang, Y. chuan, Hu, H. fang, Ma, J. wen, Yan, Q. juan, Liu, H. jie, and Jiang, Z. qiang (2020). A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry* 305, 125447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125447>
- [69] Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D.T. (2008). Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory.
- [70] Mariotti, F., Tomé, D., and Mirand, P.P. (2008). Converting nitrogen into protein - Beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 177–184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>

- [71] Pérez-Salcedo, K.Y., Shi, X., Kannan, A.M., Barbosa, R., Quintana, P., and Escobar, B. (2019). N-doped porous carbon from *Sargassum* spp. As efficient metal-free electrocatalysts for O₂ reduction in alkaline fuel cells. *Energies* 12. <https://doi.org/10.3390/en12030346>
- [72] Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Rojas-Herrera, R., Cortes-Velazquez, A., Rivera-Muñoz, G., and Solis-Pereira, S. (2011). New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. *African Journal of Biotechnology* 10, 10134–10142. <https://doi.org/10.5897/ajb11.331>
- [73] Kouar, J., Lamsaddek, A., Benchekroun, R., El Amrani, A., Cherif, A., Ould Bellahcen, T., and Kamil, N. (2019). Comparison between electrocoagulation and solvent extraction method in the process of the dechlorophyllation of alcoholic extracts from Moroccan medicinal plants *Petroselinum crispum*, *Thymus satureioides* and microalgae *Spirulina platensis*. *SN Applied Sciences* 1. <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0137-1>
- [74] Nayeem, N., SMB, A., Salem, H., and AHEI-Alfgy, S. (2016). Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. *Journal of Applied Pharmacy* 8. <https://doi.org/10.4172/1920-4159.1000213>
- [75] Goldberg, I., and Rokem, J.S. (2009). Organic and Fatty Acid Production, Microbial Defining Statement Introduction Organic Acids Fatty Acids Conclusions Further Reading. In *Encyclopedia of Microbiology*, M. Schaechter, ed. (Oxford, UK: Academic Press), pp. 421–442. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00156-5>
- [76] Monteiro Espíndola, K.M., Ferreira, R.G., Mosquera Narvaez, L.E., Rocha Silva Rosario, A.C., Machado Da Silva, A.H., Bispo Silva, A.G., Oliveira Vieira, A.P., and Chagas Monteiro, M. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- [77] Boo, Y.C. (2019). *p*-coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. *Antioxidants* 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8080275>
- [78] Mota, M.I.F., Pinto, P.C.R., Loureiro, J.M., and Rodrigues, A.E. (2016). Recovery of Vanillin and Syringaldehyde from Lignin Oxidation: A Review of Separation and Purification Processes. *Separation and Purification Reviews* 45, 227–259. <https://doi.org/10.1080/15422119.2015.1070178>
- [79] Srivastava, P., Andersen, P.C., Marois, J.J., Wright, D.L., Srivastava, M., and Harmon, P.F. (2013). Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in

- Botryosphaeria* isolates. *Crop Protection* 43, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.015>
- [80] Subiria-Cueto, R., Larqué-Saavedra, A., Reyes-Vega, M., de la Rosa, L., Santana-Contreras, L., Gaytán-Martínez, M., Vázquez-Flores, A., Rodrigo-García, J., Corral-Avitia, A., Núñez-Gastélum, J., et al. (2019). Improve the Nutritional Properties and Functional Potential of the Wheat Flour Tortilla. *Foods* 8, 1–18.
- [81] Pérez-Pacheco, E., Moo-Huchin, V.M., Estrada-León, R.J., Ortiz-Fernández, A., May-Hernández, L.H., Ríos-Soberanis, C.R., and Betancur-Ancona, D. (2014). Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz Seeds. *Carbohydrate Polymers* 101, 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.012>
- [82] Hess, D., Wendt, L.M., Wahlen, B.D., Aston, J.E., Hu, H., and Quinn, J.C. (2019). Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. *Biomass and Bioenergy* 123, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.02.010>
- [83] Carrillo, M.A., Staggenborg, S.A., and Pineda, J.A. (2014). Washing sorghum biomass with water to improve its quality for combustion. *Fuel* 116, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.028>
- [84] Lacey, J.A., Aston, J.E., and Thompson, V.S. (2018). Wear properties of ash minerals in biomass. *Frontiers in Energy Research* 6, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00119>
- [85] Akrotos, C.S., Tekerlekopoulou, A.G., Vasiliadou, I.A., and Vayenas, D. V. (2017). Composting of olive mill waste for the production of soil amendments. In *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management* (Elsevier Inc.), pp. 161–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00008-X>
- [86] Brust, G.E. (2019). Management strategies for organic vegetable fertility. In *Safety and Practice for Organic Food* (Elsevier Inc.), pp. 193–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812060-6.00009-X>
- [87] Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, L., Islas-Flores, I., Rivera-Muñoz, G., Ancona-Escalante, W., and Solís-Pereira, S. (2015). Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Letters in Applied Microbiology* 61, 252–258. <https://doi.org/10.1111/lam.12451>
- [88] Chablé-Villacis, R., Olguin-Maciel, E., Toledano-Thompson, T., Alzate-Gaviria, L., Ruiz, H.A., and Tapia-Tussell, R. (2021). Enzymatic hydrolysis assisted with ligninocellulolytic

- enzymes from *Trametes hirsuta* produced by pineapple leaf waste bioconversion in solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01851-w>
- [89] Garza Garza, C.L. (2021). Sacarificación y co-fermentación simultánea para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de *Brosimum alicastrum*. Tesis de Maestría, CICY, México.
- [90] Sánchez Blanco, A., Palacios Durive, O., Batista Pérez, S., Díaz Montes, Z., and Pérez Guerra, N. (2016). Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.019>
- [91] Alfenas, A.C., Hubbes, M., and Couto, L. (1982). Effect of phenolic compounds from *Eucalyptus* on the mycelial growth and conidial germination of *Cryphonectria cubensis*. *Canadian Journal of Botany* 60, 2535–2541. <https://doi.org/10.1139/b82-307>
- [92] Thompson, D.P. (1997). Effect of phenolic compounds on mycelial growth of *Fusarium* and *Penicillium* species. *Journal of Food Protection* 60, 1262–1264. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.10.1262>
- [93] Hapon, M.V., Boiteux, J.J., Fernández, M.A., Lucero, G., Silva, M.F., and Pizzuolo, P.H. (2017). Effect of phenolic compounds present in argentinian plant extracts on mycelial growth of the plant pathogen *Botrytis cinerea* Pers. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 86, 270–277. <https://doi.org/10.32604/phyton.2017.86.270>
- [94] Scaglioni, P.T., Quadros, L., de Paula, M., Furlong, V.B., Abreu, P.C., and Badiale-Furlong, E. (2018). Inhibition of enzymatic and oxidative processes by phenolic extracts from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp. *Food Technology and Biotechnology* 56, 344–353. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5495>
- [95] Peralta, R.M., da Silva, B.P., Gomes Côrrea, R.C., Kato, C.G., Vicente Seixas, F.A., and Bracht, A. (2017). Enzymes from *Basidiomycetes* - Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (Elsevier Inc.), pp. 119–149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>

- [96] Barchuk, M.L., Fonseca, M.I., Giorgio, E.M., and Zapata, P.D. (2020). Effects of pH, temperature and incubation time on fungal growth and laccase activity in *Trametes villosa* BAFC 2755. *RECyT*, 92–98.
- [97] Di Lonardo, D.P., van der Wal, A., Harkes, P., and de Boer, W. (2020). Effect of nitrogen on fungal growth efficiency. *Plant Biosystems* 154, 433–437. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1779849>
- [98] Abd El-Zaher, E.H.F., Mahmoud, Y.A.G., and Aly, M.M. (2011). Effect of different concentrations of phenol on growth of some fungi isolated from contaminated soil. *African Journal of Biotechnology* 10, 1384–1392. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i8>.
- [99] Yu, Q., Guo, M., Zhang, B., Wu, H., Zhang, Y., and Zhang, L. (2020). Analysis of Nutritional Composition in 23 Kinds of Edible Fungi. *Journal of Food Quality* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8821315>
- [100] Alam, N., Amin, R., Khan, A., Ara, I., Shim, M.J., Lee, M.W., and Lee, T.S. (2008). Nutritional Analysis of Cultivated Mushrooms in Bangladesh - *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. *Mycobiology* 36, 228. <https://doi.org/10.4489/myco.2008.36.4.228>
- [101] Niedzielski, P., Mleczek, M., Budka, A., Rzymiski, P., Siwulski, M., Jasińska, A., Gąsecka, M., and Budzyńska, S. (2017). A screening study of elemental composition in 12 marketable mushroom species accessible in Poland. *European Food Research and Technology* 243, 1759–1771. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2881-7>
- [102] Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L.A., Martínez, N.R., and González Aguilar, G.A. (2007). Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5, 329–334. <https://doi.org/10.1080/11358120709487708>
- [103] Dhankhar, R., and Hooda, A. (2011). Fungal biosorption - an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology* 32, 467–491. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>
- [104] Kumar, N.S., Boddu, V.M., and Krishnaiah, A. (2009). Biosorption of phenolic compounds by *Trametes versicolor* polyporus fungus. *Adsorption Science and Technology* 27, 31–46. <https://doi.org/10.1260/026361709788921597>

- [105] Zhang, J., and Elser, J.J. (2017). Carbon: Nitrogen: Phosphorus stoichiometry in fungi: A meta-analysis. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01281>
- [106] Ma, R., Yang, R., Liu, X., Chen, Z., Yang, C., and Wang, S. (2015). Chemical composition and immunomodulatory activity of mycelia of the hairy bracket mushroom, *Trametes hirsuta* (Higher basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* 17, 267–276. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i3.60>.
- [107] Choi, Y., Ryu, J., and Lee, S.R. (2020). Influence of carbon type and carbon to nitrogen ratio on the biochemical methane potential, pH, and ammonia nitrogen in anaerobic digestion. *Journal of Animal Science and Technology* 62, 74–83. <https://doi.org/10.5187/JAST.2020.62.1.74>
- [108] Muthudineshkumar, R., and Anand, R. (2019). Anaerobic digestion of various feedstocks for second-generation biofuel production. In *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment* (Elsevier Ltd.), pp. 157–185. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102728-8.00006-1>
- [109] Thompson, T.M., Young, B.R., and Baroutian, S. (2020). Pelagic *Sargassum* for energy and fertiliser production in the Caribbean: A case study on Barbados. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 118, 109564. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109564>
- [110] Reyna-Gómez, L.M., Molina-Guerrero, C.E., Alfaro, J.M., Vázquez, S.I.S., Robledo-Olivo, A., and Cruz-López, A. (2019). Effect of carbon/nitrogen ratio, temperature, and inoculum source on hydrogen production from dark codigestion of fruit peels and sewage sludge. *Sustainability* 11, 1–13. <https://doi.org/10.3390/SU11072139>
- [111] Lin, C.Y., and Lay, C.H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 41–45. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00083-1)
- [112] Carosia, M.F., dos Reis, C.M., de Menezes, C.A., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., and Silva, E.L. (2021). Homoacetogenesis: New insights into controlling this unsolved challenge by selecting the optimal C/N ratio, C/P ratio and hydraulic retention time. *Process Safety and Environmental Protection* 145, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.08.009>