



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CENTRO CONJUNTO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA
SUSTENTABLE UAEM - UNAM**

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS DE *Psidium guajava* UTILIZANDO A
Pilobolus sp. Y *Saccharomyces cerevisiae*.**

TESIS

Que para obtener el título de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta:

I.B.I. MAURICIO ROA MORALES

Dirigido por:

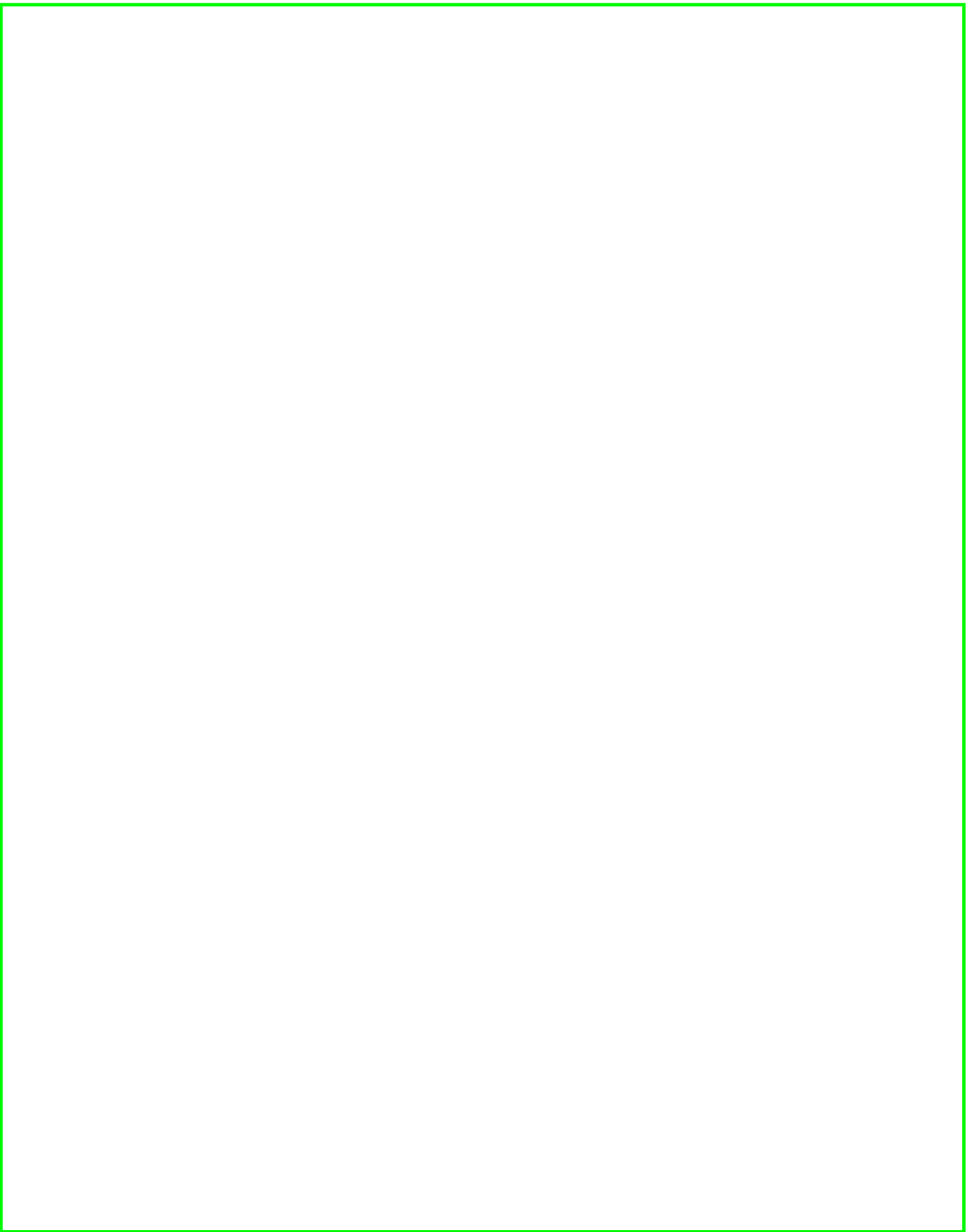
DRA. PATRICIA BALDERAS HERNÁNDEZ

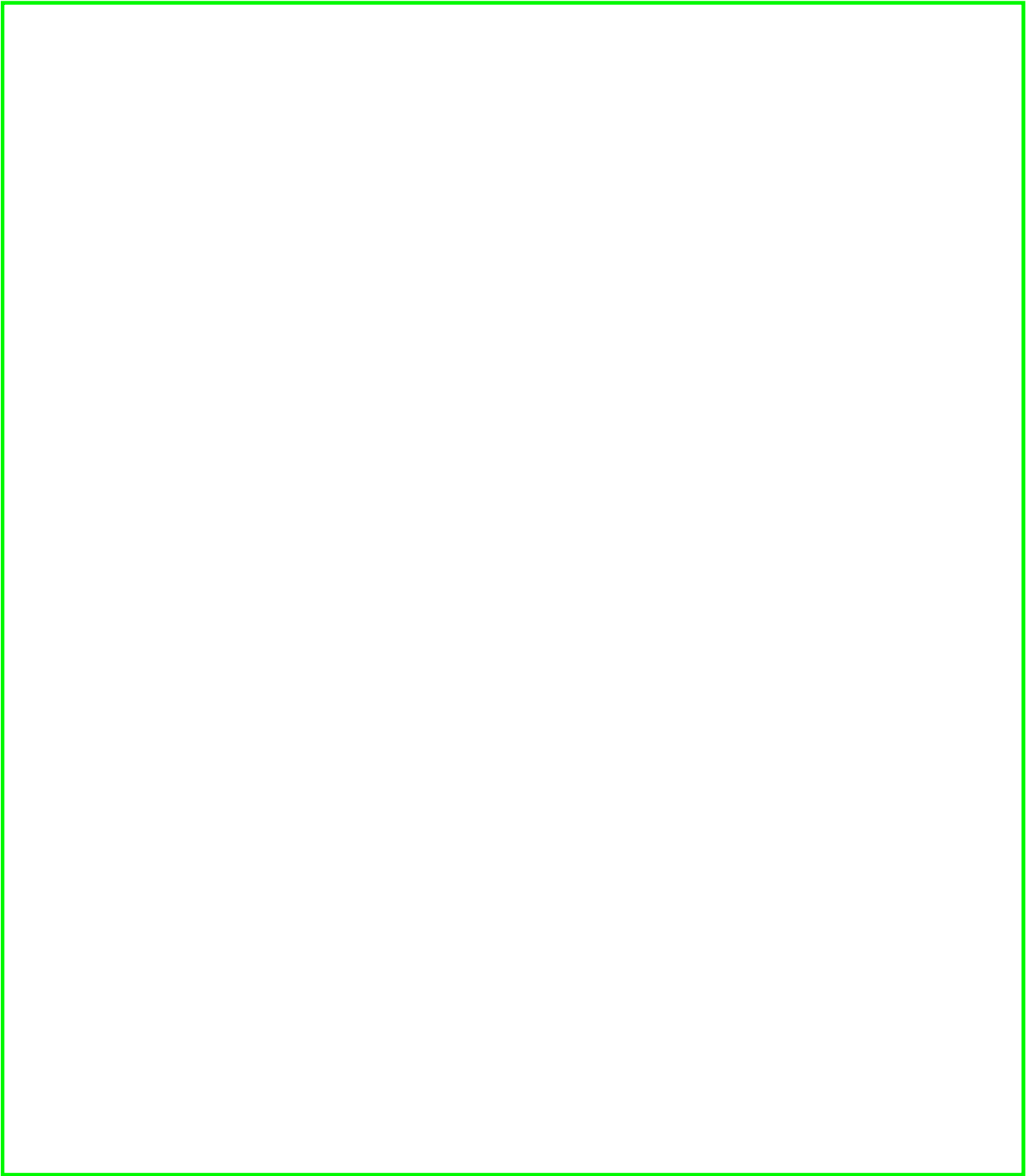
DR. MOISÉS TEJOCOTE PÉREZ



Toluca, Edo de México

Diciembre, 2020





La presente tesis se realizó en el área de Calidad Ambiental y en la línea de Prevención control y efectos de la Calidad ambiental

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO 1	15
1 ANTECEDENTES	16
1.1 Problemas ambientales y económicos.	16
1.2 ¿Por qué el bioetanol?	17
1.3 El etanol como combustible de transporte y cómo aditivo de combustible.....	18
1.4 Recurso y composición de la biomasa.	19
1.4.1 Lignina.	20
1.4.2 Hemicelulosa	20
1.4.3 Celulosa	21
1.5 Tendencias de la bioconversión de la lignocelulosa a biocombustibles.	21
1.6 Fermentación en medio sólido.	24
1.7 La degradación enzimática.....	25
1.8 Procesos de degradación aeróbica y anaeróbica.....	26
1.8.1 Condiciones Anaeróbicas	26
1.8.2 Condiciones Aerobias	27
1.9 Microorganismos utilizados para la producción de etanol.	29
1.9.1 <i>Pilobolus</i> sp.....	30
1.9.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.10 Guayaba, cultivo, beneficios.....	33
1.11 Tecnología avanzada de pretratamiento.	34

CAPÍTULO 2	36
2 JUSTIFICACIÓN	37
2.1 HIPÓTESIS.....	38
2.2 OBJETIVOS	38
2.2.1 General.....	38
2.2.2 Específicos.....	38
CAPÍTULO 3	40
3 METODOLOGÍA	41
3.1 Tipo de Investigación.....	41
3.2 Propagación y conservación de <i>Pilobolus sp.</i>	43
3.3 Propagación y conservación de <i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	45
3.4 Recolección de los residuos de guayaba.	46
3.5 Valoración de los pretratamientos para obtener azúcares reductores.	47
3.5.1 Sin Hidrólisis (Solubilización).....	47
3.5.2 Hidrólisis Térmica	48
3.5.3 Hidrolisis Termoquímica	48
3.5.4 Hidrólisis enzimática.	48
3.6 Determinación de Azúcares Reductores.	49
3.6.1 Reactivo de DNS	50
3.7 Determinación de Azúcares Totales.....	50
3.7.1 Reactivo de Azúcares Totales	52
3.8 Fermentación	52
3.9 Determinación de bioetanol por HPLC	54
CAPÍTULO 4	56
4 Resultados y discusión de resultados.	57

4.1	Eficiencia de los pretratamientos para la obtención de azúcares reductores... 57
4.1.1	Obtención de azúcares reductores (AR) de acuerdo con el tipo de pretratamiento..... 57
4.1.2	Ecuación de balances de materia para la obtención de resultados. 57
4.2	Fermentación 58
4.3	Bioetanol 59
4.3.1	Obtención de bioetanol con <i>Pilobolus</i> 59
4.3.2	Obtención de Bioetanol con <i>Saccharomyces</i> 61
5	Conclusión..... 65
6	BIBLIOGRAFÍA..... 66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las materias primas lignocelulósicas.....	22
Tabla 2. Degradación anaeróbica.....	27
Tabla 3. Microorganismos que degradan Lignina.....	28
Tabla 4. Sustratos utilizados por levaduras y bacterias para la producción de etanol.....	29
Tabla 5. Microorganismos que utilizan la glucosa anaeróbicamente en la producción de etanol.....	30
Tabla 6. Principales componentes de la Guayaba.....	34
Tabla 7. Nuevos pretratamientos para la obtención de azúcares reductores.....	35
Tabla 8. Cuantificación de AR después de cada pretratamiento.....	58
Tabla 9. Producción de bioetanol utilizando a <i>Pilobolus</i> sp.....	59
Tabla 10. Producción de bioetanol utilizando a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
Tabla 11. Comparación de las fermentaciones con ambos microorganismos.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Asociación de moléculas de celulosa en la pared celular de la planta.....	23
Figura 2. Diagrama de flujo para la producción de bioetanol.	42
Figura 3. Secuencia para obtener los esporangios de <i>Pilobolus</i> sp.....	44
Figura 4. Mecanismo para catapultar al esporangio.	45
Figura 5. Mecanismo de reacción de Azúcares Reductores.	50
Figura 6. Mecanismo de reacción de Azúcares Totales, deshidratación.	51
Figura 7. Formación de inhibidores.....	52
Figura 8. Producción de bioetanol a las 12 h con <i>S. cerevisiae</i>	63

RESUMEN

En los últimos años, se ha incrementado el interés y el beneficio por obtener nuevos combustibles, debido a la contaminación ambiental, al crecimiento de la población y sobre todo al desequilibrio económico alrededor del mundo. La generación de gases con efecto invernadero incrementa de manera acelerada cada año, los biocombustibles surgen como una alternativa para poder solucionar parte del problema. El bioetanol es uno de los biocombustibles más utilizados, sin embargo, el proceso para la obtención de éste conlleva al seguimiento de una serie de pretratamientos que es de un alto valor agregado a la materia prima y microorganismos involucrados, por ello la importancia de seleccionar y establecer una fase con condiciones que permitan lograr que la optimización de este sea tanto barato como de alto rendimiento. Además, también es necesario considerar las técnicas analíticas adecuadas para obtener resultados confiables sin necesidad de gastar más en reactivos. Adicional al problema económico y contaminación del aire, está la acumulación de residuos sólidos entre ellos desechos orgánicos en general, como las cáscaras de frutas o verduras, provocando contaminación al medio ambiente.

La producción de bioetanol es posible a partir de los residuos lignocelulósicos (RL) de la guayaba *Psidium guajava*, primeramente se recolectaron los RL para poder deshidratarlos y posteriormente trocearlos hasta reducir el tamaño de partícula de la materia prima, para obtener harina seca de guayaba HSG, esta HSG fue sometida a diferentes pretratamientos como; la solubilización, el térmico, el termoquímico y finalmente el termoquímico enzimático para la obtención de azúcares reductores (AR), los cuales fueron cuantificados para tipificar que pretratamiento favorece más en la obtención de los AR, debido a que estos azúcares son fermentados para la obtención del bioetanol con ayuda de dos especies de microorganismos como; *Pilobolus* sp., la importancia de este trabajo es la introducción de este hongo que se ha identificado con el potencial para ser utilizado industrialmente en la producción del metabolito de interés. Teniendo como referencia a *Saccharomyces cerevisiae* una levadura de uso en bioprocesos industriales que se ha utilizado durante años, para la producción del compuesto de interés como los biocombustibles.

ABSTRACT

In recent years, the interest and benefits of obtaining new types of fuel has increased due to environmental pollution, population growth and especially economic imbalance around the world. Greenhouse gas generation increases rapidly each year, biofuels emerge as an alternative to solve part of the problem. Bioethanol is one of the most widely used biofuels, however, the process of obtention involves monitoring a series of treatments that are of high added value to the raw material and microorganisms involved, therefore it is of utmost importance to select and establish a phase which ensures conditions to make the optimization both cheaper and higher performing. In addition, it is also necessary to consider the right analytical techniques to obtain reliable results without spending more on chemical reagents. In addition to the economic problem and air pollution a problem to take into consideration is the accumulation of solid wastes including organic, such as fruit or vegetable peels, which cause contamination to the environment.

The production of bioethanol is possible from the lignocellulosic residues (LR) of guava *Psidium guajava*, first the LRs are collected so that they can be dehydrated and then cut to reduce the particle size of the raw material, in order to obtain dry flour of guava DFG, this DFG was then subjected to different pretreatments such as; solubilization, thermal, thermochemical and finally enzymatic thermochemical to obtain reducing sugars (RA), which were quantified to typify the pretreatment that favors more the obtention of RAs, because these sugars are fermented for obtaining bioethanol with the help of two species of microorganisms such as; *Pilobolus* sp. , the importance of this work is the introduction of this fungus that has been identified with the potential to be used industrially in the production of the metabolite of interest. Having as reference *Saccharomyces cerevisiae* a yeast used in industrial bioprocesses that has been employed for years to produce the compound of interest such as biofuels.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la explotación de los recursos fósiles, producto de la demanda tanto del sector energético como industrial, ha conducido a una disminución considerable de las reservas probadas que, aunado al cambio climático, nos ha llevado a considerar fuentes renovables y sustentables, de energía y de materias primas para las industrias de la transformación.

Las fuentes renovables, como la biomasa lignocelulósica, representan un fructuoso punto de partida para la producción de biocombustibles y otros productos de interés. Como se aborda en el capítulo 1, que habla de los antecedentes del aporte al medio ambiente con la producción del alcohol, como uso de combustible.

En el capítulo 2, se menciona sobre la justificación del problema en el cual hay un aprovechamiento de estas fuentes que pueden impactar favorablemente en la utilización de los residuos de la industria, para lograr acoplarse a las demandas energéticas que requiere la sociedad, además esto podrá apoyar a una adaptación de la industria actual a un modelo más sustentable.

El interés que ha despertado la biomasa lignocelulósica, en el campo de la investigación reside en el carácter renovable de este recurso. Los productos obtenidos de esta fuente, los biocombustibles presentan menor producción de gases de efecto invernadero, esto en comparación a los combustibles fósiles. Además, el aprovechamiento de esta fuente no rivaliza con los productos alimenticios, ya que de esta materia prima solo se emplean los residuos agrícolas, forestales y agroindustriales por ello en el capítulo 3, se describen los pretratamientos experimentales para lograr una mayor cantidad de AR, así como el proceso de fermentación con las condiciones a las que fue sometió el proceso, finalmente la cuantificación del bioetanol y la identificación de algunas sustancias de interés industrial.

Actualmente, la utilización de la lignocelulosa procedente de residuos orgánicos se considera como una fuente para la obtención de bioetanol. El biocombustible obtenido a partir de residuos orgánicos ha sido proclamado como una alternativa al combustible derivados del petróleo, debido que se considera que es limpio, renovable y ecológico. En

el capítulo 4, se describen los resultados, la discusión de los resultados y conclusión. En la discusión de resultados finalmente se discutirá las ventajas de los métodos tradicionales para la obtención de los AR, así como la contraparte de estos procesos, las ventajas de los nuevos pretratamientos propuestos en este trabajo de posgrado y las nuevas propuestas en las que posiblemente ayudarían a eficientizar este bioproceso.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1 ANTECEDENTES

1.1 Problemas ambientales y económicos.

Gran parte del mundo, enfrenta complejos problemas económicos, ambientales relacionados con el uso de la energía que deben abordarse si queremos mantener y mejorar nuestros estilos de vida. Como resultado, muchos otros países buscaron desarrollar nuevas fuentes de energía, que reducirían las importaciones de petróleo y mejorarían su fortaleza estratégica y económica. Sin embargo, el interés (y la financiación) para tal trabajo disminuyó cuando los precios del petróleo cayeron, y pocos sustitutos del petróleo han avanzado al uso comercial. Mientras tanto, las importaciones se han incrementado nuevamente hasta el punto de que la dependencia del petróleo está alcanzando los niveles observados durante las interrupciones anteriores, y algunas fuentes están comenzando a predecir una recurrencia de eventos económicos pasados, que podrían volver a perturbar gravemente nuestra economía. Los problemas podrían convertirse en un futuro próximo, también nos enfrentaremos con consecuencias ambientales, incluso mayores si no cambiamos nuestros patrones de uso de energía. Se avecina una creciente preocupación por la acumulación de dióxido de carbono (CO₂) y otros llamados gases de efecto invernadero en la atmósfera, que podría atrapar el calor que normalmente irradia la tierra, y provocar un cambio climático global. Si bien existe cierta incertidumbre en tales predicciones, el consenso está construyendo que el cambio climático global está comenzando, y si estas predicciones resultan ser ciertas, las consecuencias de los cambios climáticos resultantes serán sustanciales, se sentirán ampliamente y será difícil (quizás imposible) revertir continuar en nuestro camino actual. Los efectos económicos y sociales del cambio climático global probablemente palidecerán todo lo que ha ocurrido en los últimos tiempos. Wyman, C. (1996), Handbook on Bioetanol Production and Utilization. El uso de biomasa como los residuos agroindustriales lignocelulósicos es el potencial prometedor natural renovable, económico, rentable y sostenible, fuentes utilizadas para la producción considerable y comercial de bioenergía como bioetanol (Gupta & Prakash, 2015).

1.2 ¿Por qué el bioetanol?

Un combustible que tiene el potencial de igualar las características convenientes del petróleo a un bajo precio es el etanol producido a partir de recursos de biomasa lignocelulósica, convenientemente denominado bioetanol. Sin embargo el bioetanol celulósico, producido a partir de pastos y árboles perennes, que protegen las tierras vulnerables a la erosión y restaura las tierras degradadas por el uso excesivo, puede ser positivo en el cambio del uso de la tierra y aumentar la biodiversidad (Morales, Quintero, Conejeros, & Aroca, 2015).

El bioetanol se puede producir a partir de fuentes de biomasa abundantes en el país, incluidos residuos agrícolas, forestales, papel de desecho y otras porciones considerables de residuos sólidos municipales, así como diversos flujos de desechos industriales y, en última instancia, cultivos leñosos y herbáceos cultivados en tierras subutilizadas para soportar bioetanol a gran escala de producción. Cuando se agrega a la gasolina, el etanol mejora la combustión, de este modo reduce así las emisiones de CO y de los hidrocarburos no quemados que forman humo. En general, los impactos en el medio ambiente por el uso de bioetanol, en comparación con el uso de gasolina son más bajos en las categorías de impactos de metales pesados y el agotamiento de la capa de ozono, sin embargo, (Zah et al., 2007) mostraron resultados negativos para el bioetanol en esas categorías.

Un motor correctamente ajustado también puede lograr una mayor eficiencia con etanol puro que con gasolina, lo que compensa en gran medida su contenido de energía algo menor. Al aplicar las fuentes de biotecnología que avanzan rápidamente a la producción de bioetanol en los últimos años, la tecnología ha mejorado hasta el punto de que el bioetanol, es ahora competitivo para la mezcla de gasolina con etanol que actualmente se fabrica a partir del maíz. Además, cuando se emplean flujos de desechos de bajo costo y otras ventajas del mercado, el costo de la producción de bioetanol puede ser muy bajo con la tecnología actual. La producción anual de bioetanol fue de 27.050 millones de litros, Estados Unidos, Brasil, Europa y China son los principales contribuyentes, (Amaya et al., 2018).

1.3 El etanol como combustible de transporte y cómo aditivo de combustible.

En consecuencia, el consumo excesivo de fuentes de energía no renovables sube el precio del petróleo y perjudica nuestro medio ambiente. Según el Consejo Mundial de la Energía, el petróleo, el gas natural y el carbón (fuentes de energía no renovables), que son la buena fuente de energía, aportan colectivamente casi el 82% de las necesidades energéticas mundiales y una quinta parte de las emisiones de CO₂ se debe al 60% de los fósiles de petróleo combustible, (Shaheen et al., 2013).

El etanol, tiene una serie de propiedades muy favorables que son deseables. Para un combustible limpio o puro. Sin embargo, a pesar de que el etanol tiene una presión de vapor mucho menor que la gasolina, la presión de vapor de las mezclas en realidad aumenta en comparación con la gasolina a la que se agrega el etanol, lo que genera preocupación sobre el impacto de mayores emisiones de evaporación en la formación de smog. La presión de vapor del stock de mezcla de gasolina a la que se agrega etanol se puede reducir para compensar este pequeño cambio de presión de vapor (aproximadamente 1 psi), pero las actuales fuerzas económicas y de mercado no favorecen este enfoque. Alternativamente, el etanol puede reaccionar con isobutileno para formar etil butil éter (ETBE), que proporciona todas las propiedades favorables de la adición directa de etanol y disminuye la presión de vapor de la mezcla. Además, el etil butil éter se integra más fácilmente en el sistema de distribución de gasolina porque es muy similar a la gasolina y no tiene limitaciones, como la tendencia a separarse con el agua que el etanol tiene. Wyman, C. (1996), Handbook on Bioetanol Production and Utilization.

Por lo tanto, para reducir la dependencia de estos recursos se necesita un cambio considerable y prometedor para utilizar las fuentes de energía alternativas, sostenibles y renovables, como la solar, la eólica, el agua, la biomasa y el calor geotérmico para la industria energética. La industria química puede depender de la biomasa como fuente alternativa en un futuro próximo, (Karp, Karp, & Shield, 2008).

1.4 Recurso y composición de la biomasa.

Estas formas de biomasa lignocelulósica parecen todas muy diferentes, pero su composición es de hecho muy similar. Típicamente, alrededor del 35% al 50% de los materiales está compuesto de celulosa, una larga cadena de moléculas de azúcar de glucosa unidas en una estructura cristalina. Otro 20% a 35% se compone de hemicelulosa, de nuevo una larga cadena de moléculas de azúcar. Sin embargo, a diferencia de la celulosa, la hemicelulosa se compone generalmente de una mezcla de azúcares, a menudo dominada por el azúcar de cinco carbonos, la xilosa. Una gran fracción del material restante comprende lignina, un polímero de fenilpropeno insoluble unido a la hemicelulosa y, típicamente, cantidades mucho más pequeñas de ceniza, fenólicos solubles y ácidos grasos denominados extractivos, y otros componentes minoritarios.

La hemicelulosa y la celulosa constituyen alrededor del 65 al 75% de la composición total de biomasa lignocelulósica, estos materiales se pueden descomponer para formar sus azúcares componentes para la fermentación en bioetanol, al igual que para la conversión de almidón en azúcares. Sin embargo, producir azúcares a partir de celulosa y hemicelulosa es un rendimiento mucho más difícil que obtener azúcares de maíz o caña de azúcar. Por lo tanto, aunque el costo de la biomasa lignocelulósica es mucho menor que el de los cultivos de azúcar y almidón, el costo de obtener azúcares de tales materiales para la fermentación en bioetanol ha sido históricamente demasiado alto para atraer el interés industrial. Sin embargo, con el surgimiento de una nueva tecnología, la economía ha mejorado considerablemente. La biomasa lignocelulósica es el material orgánico más abundante en la Tierra, y varios estudios han determinado que se podría recolectar suficiente de dichos materiales. Wyman, C. (1996), Handbook on Bioetanol Production and Utilization.

1.4.1 Lignina.

La lignina es, después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y está presente en la pared celular. Es un heteropolímero amorfo que consta de tres unidades diferentes de fenilpropano (p-cumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes tipos de enlaces. El objetivo principal de la lignina es proporcionar a la planta soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Hendriks & Zeeman, 2009). El heteropolímero amorfo también es no soluble en agua y ópticamente inactivo, la lignina al igual que la hemicelulosa, normalmente comienza a disolverse en agua alrededor de 180 °C en condiciones neutras. Sin embargo, la solubilidad de la lignina en ambientes ácidos, neutros o alcalinos depende del precursor (p-cumaril, coniferil, alcohol sinapil o combinaciones de ellos con la lignina).

1.4.2 Hemicelulosa

Es una estructura compleja de carbohidratos que consiste en diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa). El componente dominante de la hemicelulosa, es la madera dura y las plantas agrícolas, como los pastos. La hemicelulosa tiene un peso molecular más bajo que la celulosa, y ramificaciones con cadenas laterales cortas que consisten en diferentes azúcares, que son polímeros hidrolizables fáciles. La hemicelulosa sirve como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa. La solubilidad de los diferentes compuestos de hemicelulosa está en orden descendente: manosa, xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa. La solubilidad aumenta con el aumento de la temperatura. La solubilización de los compuestos de hemicelulosa en el agua comienza alrededor de 180 °C en condiciones neutras, sin embargo, mencionan que ya a partir 150 °C la celulosa se solubiliza. La solubilización de la lignocelulosa, y de los componentes no solo dependen de la temperatura, sino también de otros aspectos como el contenido de humedad y el pH. De la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, las hemicelulosas son las más sensible química y térmicamente. Durante el pretratamiento térmico-químico, reaccionan primero el lado de los grupos de

hemicelulosa, seguidos de la cadena principal de hemicelulosa, (Hendriks & Zeeman, 2009).

1.4.3 Celulosa

La celulosa consiste en unidades de anillo de D-glucopiranosas, que exhibe la conformación de energía más baja. Dichas unidades están unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos que dan como resultado un giro alternativo del eje de la cadena de celulosa. La celobiosa con una longitud de 1.3 nm puede considerarse la unidad repetitiva de la celulosa. Existen tres grupos reactivos hidroxilo en cada unidad de anhidroglucosa dentro de la cadena de celulosa, un grupo primario en carbono 6 y dos grupos secundarios en el carbono 2 y el carbono 3, que se colocan en el plano del anillo. Como es típico para un polímero formado por "policondensación", los extremos de la cadena de la molécula de celulosa son químicamente diferentes. Un extremo contiene un átomo de carbón anomérico unido por los enlaces glucosídicos (extremo no reductor) mientras que el otro extremo tiene una unidad de D-glucopiranosas en equilibrio con la función aldehído, grupo de extremos reductores (Rojas, 2016).

1.5 Tendencias de la bioconversión de la lignocelulosa a biocombustibles.

La bioconversión de biomasa lignocelulósica renovable a biocombustibles y productos de valor agregado están ganando importancia en el mundo. Las fuerzas del mercado demuestran un impulso hacia productos benignos al ambiente natural, que aumentan la importancia de materiales renovables.

El desarrollo de bioetanol de segunda generación, a partir de la biomasa lignocelulósica sirve para muchas ventajas tanto desde el punto de vista energético como medioambiental. La biomasa una materia prima de bajo costo considerada sostenible y renovable, es una opción con el potencial de reemplazar una amplia diversidad de productos basados en fósiles dentro del sector energético; como calor, energía, combustibles, materiales y productos químicos, la lignocelulosa es un componente

estructural importante de plantas leñosas, no leñosas y consiste en la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, en la tabla 1 (a) (Cock et al., 2013), (b) (González & Hernández 2009), (c) (Rahman & Saad 2003), (d) (Ouensanga et al., 2003), se muestran las diferentes composiciones del material lignocelulósico.

La utilización efectiva de los tres componentes, desempeñaría un papel significativo en la viabilidad económica del etanol celulósico (Menon & Rao 2012), Se consideraron varios factores al elegir una tecnología de pretratamiento efectiva para sortear los problemas enfrentados en la producción de etanol lignocelulósico (Naresh, Rajarathinam, Senniyappan, Moorthy, & Kumar, 2018).

Tabla 1. Composición de las materias primas lignocelulósicas.

(Menon & Rao, 2012), (Cock et al., 2013), (González & Hernández, 2009), (Rahman & Saad, 2003) y (Ouensanga et al., 2003).

Materias Primas	Composición del carbohidrato (% en peso seco)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Casco de cebada	34	36	19
Paja de cebada	36-43	24-33	6.3-9.8
Bambú	49-50	18-20	23
Residuos de banano	13	15	14
Mazorca de maíz	32.3-45.6	39.8	6.7-13.9
Rastrojo de maíz	35.1-39.5	20.7-24.6	11.0-19.1
Algodón	85-95	5-15	0
Tallo de algodón	31	11	30
Pulpa de café	33.7-36.9	44.2-47.5	15.6-19.1
Bagazo de caña	25-45	28-32	15-25
Tops de caña de azúcar	35	32	14
Pino	42-49	13-25	23-29
Madera del álamo	45-51	25-28	10-21
Biomasa del olivo	25.2	15.8	19.1
Jacinto de agua	18.2-22.1	48.7-50.1	3.5-5.4
Harina de semilla de guayaba (a)	33.22	14.35	22.06
Harina de semilla de guayaba (b)	60.6	9.2	7.6
Harina de semilla de guayaba (c)	31.40	14.30	40.20
Harina de semilla de guayaba (d)	28	15.5	41.7

En la figura 1, se muestra la asociación estructural de los residuos lignocelulósicos hasta llegar a la glucosa, que es uno de varios tipos de azúcares reductores (Rojas, 2016).

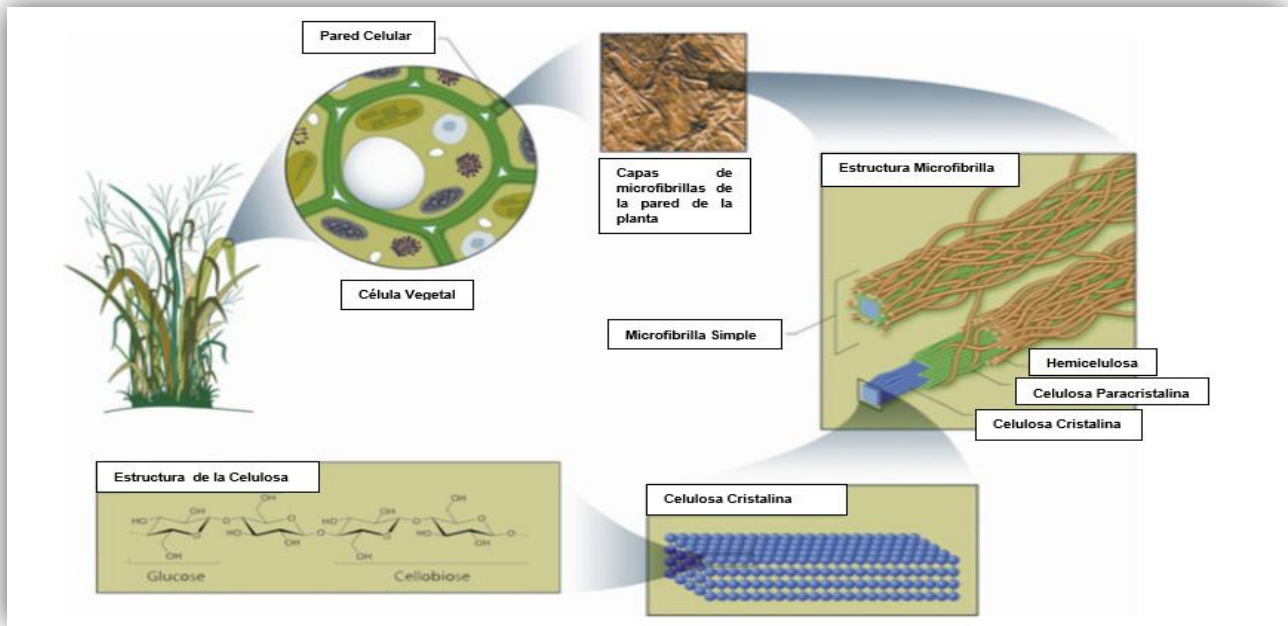


Figura 1. Asociación de moléculas de celulosa en la pared celular de la planta.
(Rojas, 2016).

1.6 Fermentación en medio sólido.

Las industrias agrícola, forestal y alimentaria producen grandes cantidades de desechos lignocelulósicos cada año. En este sentido, la fermentación en estado sólido (SSF) es un proceso biotecnológico de bajo impacto ambiental y bajo costo que puede utilizar directamente subproductos agroindustriales sin pretratamientos. La mayoría de estos desechos y subproductos son de naturaleza lignocelulósica, lo que puede favorecer el crecimiento de microorganismos para producir sus respectivas enzimas lignocelulolíticas. Para la SSF según el concepto teórico de actividad del agua, las bacterias no se han utilizado con tanta frecuencia en los procesos de SSF, aunque hay varios trabajos que demuestran que los cultivos bacterianos también se pueden manipular y manejar bien para los procesos de SSF. (Leite et al., 2020)

La SSF se define generalmente como el crecimiento de microorganismos en material sólido (húmedo) en ausencia o casi ausencia de agua libre. En los últimos años, la SSF se ha mostrado muy prometedor en el desarrollo de varios bioprocesos y productos. La fermentación del sustrato sólido debe usarse para definir solo aquellos procesos en los que el sustrato mismo actúa como fuente de carbono / energía, ocurriendo en ausencia o casi ausencia de agua libre; La fermentación en estado sólido debería definir cualquier proceso de fermentación que se produzca en ausencia o casi ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural como antes, o un sustrato inerte usado como soporte sólido. (Pandey, 2008)

La mayor parte del agua del sistema se absorbe dentro de las partículas sólidas húmedas donde el término más general "fermentación de sustrato sólido". La mayoría de los procesos de SSF involucran hongos filamentosos, aunque algunos involucran bacterias y otros involucran levaduras, (Mitchell, 2006).

1.7 La degradación enzimática.

La aplicación de enzimas, que son diseñadas por la naturaleza para romper los enlaces glucosídicos para la producción de mono y oligosacáridos, de los polisacáridos parece lo más lógico al primer punto de vista. Sin embargo, su empleo no es tan simple como el uso de catalizadores químicos, porque las enzimas necesitan ser purificadas de extractos celulares en procedimientos laboriosos y son sensibles a las condiciones ambientales (pH, temperatura y presencia de inhibidores), que pueden alterar su actividad o incluso desnaturalizarlos. Por otra parte, en la naturaleza la celulosa no se degrada por una sola enzima, sino por una combinación de tres clases de enzimas que trabajan juntas de una manera sinérgica para producir azúcares que pueden ser metabolizadas por los microorganismos correspondientes. Un proceso eficaz, requiere preparaciones enzimáticas con la actividad más alta posible y un substrato celulósico con la alta reactividad.

Las aplicaciones de las hemicelulasa y celulasas, se han expandido en años recientes debido a los esfuerzos realizados en el estudio de su función, la optimización de su producción y su mejora mediante la bioingeniería. Estas enzimas son producidas por una amplia variedad de microorganismos mesófilos, termófilos y extremófilos, tanto aeróbicos como anaeróbicos. Las celulasas son O-glucósido hidrolasas que hidrolizan los enlaces β -1,4-D-glucano de la celulosa y producen glucosa, y otros azucares como productos de interés. (Houfani et al., 2020)

La disponibilidad comercial de la celulasa purificada con una actividad razonablemente alta fue prácticamente insignificante antes de la década de 1980 y los productos crudos contenían altas cantidades de impurezas en forma de otras proteínas y tenían un alto precio. Por lo tanto, no es de extrañar que los métodos que explotan estos biocatalizadores para la degradación de los polisacáridos se hayan desarrollado mucho después de los procedimientos químicos convencionales (Rojas, 2016).

La celulosa, la hemicelulosa y la lignina se biodegradan naturalmente en la naturaleza por varios microorganismos. En su hábitat, los hongos filamentosos son más potentes para degradar la biomasa de celulosa. Se sabe que varias enzimas diferentes, llamadas

celulasas, participan en la biodegradación de la celulosa. Estos se pueden clasificar en endoglucanasas, celobiohidrolasas y celobiasas, que actúan en sinergia para degradar la celulosa a glucosa. Las enzimas llamadas hemicelulasas y ligninolíticas participan en la biodegradación de la hemicelulosa y la lignina, respectivamente. El hecho de que la celulosa sea simultáneamente biodegradable de forma natural y tenga buenas propiedades de formación de película ha despertado el interés en el uso de la celulosa en la industria del envasado, (Leppänen et al., 2020).

1.8 Procesos de degradación aeróbica y anaeróbica.

1.8.1 Condiciones Anaeróbicas

La lignina de alto peso molecular en condiciones anaeróbicas se considera generalmente no biodegradables, o biodegradables sólo a tasas importantes, en ausencia de oxígeno, aunque hay algunas pruebas contradictorias, (Benner et al., 1984). Las pruebas muy limitadas de la biodegradación anaerobia de la lignina se muestran en la tabla 2, son divulgadas en la literatura y pueden ser atribuida a los componentes de la no-lignina o a materiales de bajo peso molecular (< 600Da), (Dionisi et al., 2015). Por otro lado, hay suficiente evidencia para sugerir que los diferentes bloques de lignina, constituidos por los diferentes compuestos aromáticos como oligómeros, monómeros se metabolizan fácilmente en condiciones anaerobias (Fuchs, 2008).

Tabla 2. Degradación anaeróbica.

(Dionisi et al., 2015)

Evidencia de la biodegradación anaeróbica de materiales lignocelulósicos por cultivo mixto.			
Materia Prima	Lignina (% en peso seco)	Grado de degradación	Tiempos (días)
Residuos fibra de sisal	8.6	30–70% reducción de fibras detergente neutro	65 días
Paja de trigo	10	26–38% de reducción de celulosa	8 semanas
Arroces de la hierba	11	34–48% de reducción de celulosa	8 semanas
Mirabilis leaves	20	34–39 % de reducción de celulosa	8 semanas
Hojas de ipomoea fistulosa	25	26–38 % de reducción de celulosa	8 semanas
Biomasa Lignocelulósica de madera	-	-	2-5 semanas
Paja de trigo	-	-	17-36 días
Salix eriocephala (sauce del gatito)	-	70-80 % control de celulosa	100 días
Salix lucida (sauce brillante)	-	70-74 % control de celulosa	100 días
Populus sp. (híbrido Álamo)	-	74 % control de celulosa	100 días
Platanus occidentalis (Sycamore)	-	82 % control de celulosa	100 días

1.8.2 Condiciones Aerobias

En contraste con las condiciones anaerobias, hay amplia literatura que la lignina es biodegradada en condiciones aerobias. Varias especies de bacterias y hongos se han divulgado para biodegradar lignina como se muestra en la Tabla 3. Hongos de podredumbre blanca en particular, han sido estudiados más extensamente que las bacterias por su capacidad de biodegradación de la lignina, y generalmente se consideran más interesantes que las bacterias como un tratamiento previo de materiales lignocelulósicos a escala industrial (Malherbe & Cloete, 2002), debido a la producción de

enzimas ligninolíticas que degradan la lignina. La biodegradación aeróbica de la lignina también se ha divulgado en estudios de cultivos mixtos, suele llevarse a cabo en entornos de compostaje. Mientras que la degradación de lignina substancial se ha divulgado para una amplia gama de sustratos lignocelulósicos, generalmente los tiempos de tratamiento son bastante largos, (Noreen et al., 2019).

Esto es importante desde el punto de vista del proceso, ya que se espera que la despolimerización microbiana de la lignina puede requerir el uso de parte de la celulosa y la hemicelulosa como sustrato para el crecimiento de los microorganismos, lo que no está disponible para la conversión a etanol. Sin embargo, en un ambiente de cultivo mixto de biomasa lignocelulósica real como materia prima, otras fuentes de carbono y energía que los polisacáridos pueden estar disponibles (por ejemplo, proteínas) y por lo que puede evitarse la pérdida de hidratos de carbono para la producción de etanol. (Dionisi et al., 2015)

Tabla 3. Microorganismos que degradan Lignina.

(Dionisi et al., 2015).

Microorganismos reportados para degradar lignina bajo condiciones aerobias.			
Microorganismos	Substrato	Grado de degradación	Tiempos (días)
Bacterias			
<i>Pseudomonas</i> spp.	Lignina Kraft	39	52
<i>Acinetobacter</i> spp.	Madera de Álamo	47–57	30
<i>Streptomyces badius</i>	Lignina indulina	3–4	35
<i>Streptomyces viridosporous</i>	Lignina indulina	3–4	35
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Paja de cebada	29–52	21
<i>Thermomonospora mesophila</i>	Paja de cebada	36–48	21
Hongos			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Tallos del algodón	40	30
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Tallos del algodón	60	30
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Tallos del algodón	28	14
<i>Echinodontium taxodii</i> 2538	Cañas de bambú	24	28
<i>Trametes versicolor</i> spp.	Cañas de bambú	9–24	28
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignina sintética	Por arriba de 38	35

1.9 Microorganismos utilizados para la producción de etanol.

El microorganismo llamado *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura y se ha ocupado en el proceso biotecnológico más antiguo conocido por humanidad que es la fermentación alcohólica. El etanol es producido por levaduras que viven en condiciones anaeróbicas y algunas especies de bacterias ver en la tabla 4, (Jamróz & Jankowski, 2018).

Tabla 4. Sustratos utilizados por levaduras y bacterias para la producción de etanol.
(Jamróz & Jankowski, 2018)

Levaduras	Sustratos	Bacterias	Sustratos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa, fructuosa, galactosa	<i>Zymomonas mobilis</i>	Glucosa, fructuosa, sacarosa
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Sacarosa, maltosa, maltotriosa	<i>Clostridium thermocellum</i>	glucosa, celobiosa, celulosa
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	glucosa, maltosa, almidón	<i>Clostridium thermohydrosulphuricum</i>	Glucosa, xilosa, celobiosa, almidón
<i>Saccharomyces rouxii</i>	Glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	Glucosa, sacarosa, celobiosa, almidón
<i>Schwanniomyces alluvis</i>	dextrina, almidón	<i>Thermobacterioides acetoethylicus</i>	Glucosa, sacarosa, celobiosa

También para la industria de la destilería, las bacterias son importantes, pero solo aquellas que degradan los azúcares en etanol, como *Sarcina ventriculi*. En la tabla 5, (Dionisi et al., 2015), se muestran algunos microorganismos que se utilizan para la producción de etanol.

Tabla 5. Microorganismos que utilizan la glucosa anaeróbicamente en la producción de etanol.

(Dionisi et al., 2015)

Nombre del Microorganismos	Tipos de microorganismos
<i>Clostridium thermocellum</i>	Bacterias
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	
<i>Sarcina ventriculi</i>	
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	
<i>Ruminococcus albus</i>	
<i>Zymomonas mobilis</i>	
<i>Aspergillus spp</i>	Hongos
<i>Fusarium spp</i>	
<i>Penicillum spp</i>	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Levaduras
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

1.9.1 *Pilobolus sp.*

Para *Pilobolus* el nombre significa el "lanzador de sombreros", refiriéndose al mecanismo de descarga del esporangio. El estiércol de los herbívoros frescos fue incubado con luz del sol, el esporangióforo característico de *Pilobolus* aparece después de una fase preliminar de madurez de mucor que puede durar para de 10 a 15 días, (Jain, 2020).

Las especies comunes son *P. crystallinus*, *P. kleinii* ($\frac{1}{4}$ *P. crystallinus* var. *kleinii*), y *P. umbonatus* ($\frac{1}{4}$ *P. roridus* var. *umbonatus*). Por lo que se conoce que todos los miembros del Pilobolaceae son heterotálicos (no fértiles), que presentan únicamente órganos femeninos o masculinos y necesitan la presencia de otro individuo compatible para llevar a cabo la reproducción (Pizarro, 2020). Los esporangios descargados de *Pilobolus*, se unen a la vegetación que rodea el estiércol sobre el cual fueron producidos. Cuando la vegetación es devorada por un herbívoro, las esporas se liberan en el intestino. En las heces, las esporas germinan para formar un micelio. Después de aproximadamente 4 días, el micelio cerca de la superficie de la pelotilla del estiércol forma trofocistos, los segmentos hifal hinchados coloreados amarillos por los carotenoides.

Los esporangióforos se desarrollan del trofocistos, en una secuencia diaria regular, y la etapa del desarrollo se puede correlacionar con la hora del día. Durante la tarde, el esporangióforo crece lejos del trofocistos hacia la luz y durante la noche su extremidad amplía para convertirse en el esporangio. La hinchazón de la vesícula subesporangial tiene lugar principalmente entre la medianoche y la madrugada. Los esporangióforos jóvenes son altamente fototrópicos incluso antes de que sus esporangios se distingan, y la extremidad clara del esporangióforo que se convierte es la región sensible. A pesar de los depósitos, amarillos brillantes del carotenoide en el trofocisto y el esporangióforo joven, los estudios de la respuesta fototrópico a la luz de varias longitudes de onda sugieren que el fotorreceptor en el esporangióforo es más probable que sea un flavonoide que un carotenoide (Page & curry, 1966).

Los esporangióforos. completamente desarrollados también son altamente fototrópicos, la luz proyectada a lo largo del eje del esporangióforo se lleva a un punto debajo de la vesícula hinchada. En esta región, hay una acumulación de citoplasma rico en carotenoides, que brilla de color anaranjado cuando está iluminado. En la base del esporangio está una columela cónica, que es separado de las esporas por un cojín de mucílago. Durante la madrugada, las grietas del esporangio se abren por una sutura que corre alrededor de la base, justo por encima de la columela. Las esporas no se escapan debido al cojín mucilaginoso que sobresale a través de la grieta en la pared esporangio como un anillo de mucílago.

Las gotas de líquido adornan el exterior del esporangióforo de *Pilobolus*, como lo hacen en muchos Zygomycetes. Usualmente alrededor del mediodía, la vesícula esporangial estalla en una línea de debilidad justo debajo de la columela. Debido a la elasticidad de la pared de la vesícula el contenido líquido se arroja a chorros hacia fuera, proyectando el esporangio entero adelante en la dirección de la luz, (Webster, J. & Weber, R. 2007).

El estiércol de herbívoro contiene un alto contenido de materia orgánica y es una rica fuente de microorganismos saprofiticos metabólicamente diversos que tienen un alto potencial para aplicaciones variadas. El estiércol microbiológico consiste en varios microhábitats y por lo tanto apoya el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos. Algunos de los hongos coprófilos son *Poroniaerici*, *Cheilymenia* sp., *Cyathusstercoreus*,

Coprinus sp., *Panaeolus* sp., *Psilocybe* sp., *Pilobolus* sp., etc., (Jain, 2020). Generalmente son cultivadores lentos y muestran un crecimiento visible en 10-15 días. El aislamiento de hongos coprófilo y estudios relacionados con su sucesión se pueden hacer utilizando el método de cámara húmeda (Lokare & Fatima, 2020). El estiércol es una fuente rica de nutrientes, actúan como medio para el crecimiento en condiciones húmedas. Son de gran importancia para la investigación ecológica, estudios de biodiversidad y para la producción de diversos compuestos bioactivos como nuevos antibióticos, estimuladores de crecimiento, biopesticidas, enzimas.

1.9.2 *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras son microorganismos eucariotas, que se encuentran en diversos nichos ecológicos, tienen un metabolismo quimioorganótrofo, organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos y a menudo se asocian con los alimentos, estos microorganismos unicelulares se reproducen principalmente por gemación, una de las levaduras probablemente más conocidas es, *Saccharomyces cerevisiae* que se ha utilizado a nivel industrial, este microorganismo tiene una larga trayectoria en la industria de la producción de alimentos y se ha utilizado desde hace tiempo en la panificación o en la elaboración de bebidas alcohólicas. Debido a la importancia, se ha dedicado mucha investigación al estudio de este microorganismo en la elaboración de estos productos de valor agregado, (Tofalo et al. 2019).

S. cerevisiae, es un microorganismo estable en la fermentación de productos y pueden usarse de muchas formas bajo diferentes condiciones siendo una levadura con ventajas adaptativas para agregar las características deseadas al producto. Los estudios adicionales sobre la caracterización fisiológica y genética de diferentes cepas de *S. cerevisiae* son de gran relevancia, ya que las cepas de la misma especie pueden tener diferentes características fisiológicas, genéticas y luego una cepa específica puede ser mejor aplicada para el proceso fermentativo específico. La actividad microbiana durante la fermentación de alimentos puede contribuir a reducir estos factores antinutricionales,

mejorando las propiedades nutricionales de los alimentos, las especies de levaduras, incluida *S. cerevisiae*, pueden estar asociadas con importantes propiedades beneficiosas tales como mejorar la producción de compuestos aromáticos por lipólisis, metabolismo del ácido cítrico y aumento del pH, actividad enzimática, reducción del potencial redox, actividad antimicrobiana, actividad probiótica, etc., (Silva et al. 2020).

1.10 Guayaba, cultivo, beneficios

La guayaba es una fruta tropical cultivada a través de América del sur, África y Asia. Esta fruta es nativa de las áreas tropicales y subtropicales, es capaz de aclimatarse a diferentes condiciones climáticas. La guayaba es una buena fuente de fibra dietéticas y de compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos comprenden un amplio espectro de fitoquímicos, que incluye polifenoles, carotenoides, terpenos y saponinas, entre otros. La fibra dietética y los compuestos bioactivos han demostrado ejercer diferentes beneficios de salud (Rechkemmer, 2001). La mayoría de estos efectos se han estudiado por separado. Sin embargo, los científicos están comenzando a considerar ambos como partes de la matriz alimenticia. Además de esto, la guayaba tiene un color atractivo y un aroma exquisito, y es una excelente fuente de vitaminas y minerales (Palafox-Carlos et al., 2011; Singh, 2011).

Los investigadores están estudiando con más detalle los posibles efectos que el consumo de fruta demuestra en relación con varias patologías (Araújo et al., 2011). Los estudios epidemiológicos sugieren que el consumo regular de frutas puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles, tales como hiperglucemia, hiperlipidemia, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Muchos de estos beneficios de la salud no se han estudiado completamente o en varios casos se atribuyen parcialmente a un solo compuesto, y solamente algunos estudios consideran las interacciones, en la tabla 6 se muestran los principales componentes de la guayaba, (Yahia, E. M. (2018) *Fruit and Vegetables Phytochemical and human health*. Ames, Iowa: Publishing Wiley Blackwell).

Tabla 6. Principales componentes de la Guayaba.

(Yahia, E. M. (2018) Fruit and Vegetables Phytochemical and human health. Ames, Iowa: Publishing Wiley Blackwell).

Componentes de interés nutricional en guayaba (por 100 g de peso fresco).	
Componentes a granel	(g)
humedad	73,5
carbohidratos	14,8
fibra dietética	2.8-7.0
proteína	1,0
lípidos	0,7
Minerales	(mg)
(magnesio) hierro	0.4-0.7
potasio	352,7
calcio	9.1 – 17
fósforo	17.8 – 30
Vitaminas	(µg)
vitamina A	31,00
vitaminas C	100– 228.30
tiamina	0,05
riboflavina	0,05
niacina	1,20
piridoxina	0,14

1.11 Tecnología avanzada de pretratamiento.

La eficiencia de varias tecnologías, para el pretratamiento de biomasa se ha investigado tediosamente durante las últimas décadas. Las metodologías tradicionales incluyen los pretratamiento biológicos, físicos, químicos y fisicoquímicos que carecen de la tecnología económica. Esto se debe a que el consumo de un pretratamiento tradicional requiere diferentes formas de energía y productos químicos durante el pretratamiento y la

eficiencia resultante del proceso es muy baja o suele ser muy baja si estos parámetros no están controlados. El pretratamiento químico genera más compuestos inhibidores, se ocupan en concentraciones altas durante la hidrólisis y el hidrolizado necesita ser neutralizado antes del proceso de fermentación.

Al considerar los temas discutidos anteriormente, los investigadores han desarrollado algunas tecnologías híbridas de pretratamiento mediante la combinación de principios básicos de tecnologías convencionales para reducir el consumo de energía para un proceso de pretratamiento eficiente y sustentable. La combinación de diferentes pretratamientos se ha representado en la Tabla 7, (Naresh et al., 2018). Las tecnologías híbridas de pretratamiento se han diseñado de tal manera que superen las dificultades que se enfrentan en el proceso de pretratamiento tradicional.

Tabla 7. Nuevos pretratamientos para la obtención de azúcares reductores.

(Naresh et al., 2018).

Tipo de Pretratamiento Avanzados
Pretratamiento termomecánico-químico (TMC)
Extrusión de fluido supercrítico (SC)
Pretratamiento termo-electroquímico
Pretratamiento de estallido
Pretratamiento Bio-mimético
Tecnología Intensiva de Pretratamiento Biológico (IBPT)

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, dependemos principalmente del petróleo para tener energía eléctrica, la gasolina, y otros combustibles fósiles para realizar las actividades cotidianas. Debido a la industrialización y a la urbanización, se tiene un problema de abastecimiento en algunos periodos de tiempo y en otros casos, se presentan precios totalmente incrementados. El problema continúa debido a que el petróleo no es un compuesto renovable, las reservas son explotadas a una mayor cantidad y es necesario buscar otras alternativas, invertir en ello e incluso prever consecuencias como la contaminación de mantos acuíferos como consecuencia de las maniobras de excavación en nuevas reservas o en otros lugares cavar más profundo y hacer un gasto para el manejo de estas circunstancias. Además, la gasolina y otros productos derivados del petróleo, al consumirse aumentan los niveles de contaminación en el medio ambiente debido a la producción de gases con efecto invernadero (Thangavel, et al., 2016).

La biomasa, que es materia orgánica de diversos orígenes, con composición heterogénea y que puede dividirse de forma general en agrícola o forestal, aunque también se considera biomasa a la materia orgánica proveniente de las aguas residuales y de aquellos que contienen sólidos, de la biomasa es posible obtener energía en forma de biocombustibles como biodiesel, biogás, biohidrógeno, bioetanol y otros productos que presentan varios beneficios con impacto económico, pero sobre todo ambiental. La biomasa lignocelulósica, tiene un inmenso potencial para ser utilizada en la generación de biocombustibles, productos químicos y otros subproductos valiosos, (Jung, et al., 2013).

Las experimentaciones realizadas con hongos, que producen enzimas como celulasas, xilanasas y hemicelulasas, que pudieron convertir los residuos lignocelulósicos, agrícolas en azúcares reductores AR fermentables, en investigaciones adicionales intentaron encontrar microorganismos que pudieran fermentar efectivamente hexosas, pentosas y ambos azúcares en bioetanol, en este estudio se introducirá a *Pilobolus* sp., como un microorganismo de uso en bioprocesos, para demostrar su actividad enzimática para degradar los residuos lignocelulósicos de guayaba para la obtención de AR y finalmente realizar la fermentación con el hongo para la obtención del metabolito de interés.

2.1 HIPÓTESIS

Al aplicar *Pilobolus* sp., en la biotransformación de residuos de *Psidium guajava*, bajo condiciones experimentales, se obtendrán azúcares reductores eficientes para la producción de bioetanol y la comparación con *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 General

Determinar la eficiencia de la producción de bioetanol a partir de la obtención de azúcares reductores de los residuos lignocelulósicos de *Psidium guajava* mediante la utilización del hongo *Pilobolus* sp., comparando su eficiencia con *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2 Específicos

- Cultivar y aislar a los microorganismos, *Pilobolus* sp., y a *Saccharomyces cerevisiae*.
- Determinar la capacidad de hidrolisis enzimática de *Pilobolus* sp., para la obtención de azúcares reductores, cuantificar por la técnica del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) utilizando espectrofotometría UV- Vis.
- Evaluar la obtención de los azúcares reductores de los residuos lignocelulósicos de *Psidium guajava* a través de cuatro tipos de pretratamientos utilizados y cuantificar por la técnica de DNS utilizando espectrofotometría UV- Vis.

- Medir la capacidad de fermentación de *Pilobolus* sp., mediante las muestras con pretratamientos para la conversión en bioetanol y su comparación con *Saccharomyces cerevisiae*.
- Cuantificar la producción de bioetanol y los subproductos por medio de HPLC-IR refracción.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3 METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Investigación

La presente investigación que se realizó es de tipo experimental, siendo el enfoque un estudio exploratorio, debido a que las pruebas que se realizaron fueron de tipo piloto, se mostraron los puntos que se siguieron para lograr la metodología de nuestro interés.

La metodología para el desarrollo de la experimentación en la producción de el bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos se relata en la figura 2.

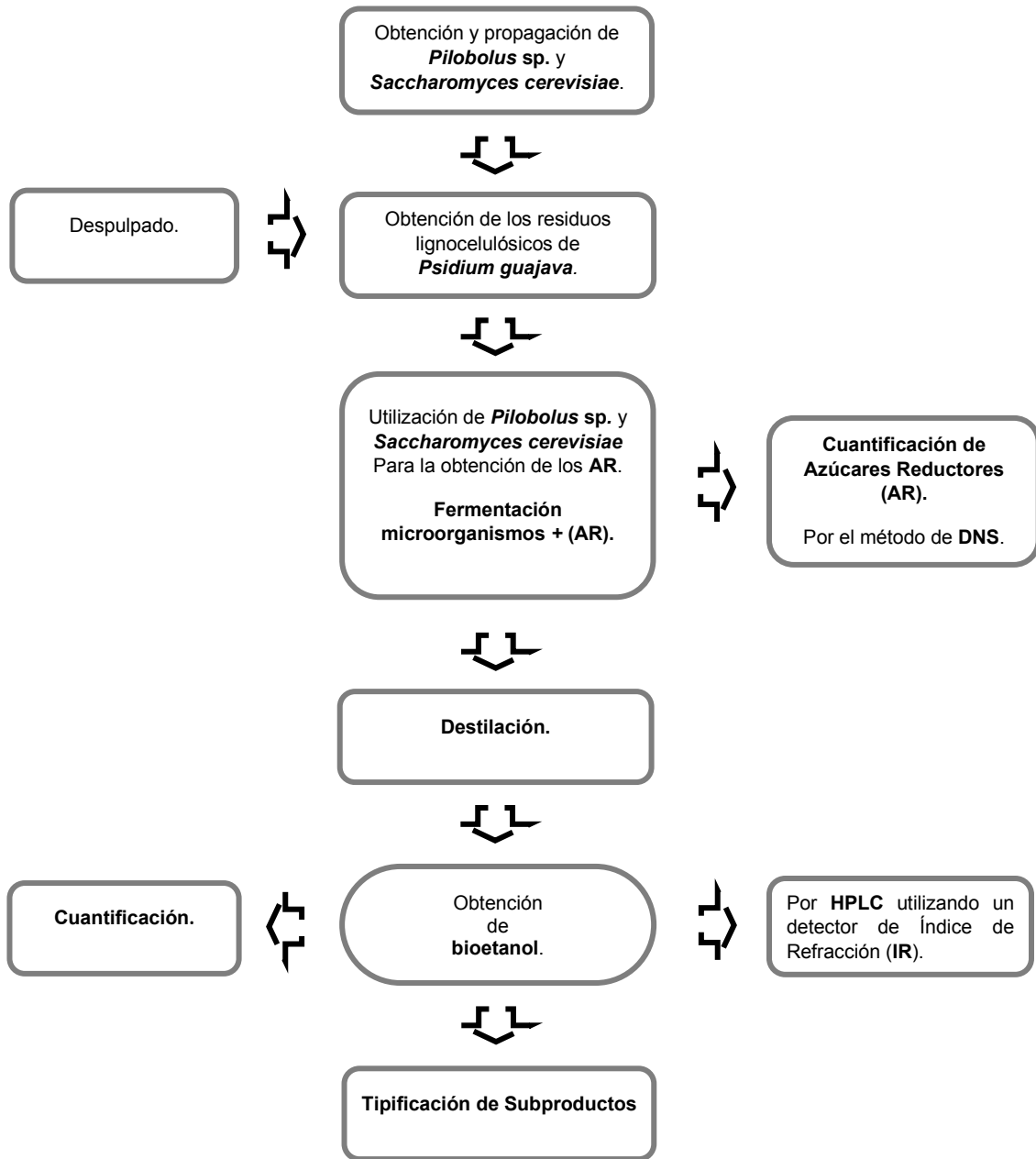


Figura 2. Diagrama de flujo para la producción de bioetanol.

El diagrama de flujo se desarrolló con los siguientes puntos:

3.2 Propagación y conservación de *Pilobolus sp.*

En la Figura 3 involucra seis pasos en la cual se realizó, desde la preparación hasta la obtención de *Pilobolus* para su utilización en el proceso de fermentación, los pasos se realizaron de la siguiente manera.

1.- En una caja de cartón del tamaño de una caja de zapatos, se le realizó una abertura en forma de ventana para poder colocar papel celofán de color rojo, 2.- una vez que se recolectó la materia fecal, se distribuyó en una forma extendida a lo largo de la caja, una vez que se terminó de extender la muestra el medio fue cerrado con su tapa y se verificó que no hubiera fugas para mantener una cámara húmeda (Jain, 2020) y (Lokare & Fatima, 2020), se incubó a temperatura ambiente y en un lugar fresco en donde se tuvo contacto con la luz solar, debido a que durante el desarrollo del hongo este buscó los rayos solares para su crecimiento, se le agrego agua destilada cada 3 días para mantener el cultivo húmedo, 3.- Se observó el desarrollo del microorganismo, se debe esperar de 10 a 15 días para que se desarrolle completamente, 4.- Una vez desarrollado *Pilobolus sp.*, muestra una esfera negra llamada esporangio en donde se encuentran las esporas, 5.- los esporangios fueron expulsados del cuerpo del esporangióforo hacia la parte superior y estos se adhirieron al papel celofán rojo, 6.- Los esporangios fueron recolectados en un contenedor con una solución de HCl al 1% y almacenados en refrigeración hasta por 3 meses aproximadamente.



Figura 3. Secuencia para obtener los esporangios de *Pilobolus* sp.

En la figura 4, se muestra las fases del hongo hasta la maduración y finalmente se muestra la forma en la que el microorganismo catapulta al esporangio, para continuar el ciclo de vida (Sakes, et al. 2016).

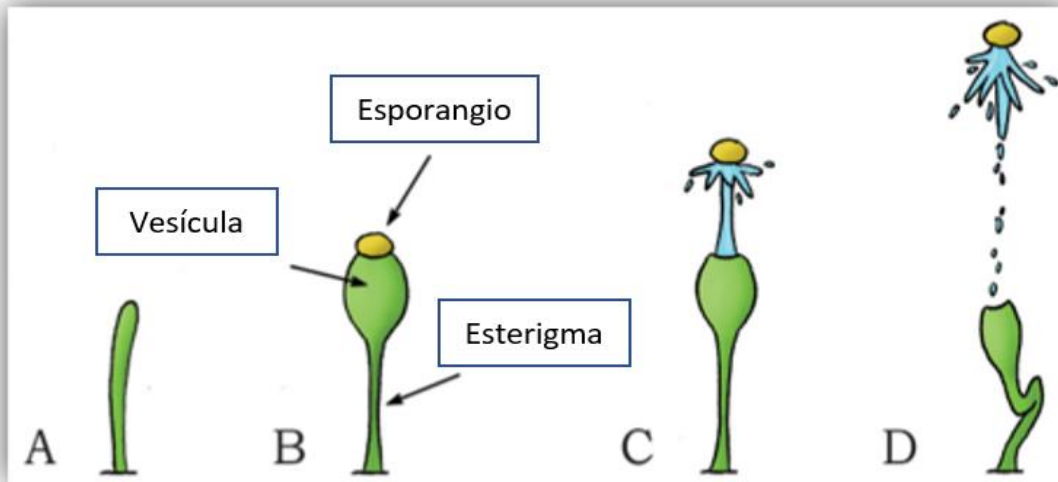


Figura 4. Mecanismo para catapultar al esporangio.

(Sakes, et al. 2016).

Se realizó la propagación de *Pilobolus* en cultivo líquido, mediante los siguientes pasos; se utilizó caldo dextrosa Sabouraud CDS (triptona 5 g/L, peptona de carne 5 g/L y dextrosa 20 g/L), con un pH final de 5.6 ± 0.2 , se inocularon 100 μL de la solución con los esporangios conservados en HCl al 1% en un tubo con 3 mL de CDS, se incubó a 35 °C con agitación constante a 200 rpm, durante 12 h, posteriormente se transfirieron los 3 mL del cultivo de manera aséptica a un matraz de 125 mL, con 30 mL de CDS, se incubó a 35 °C con agitación constante a 200 rpm, durante 12 h y finalmente al término de la segunda incubación, se colocó una alícuota de 1 mL a cada uno de los tubos pretratados para fermentar.

3.3 Propagación y conservación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* comercial, de la colección de cepas de la planta piloto 4 de fermentaciones en medio sólido de la UAM-I. A partir de un cultivo líquido, se tomó una muestra con el asa bacteriológica y se inóculo por duplicado con estría cruzada, en medios con agar papa dextrosa PDA (almidón de papa 4.0 g/L,

dextrosa 20 g/L y agar 15 g/L), en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con 30 mL del medio de cultivo. Después de 12 h de incubación a 30 °C, se seleccionó una colonia para inocular cada uno de los tubo de cultivo con 3 mL de medio de cultivo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 20 g/L y glucosa 20 g/L), se incubó durante 12 h a 30 °C y a una velocidad constante a 200 rpm, al finalizar el tiempo de incubación se transfirieron a dos matraces erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo YPD en condiciones asépticas, se incubó durante 12 h a 30 °C, con una agitación constante a 200 rpm.

Este fue el procedimiento para preparar el cultivo, que se utilizó en el proceso de la fermentación, al finalizar la incubación del microorganismo se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo del matraz de 125 mL en condiciones asépticas y se inculó en cada uno de los tubos pretratados para fermentar, se homogenizaron y se cerraron herméticamente, finalmente se incubo durante 12 h a 35 °C sin agitación. Al finalizar el tiempo de fermentación se cuantificaron los azúcares reductores y el bioetanol.

De otra preparación de un matraz de 125 mL, las células se separaron por centrifugación en tubos falcon estériles de 50 mL a 6000 rpm, 15 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el precipitado celular se lavó 2 veces con 20 mL de tween 80 al 0.05 %, y se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. La suspensión celular se transfirió a tubos crioprotectores (de la marca Protect) se siguió el procedimiento propuesto por el distribuidor. Los tubos crioprotectores con la cepa se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.4 Recolección de los residuos de guayaba.

Se utilizaron los residuos de guayaba, de la zona de Coatepec Harinas del Estado de México para la producción de bioetanol, debido a que se tiene una producción considerable que es aproximadamente de 300 toneladas de guayaba por hectárea siendo que el lugar cuenta con 6 hectáreas, la guayaba estuvo lista entre los meses de Octubre y/o Noviembre de cada año, al finalizar el despulpado del fruto (la pulpa se ocupó en otro proyecto de investigación), los residuos son los que se utilizaron en la actual investigación ya que se pueden convertirse en un foco de infección si no se desechan o tratan

apropiadamente, originando la llegada de insectos de la fruta, el problema más fuerte cuando llegaron los microorganismos del medio ambiente (especialmente hongos) que estos a su vez producen micotoxinas que son las proliferadoras de cáncer, siendo este un problema muy grave en la población.

El estudio formó parte de una propuesta en conjunto de varias investigaciones relacionados con la guayaba de ese municipio. En este caso la utilización de los residuos de guayaba que contienen lignocelulosa que es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es una fuente de carbono renovable de las más prometedoras para solucionar los problemas actuales de energía. El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa lignocelulósica es, en general, la ausencia de una metodología a bajo costo debido a que la parte de la hidrólisis de biomasa es de alto costo, por este motivo utilizaremos a *Pilobolus*, por naturaleza los hongos utilizan sus enzimas para degradar a la lignocelulosa, para obtener el valioso biocombustible llamado bioetanol. Los residuos se cortaron y/o fragmentaron en unidades más pequeñas para que las muestras se deshidrataran en un horno de secado a 60 °C en un menor tiempo durante 24 h aproximadamente, ya secos los residuos se pulverizaran para disminuir el tamaño de partícula.

3.5 Valoración de los pretratamientos para obtener azúcares reductores.

3.5.1 Sin Hidrólisis (Solubilización)

En este proceso se utilizaron: 12 mL de agua destilada y 3 g de harina seca de guayaba HSG, las muestras se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min, para la solubilización e incorporación de la muestra, posteriormente se utilizó una microcentrífuga para separar el sobrenadante a 12000 rpm, durante 10 min y este fue leído en el espectrofotómetro UV-VIS, se determinó la cuantificación de azúcares reductores (AR) disponible en la harina seca de guayaba HSG.

3.5.2 Hidrólisis Térmica

En este proceso se utilizaron: 12 mL de agua destilada y 3 g de HSG, se agitó para mezclar-solubilizar por 30 minutos. El proceso térmico se lleva a cabo en una autoclave con las siguientes condiciones, a 121 °C, por 60 h con 15 libras de presión, al cumplir el tiempo se realizó un proceso de despresurización rápida o bien explosión de vapor para aumentar la liberación de los azúcares reductores (Singh et al., 2015) de la HSG, la muestra se separó en una microcentrífuga para obtener el sobrenadante a 12000 rpm, durante 10 min, este se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS y se determinó la cuantificación de los AR.

3.5.3 Hidrolisis Termoquímica

En este proceso se utilizaron: 12 mL de H₂SO₄ a diferentes concentraciones 0.5 %, 0.75 %, 1.0 % 1.25% y 1.5 %, se agitaron para mezclar-solubilizar por 30 minutos, el proceso termoquímico se lleva a cabo en una autoclave con las siguientes condiciones, 121 °C, 60 h y 15 libras de presión, al cumplir el tiempo se ocupó un proceso de despresurización súbita para aumentar la liberación de los AR de la harina seca de guayaba HSG, una vez que la muestra estuvo atemperada se ajustó a un pH entre 4.5 - 5.5 con NaOH 10 M, el sobrenadante fue separado con el uso de una microcentrífuga a 12000 rpm, durante 10 min, se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS y se determinó la cuantificación de AR.

3.5.4 Hidrólisis enzimática.

El coctel enzimático se preparó para un volumen final de 15 mL, se midieron los siguientes volúmenes: 0.75 mL de la preparación NS22086 (celulasas), 0.75 mL de la NS22083 (xilanasas), 0.75 mL de la NS22002 (hemicelulasas), 0.375 mL de la NS22118 (β -D-glucosidasa), 0.375 de la NS22119 (complejo enzimático), se añadieron 12 mL de buffer de citratos 0.2 M, pH 5.0, se homogenizó durante 30 segundos en un vórtex, antes de utilizar el coctel enzimático se debe de colocar en un baño maría a 50 °C durante 20

minutos. Las enzimas utilizadas son de la marca Novozymes, los cocteles enzimáticos fueron preparados de acuerdo con manual del proveedor y durante la estancia de investigación nacional en la UAM Iztapalapa, esta marca de enzimas son utilizadas para la degradación de residuos forestales y obtención de azúcares reductores.

Se pesaron 3 g de HSG, en un tubo con tapón de rosca de baquelita, se añadieron 12 mL de H₂SO₄ a diferentes concentraciones 0.5 %, 0.75 %, 1.0 % 1.25% y 1.5 %, se mezcló y se dejó reposar por 30 minutos, posteriormente se aplicaron las condiciones del proceso térmico a 121 °C por 1 h, con 15 lb y finalmente la despresurización súbita de la autoclave. Una vez atemperadas las muestras, se ajustó el pH a 4.5 - 5.5 con NaOH 10 M. Antes de adicionar los 2 mL del coctel enzimático a las muestras pretratadas, los tubos se incubaron a 50 °C durante 20 minutos posteriormente se inocularon 2 mL a cada tubo que se llevó a fermentar hasta las 72 h. Después de ello, el sobrenadante se recuperó por centrifugación a 12000 rpm por 10 min y se utilizó para la determinación de azúcares reductores.

3.6 Determinación de Azúcares Reductores.

La oxidación es una pérdida de electrones, la reducción es una ganancia de electrones. Los azúcares reductores son aquellos azúcares que presentan un grupo aldehído (las aldosas) que pueden ceder electrones, es decir, actúan como agente reductor a un grupo oxidante, el cual se reduce al recibir los electrones. La oxidación del grupo aldehído da lugar a un grupo carboxilo (Nielsen, 2007). La determinación de estos azúcares se realizó con la finalidad de obtener resultados mediante balances de materia aplicando la técnica de Miller o ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS), es un compuesto aromático que reacciona con azúcares reductores para formar ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. El reactivo que tiene la capacidad de oxidar a los azúcares reductores, ver figura 5, dando un resultado colorimétrico que se pueden medir a una longitud de onda de 640 nm, (Miller, 1960).

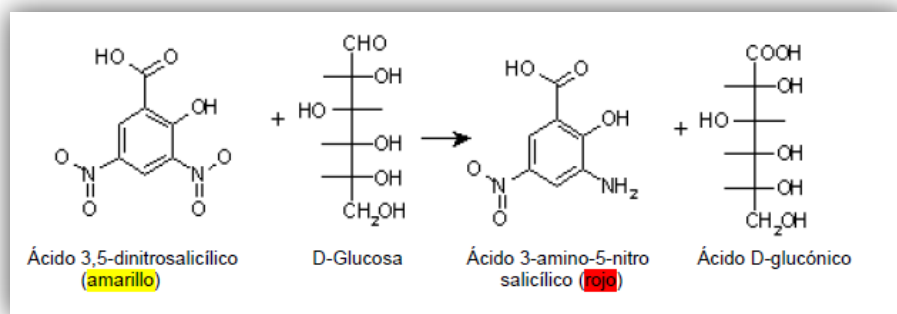


Figura 5. Mecanismo de reacción de Azúcares Reductores.
(Miller, 1960)

3.6.1 Reactivo de DNS

Se disolvieron 5 g de DNS, 8 g de NaOH, 150 g de Tartrato de sodio-potasio en 200 mL de agua destilada. Se llevó a un aforo de 500 mL con agua destilada, y la solución se colocó un frasco ámbar previamente etiquetado. (Gil et al., 2006).

Solución de Glucosa

Se preparó una solución con una concentración de 2.0 mg/mL, se disolvieron 100 mg de glucosa y se llevó a un aforo de 50 mL con agua destilada.

3.7 Determinación de Azúcares Totales.

Los carbohidratos reaccionan con los ácidos fuertes, con temperaturas altas o ambos factores, bajo estas condiciones se llevan a cabo múltiples reacciones complejas, primeramente, la reacción de deshidratación como se muestra en la figura 6, (Nielsen, 2007).

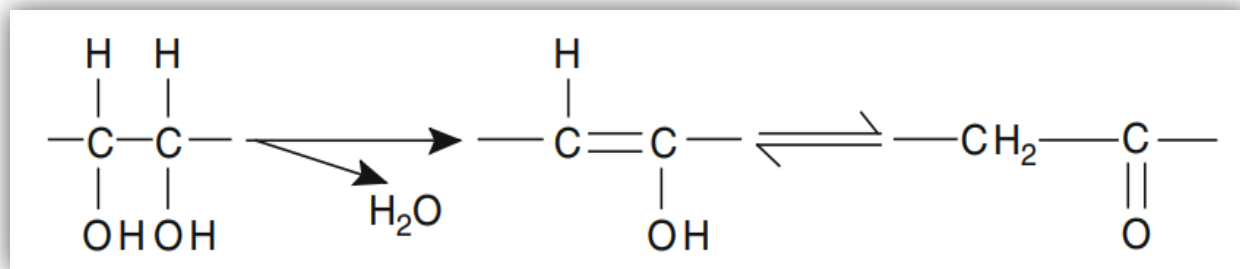


Figura 6. Mecanismo de reacción de Azúcares Totales, deshidratación.

(Nielsen, 2007).

El continuo calentamiento en presencia de ácido produce diversos derivados del furano, estos productos pueden condensarse consigo mismo y con otros productos para producir sustancias marrones y negras. Del mismo modo, se condensarán con diversos compuestos fenólicos, tales como el fenol, el resorcinol, el orcinol, el α -naftol y el naftoresorcitol, y con diversas aminas aromáticas, tales como la anilina y la *p*-toluidina para producir compuestos coloreados que son útiles para el análisis de los hidratos de carbono.

Todas las clases de azúcares, incluidos los derivados de los azúcares, los oligosacáridos y polisacáridos, pueden ser determinados por el método del fenol – ácido sulfúrico, los oligosacáridos y los polisacáridos reaccionan porque experimentan la hidrólisis en presencia del ácido fuerte, caliente, liberando monosacáridos que se deshidratan y forman inhibidores que se representan en la figura 7 (Roca, 2004), como el 5-hidroximetilfurfural (HMF) o el furfural (F), los cuales con fenol forman un producto de color amarillo a café que producen un color estable, (Nielsen, 2007).

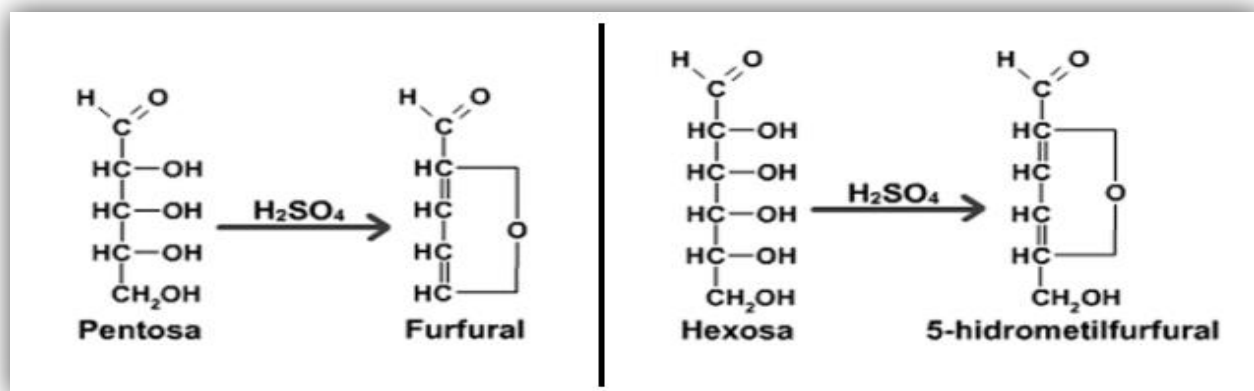


Figura 7. Formación de inhibidores.

(Roca, 2014).

3.7.1 Reactivo de Azúcares Totales

Se disolvieron 56 mg de Fenol en 56 mL de H_2SO_4 concentrado al 98% (Dubois, et al., 1956)

Solución de Glucosa

Se preparó una solución con una concentración de 2.0 mg/mL, se disolvieron 100 mg de glucosa y se lleva a un aforo de 50 mL con agua destilada.

3.8 Fermentación

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica dependió de la conversión de los carbohidratos celulósicos y hemicelulósicos complejos en azúcares simples, que posteriormente se fermentaron para obtener etanol, mediante la utilización *Pilobolus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. La eficiencia y el rendimiento general del proceso de producción de etanol dependen del rendimiento inicial de estas reacciones hidrolíticas.

La conversión enzimática, el alto rendimiento de azúcares reductores estuvo limitado en la tecnología de conversión ácida debido a la continua reacción de los azúcares sobre los productos de degradación. La celulosa de la biomasa convertida en glucosa, que se catalizó nuevamente por ácido diluido, o principalmente por enzimas celulares, ya sea producida en un reactor por separado o comprada a proveedores industriales (Zhang et al., 2015).

Las enzimas son 100% selectivas para la reacción de hidrólisis de la celulosa a glucosa, por lo tanto, no hay productos de degradación, y son posibles altos rendimientos. La celulasa, la enzima que catalizó la reacción de celulosa a glucosa, es producida por una variedad de microorganismos, la mayoría de las veces, los hongos. La producción de glucosa está limitada por la celulasa. Para aumentar la accesibilidad, la biomasa debe ser pretratada, lo que generalmente implica tratamientos físicos, químicos y biológicos que degradan la estructura de la biomasa. Por ejemplo, el tamaño de la madera se reduce por fresado y luego se trata con ácido sulfúrico diluido para eliminar la hemicelulosa, lo que abre la estructura de la madera a la penetración de celulasa.

El pretratamiento es un paso muy importante, ya que un mal tratamiento previo dará como resultado una conversión pobre de celulosa a glucosa. Tres técnicas que usan hidrólisis enzimática para convertir la celulosa en etanol se han estudiado y usado en plantas piloto. En hidrólisis y fermentación separadas, la biomasa pretratada se trata con celulasa, hidroliza la celulosa a glucosa a aproximadamente 50 ° C y pH 4.5 a 5.5 (da Costa et al., 2015), condiciones óptimas para la actividad enzimática (por Novozymes). La solución de glucosa se adicionó a un fermentador en el que un microorganismo fermentó el azúcar a etanol. En la sacarificación y fermentación simultáneas, la hidrólisis y la fermentación se producen en el mismo recipiente. La glucosa producida por la hidrólisis de la celulosa es consumida inmediatamente por el microorganismo para producir etanol.

La producción de enzimas se puede realizar en un paso de proceso separado. La conversión microbiana directa utiliza un microorganismo que produce la fermentación de glucosa a etanol, (Jamróz & Jankowski, 2018). Se pesaron 3 gramos por triplicado de harina seca de guayaba HSG por cada uno de los tres experimentos en un tubo con rosca de baquelita, que son los residuos lignocelulósicos de la guayaba previamente desecados

durante 2 h en los hornos de secado a 60 °C, en el tubo 1 con 12 mL de agua destilada para la solubilización sin tratamiento térmico, en el tubo 2 con 12 mL con agua destilada para la hidrólisis térmica y el tubo 3 con 12 mL de H₂SO₄ al 1.0 % para la hidrólisis termoquímica, se colocaran en una autoclave a 121 °C, durante 60 min a 15 Lb, se despresurizará súbitamente o bien una explosión de vapor para la liberar aún más los azúcares reductores (Singh et al., 2015), al finalizar el tiempo de la hidrólisis, los tubos deben de estar a temperatura ambiente para poder ajustarlo a un pH entre 5.0 a 5.5.

Preparación de la muestra biológica y fermentación: una vez que los esporangios se cultivaron en caldo dextrosa Sabouraud CDS (BD Bioxon) a 30 °C por 12 h a 200 rpm. Del segundo inóculo preparado se transfirió 1 mL a los diferentes tubos que fueron sometidos a los diferentes pretratamientos con los volúmenes de 15 mL de muestra final antes de la fermentación, se incubaron los tubos con el hongo a 30 °C durante 24 h y 72 h sin agitación para observar el comportamiento del microorganismo a diferentes intervalos de tiempo, cuando finalizó el tiempo de fermentación se agitaron los tubos para homogenizar las muestras primeramente se enfriaron los tubos para que el alcohol que estaba en fase gas se condensara. El sobrenadante fue recolectado en tubos eppendorf de 2 mL, se centrifugaron en una microcentrifuga eppendorf 5418 a 12000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se filtraron las muestras utilizando un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0.45 µm. Estas muestras se usaron para análisis de etanol por HPLC-IR.

3.9 Determinación de bioetanol por HPLC

En la cromatografía de gases se han utilizado tradicionalmente para analizar los hidratos de carbono, pero la introducción y el perfeccionamiento continuo de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) ha dado lugar a enfoques instrumentales adecuados para analizar las mezclas carbohidratos. Las dos ventajas principales de HPLC sobre GC son (1) los tiempos de elución son típicamente más cortos y (2) la preparación de la muestra es más simple porque no hay necesidad de derivatizar.

Las primeras separaciones de azúcar por HPLC utilizaron resinas de intercambio aniónico, pero los esfuerzos posteriores mostraron que las mezclas de carbohidratos también se podían separar por cromatografía de partición de resinas de intercambio catiónico. Se cree que los azúcares forman complejos basados en la configuración de sus grupos hidroxilo con el metal unido iónicamente a un copolímero de poliestireno - divinilbenceno sulfonatado, y la separación está regida por la estereoquímica del carbohidrato. Los investigadores generalmente utilizan el agua grado HPLC como eluyente y el índice de refracción como medio de detección para la cromatografía de hidratos de carbono, de partición moderada por iones.

Al cambiar el tipo de metal unido iónicamente a la resina, se puede alterar el comportamiento de la columna hacia las moléculas de azúcar, lo que permite optimizar las empaquetaduras de columna de cromatografía de partición moderada por iones y separar monosacáridos específicos. Una resina de intercambio catiónico en la forma de calcio ha demostrado ser adecuada para el análisis anomérico de disacáridos liberados a partir de polisacáridos de biomasa. Las resinas en las formas de calcio y plata han sido usadas para las separaciones de oligosacáridos. Los monosacáridos han sido completamente resueltos en la biomasa hidrolizada sobre una resina en forma de plomo y estroncio, Wyman, C. (1996), Handbook on Bioetanol Production and Utilization. (Wyman, 1996).

Las muestras fueron analizadas en la Planta Piloto No. 4 de la UAM-I, en un equipo HPLC Perkin Elmer Binary LC pump y el detector Perkin Elmer LC-30 IR Detector, con una columna de BioRad HPLC Organic Acid Analysis Column, Aminex HPX-87H Ion Exclusive Column, 300 mm x 7.8 mm, Catalog 125-0140, Serial No., 414828, con un flujo de 0.6 mL/min, la temperatura de 60 °C y con una fase móvil de H₂SO₄ 5mM.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4 Resultados y discusión de resultados.

4.1 Eficiencia de los pretratamientos para la obtención de azúcares reductores.

4.1.1 Obtención de azúcares reductores (AR) de acuerdo con el tipo de pretratamiento.

En la tabla 8, se presentan los valores iniciales de los azúcares reductores, obtenidos después de cada uno de los procesos a los que las muestras fueron sometidas como fue: la solubilización, el tratamiento térmico, termoquímico y el termoquímico enzimático. Todos los resultados fueron obtenidos por medio de balances de materia.

4.1.2 Ecuación de balances de materia para la obtención de resultados.

Los balances de materia utilizados para obtención de los valores de cada pretratamiento se realizaron de la siguiente forma:

$$(1) \frac{(\text{mg})}{(\text{mL})} \times \frac{2}{3} \frac{(\text{A})}{(\text{Prom A})} \times (4) \times \frac{5}{6} \frac{(\text{mL MHT})}{(\text{g HSG})} = |7| \frac{(\text{mg})}{(\text{g})} \frac{\text{AR}}{\text{HSG}}$$

- 1) Concentración del estándar en (mg/mL).
- 2) Valor de absorbancia de la muestra problema (A).
- 3) Promedio por triplicado del valor de absorbancia del estándar (Prom A).
- 4) Valor de la dilución de la muestra en caso de ser necesario.
- 5) Volumen de la muestra, mililitros de la materia húmeda total que se encuentra en el tubo de experimentación (mL MHT).
- 6) Peso de la muestra, gramos de harina seca de guayaba (g HSG).
- 7) Resultado final, miligramos (mg) de azúcares reductores / gramos (g) de HSG.

Tabla 8. Cuantificación de AR después de cada pretratamiento.

Tipo de tratamiento	Azúcares Reductores
121 °C / 15 lb / 1 h	mg AR / g de HSG
Solubilización (H ₂ O destilada) *	38 ±1
Térmico (H ₂ O destilada)	47 ±2
Termoquímico (H ₂ SO ₄ 1.0 %)	88 ±3
Termoquímico enzimático (H ₂ SO ₄ 1.0 %)	161 ±1

* Sin tratamiento térmico

Los resultados para la cuantificación de AR de cada uno de los experimentos mostraron que pretratamiento tiene las mejores condiciones para la obtención de los azúcares, como segundo mejor resultado, fue el tratamiento termoquímico con un valor de 88 mg AR/g HSG, duplicando casi el valor del tratamiento térmico lo que brinda una cierta ventaja para poder seleccionar este tratamiento en caso de ser necesario para comparar los resultados en la fermentación, sin embargo el tratamiento termoquímico enzimático como mejor resultado con 161 mg AR/g HSG se muestra casi al doble del segundo mejor resultado, con estos valores se pudo seleccionar que pretratamiento es el indicado para obtener mayor cantidad de AR y paralelamente mayor obtención de bioetanol durante la fermentación.

4.2 Fermentación

La fermentación se llevó a cabo desde la propagación y conservación de *Pilobolus* sp., y de *Saccharomyces cerevisiae*.

- Del punto **3.2 Propagación y conservación de *Pilobolus* Sp.**, se tomó una alícuota de 1 mL del microorganismo y se inoculó en condiciones asépticas en cada uno de los tubos pretratados: solubilización, térmico y termoquímico, se cerró la muestra, se mezcló y se incubó a 30°C para fermentar a diferentes tiempos 18 h, 21 h, 24 h y 72 h, sin

agitación. Aquí se descartó el pretratamiento termoquímico enzimático debido a que se requiere observar la capacidad de hidrólisis enzimática del mismo hongo.

- Del punto **3.3 Propagación y conservación de *Saccharomyces cerevisiae***, se tomó una alícuota de 1 mL del microorganismo y se inoculó en condiciones asépticas en cada uno de los tubos pretratados: térmico, termoquímico y termoquímico enzimático, se cerró la muestra, se mezcló y se incubó a 30°C para fermentar a 12 h, sin agitación.

4.3 Bioetanol

4.3.1 Obtención de bioetanol con *Pilobolus*.

La producción de bioetanol con *Pilobolus sp.*, se puede explicar en la tabla 9, se presentan los tipos de pretratamiento utilizado, así como la concentración inicial de los azúcares con la que se comenzó cada proceso de fermentación, también los resultados de producción de bioetanol a las 24 h y a las 72 h para estudiar el comportamiento del microorganismo.

Tabla 9. Producción de bioetanol utilizando a *Pilobolus sp.*

Tipo de tratamiento	Concentración inicial mg de AR /g HSG	Producción	
		mg bioetanol/g HSG 24 horas	mg bioetanol/g HSG 72 horas
Solubilización* (H ₂ O destilada)	38 ±1	6.58 ±1	10.67 ±3
Térmico (H ₂ O destilada)	47 ±2	5.73 ±1	11.07 ±0
Termoquímico (H ₂ SO ₄ 1.0 %)	88 ±3	3.87 ±1	10.32 ±1

*El proceso de solubilización no lleva el proceso térmico.

Siendo el pretratamiento termoquímico el que tiene los valores más altos de AR, se esperaba una alta producción de bioetanol, por lo tanto, se brinda la siguiente explicación, el uso de ácido sulfúrico no es del todo bueno debido a la formación de productos de inhibición (Roca, 2004), como el 5-hidroximetilfurfural (HMF) o el furfural (F), que hacen que el hongo no realice un buen proceso de fermentación y se obtuvieron valores bajos de bioetanol.

Podemos observar que la fermentación es más favorable a las 72 h, con el pretratamiento el térmico con 11.07 mg de bioetanol/g de HSG, en donde podemos observar que no hay formación de inhibidores y el hongo puede trabajar correctamente. Pero el pretratamiento de nuestro de interés con la solubilización con 10.67 mg de bioetanol/g de HSG ya que este proceso con más estudios brindaría un giro importante desde la obtención de biocombustible hasta un bioproceso sustentable y con esto dar un impacto favorable al medio ambiente. Si se documenta que el hongo hace uso de sus enzimas.

En la Figura 8, se representan gráficamente los resultados de la obtención del bioetanol.

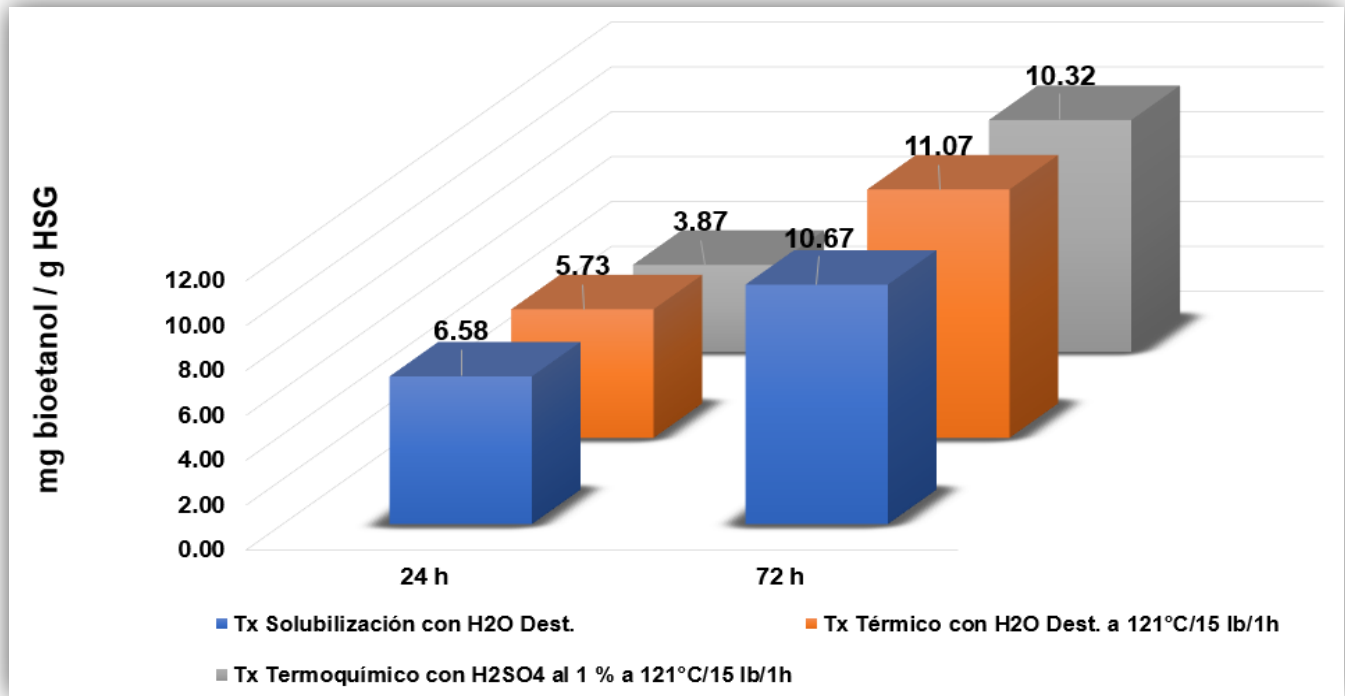


Figura 8. Producción de bioetanol hasta 72 h con *Pilobolus* sp.

4.3.2 Obtención de Bioetanol con *Saccharomyces*

En la tabla 10, se encuentran los valores de la producción de bioetanol a las 12 h usando a *Saccharomyces cerevisiae* con un pretratamiento termoquímico enzimático con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico 0.5 %, 0.75 %, 1.0 %, 1.25% y 1.5 %, así como el tratamiento térmico para observar el comportamiento del microorganismo y recabando dicha información para proponer el mejor de los pretratamientos para la producción más eficiente del biocombustible.

Tabla 10. Producción de bioetanol utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*.

Tipo de tratamiento	Concentración inicial mg de AR /g HSG	Concentración inicial mg de AR /g HSG	Producción mg bioetanol/g HSG
121°C/15 lb/1h	Sin coctel enzimático	Con coctel enzimático	12 h
Termoquímico A H ₂ SO ₄ 1.5 %	179 ±5	231 ±13	4 ±2
Termoquímico B H ₂ SO ₄ 1.5 %	174 ±4	199 ±20	7 ±1
Termoquímico C H ₂ SO ₄ 1.0 %	122 ±15	161±1	39 ±2
Térmico (H ₂ O destilada)	60 ±2	150 ±16	37 ±6

En la figura 10, Se muestra una cierta ventaja de los tratamientos termoquímicos con el uso de ácido en la obtención de AR, pero cuando a estos tratamientos se le adicionan enzimas, estas ayudan a una liberación más alta de AR. Esperando amplia producción de bioetanol.

En el proceso Termoquímico A, se observa un valor de 4 mg bioetanol/g HSG, se realizará nuevamente el experimento para poder discutir porque se obtiene una baja concentración del bioetanol si se obtuvo una alta concentración de AR.

Ahora en el proceso Termoquímico B, se vuelve a obtener un valor muy similar de 7 mg bioetanol/g HSG se deduce que hubo formación de inhibidores como el 5-hidroximetilfurfural o el furfural durante su pretratamiento y estos inhibidores fueron los que no permitieron una obtención eficiente de bioetanol.

Se modificó la concentración del H₂SO₄ de 1.5 % a 1.0 % y en el proceso Termoquímico C, se obtuvo un resultado de 39 mg bioetanol/g HSG, igualando los valores del proceso térmico con 37 mg bioetanol/g HSG, esto nos hace pensar que al disminuir la

concentración del ácido se puede evitar la formación de inhibidores y obtener una mayor concentración de bioetanol, tratando de realizar un proceso más limpio y así evitar contaminar con reactivos químicos lo más posible.

En la figura 9, se muestra el comportamiento los pretratamientos con y sin el uso de enzimas para la obtención de AR y la obtención del bioetanol.

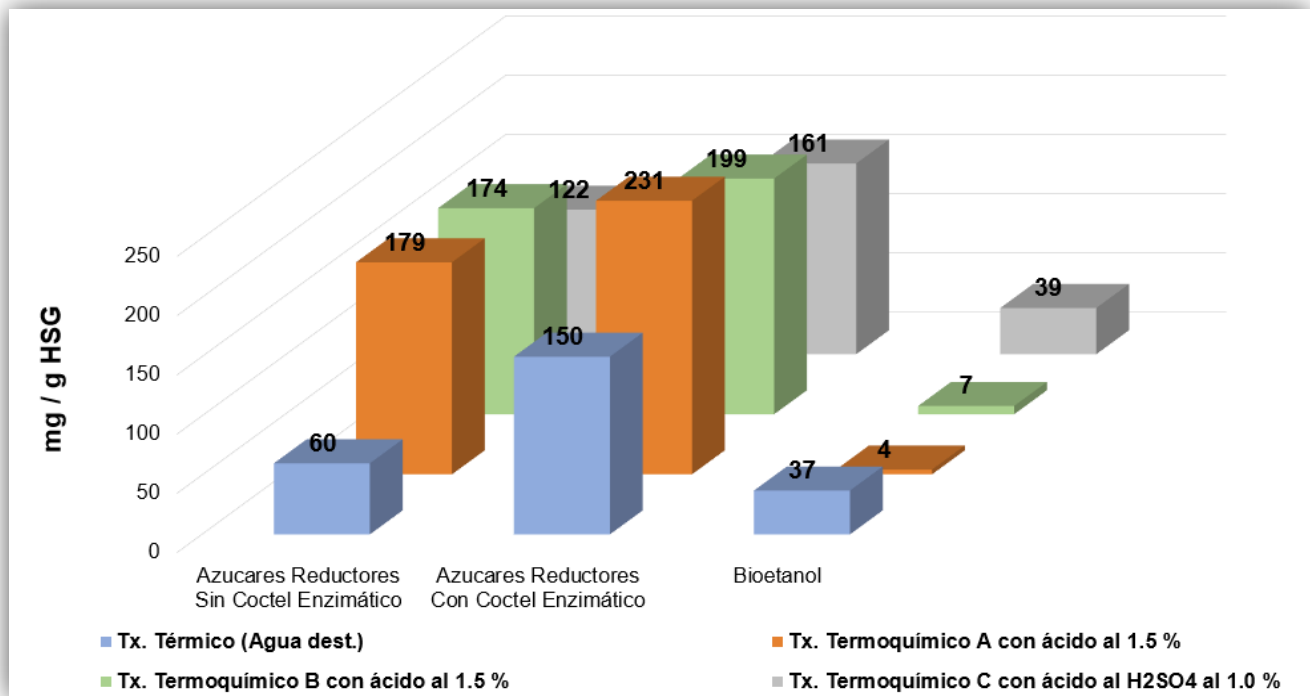


Figura 8. Producción de bioetanol a las 12 h con *S. cerevisiae*.

En la Tabla 11, se realizará la comparación de los diferentes tiempos de fermentación con ambos microorganismos.

Tabla 11. Comparación de las fermentaciones con ambos microorganismos.

Tipo de tratamiento	Producción mg bioetanol/g HSG	Tipo de tratamiento	Producción mg bioetanol/g HSG
121°C/15 lb/1h	30°C / 72 horas	121°C/15 lb/1h	30 °C / 12 horas
<i>Pilobolus sp.</i>		<i>Saccharomyces c.</i>	
Solubilización* (H ₂ O destilada)	10.67 ±3	Térmico (H ₂ O destilada)	37 ±6
Térmico (H ₂ O destilada)	11.07 ±0	Termoquímico (H ₂ SO ₄ 1.5 %)	4 ±2
Termoquímico (H ₂ SO ₄ 1.0 %)	10.32 ±1	Termoquímico (H ₂ SO ₄ 1.5 %)	7 ±1
-----	-----	Termoquímico (H ₂ SO ₄ 1.0 %)	39 ±2

Los resultados obtenidos podrían ser confusos, debido a la diferencia de horas durante la fermentación entre ambos microorganismos y al uso de enzimas con algunos de los pretratamientos.

Las primeras fermentaciones fueron realizadas con *Saccharomyces*, en los pretratamientos se usaron ácidos y enzimas para ayudar a obtener un número mayor de AR, que favorecerían a la fermentación, pero el uso de ácido paralelamente favoreció a la formación de inhibidores que llevaron a una desventaja a la levadura, alterando su metabolismo y evitando la formación eficiente del bioetanol.

Y las segundas fermentaciones fueron realizadas con *Pilobolus*, en donde se pudieron observar 3 pretratamientos que arrojaron valores relevantes al momento de analizar los resultados, con el uso de ácidos que nuevamente hubo formación de inhibidores, posteriormente el pretratamiento térmico arrojó resultados muy interesantes, pero los resultados relevantes fueron del pretratamiento realizando la solubilización, en donde al

finalizar la fermentación y cuantificar el bioetanol, se pudiera demostrar la capacidad de hidrólisis enzimática y la capacidad de fermentación.

5 Conclusión.

Se logra cultivar, propagar y conservar a *Pilobolus* sp., y a *Saccharomyces cerevisiae*, en tubos de crioconservación. Se trabajó con *Saccharomyces cerevisiae* y se logra tener un proceso de hidrólisis exitoso con el pretratamiento termoquímico enzimático y con *Pilobolus*, se tiene un valor importante con el pretratamiento de solubilización, aunque es necesario conocer las especies que están involucran con el microorganismo, ya que es necesario saber los tipos de enzimas que se desempeñan en la degradación de los residuos lignocelulósicos por cada especie implicada. La evaluación de las cuatro metodologías utilizadas en la experimentación con *Saccharomyces cerevisiae*, tiene una mayor ventaja cuando se utilizan enzimas y H₂SO₄ al 1.5 %, para obtener AR, por otra parte, las 3 metodologías utilizando con *Pilobolus* sp., los pretratamiento más relevante son el pretratamiento térmico y termoquímico, las dos mejores fermentaciones utilizando a la levadura son, el pretratamiento térmico y el termoquímico con H₂SO₄ al 1%, en el caso con el hongo el pretratamiento con la solubilización es el mejor, ya que se obtiene el bioetanol en cuestiones sustentables, ya que no se requiere el uso de ácido, calor, despresurización etc., La cuantificación del bioetanol producido es determinado por HPLC-ID, a partir de las 24 h de la fermentación utilizando al hongo y con la levadura la determinación fue a partir de las 12 h.

6 BIBLIOGRAFÍA

Amaya-Delgado, L., Flores-Cosío, G., Sandoval-Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2018). Comparative of Lignocellulosic Ethanol Production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Special Topics in Renewable Energy Systems*, 1.

Benner, R., Maccubbin, A. E., & Hodson, R. E. (1984). Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 998-1004.

Berlowska, J., Cieciora-Włoch, W., Kalinowska, H., Kregiel, D., Borowski, S., Pawlikowska, E., ... & Witonska, I. (2018). Enzymatic conversion of sugar beet pulp: A comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation for lactic acid production. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 188-196.

Chandel, A., & Da Silva, S. S. (Eds.). (2013). *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass: Techniques, Applications and Commercialization*. BoD—Books on Demand.

da Costa, J. A., Marques Jr, J. E., Gonçalves, L. R. B., & Rocha, M. V. P. (2015). Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. *Bioresource technology*, 179, 249-259.

de Almeida Silva Vilela, J., de Figueiredo Vilela, L., Ramos, C. L., & Schwan, R. F. (2020). Physiological and genetic characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for potential use in productions of fermented maize-based-beverages. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-11.

de Souza, C. J., Costa, D. A., Rodrigues, M. Q., dos Santos, A. F., Lopes, M. R., Abrantes, A. B., ... & Fietto, L. G. (2012). The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 109, 63-69.

Dionisi, D., Anderson, J. A., Aulenta, F., McCue, A., & Paton, G. (2015). The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 366-383.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Elizalde-González, M. P., & Hernández-Montoya, V. (2009). Guava seed as an adsorbent and as a precursor of carbon for the adsorption of acid dyes. *Bioresource technology*, 100(7), 2111-2117.

Fuchs, G. (2008). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 82-99.

Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 45-50.

Gupta, A., & Prakash, J. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567.

Gupta, R., Sharma, K. K., & Kuhad, R. C. (2009). Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100(3), 1214-1220.

Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.

Houfani, A. A., Anders, N., Spiess, A. C., Baldrian, P., & Benallaoua, S. (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. *Biomass and Bioenergy*, 134, 105481.

Imlauer-Vedoya, C. M., Vergara-Alarcón, P., Area, M. C., Revilla, E., Felissia, F. E., & Villar, J. C. (2019). Fractionation of *Pinus radiata* wood by combination of steam explosion and organosolv delignification. *Maderas. Ciencia y tecnología*, (AHEAD), 0-0.

J. Webster and R. W. S. Weber 2007, Introduction to Fungi, Cambridge University Press, New York Third Edition Pag. 189.

Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Isolation of Coprophilous Fungi (Moist Chamber Method). In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology* (pp. 117-118). Humana, New York, NY.

Jamróz, J., & Jankowski, D. (2018). Characteristics of producing ethyl alcohol. *Technical Transactions*, 11(3), 53-66.

Jung YH, Kim IJ, Kim HK, Kim KH. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2013;132(0):109-14.

Karp, A., & Shield, I. (2008). Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist*, 179(1), 15-32.

Kotarska K, Świerczyńska A, Dziemianowicz W. Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation: Study on the decomposition of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*. 2015;75(0):389-94.

Kowalski, S., Lukaszewicz, M., Duda-Chodak, A., & Zięć, G. (2013). 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF)—Heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation—a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(4), 207-225.

Lee, K. H., Choi, I. S., Kim, Y.-G., Yang, D.-J., and Bae, H.-J. (2011). "Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads," *Bioresour. Technol.* 102(17), 81918198. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.06.063

Leite, P., Sousa, D., Fernandes, H., Ferreira, M., Costa, A. R., Filipe, D., ... & Salgado, J. M. (2020). Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 100407

Leppänen, I., Vikman, M., Harlin, A., & Orelma, H. (2020). Enzymatic Degradation and Pilot-Scale Composting of Cellulose-Based Films with Different Chemical Structures. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(2), 458-470.

Liu S-Y, Lin C-Y. (2009). Development and perspective of promising energy plants for bioethanol production in Taiwan. *Renewable Energy*, (34):1902-7.

Lokare, P., & Fatima, S. Study od diversity of coprophilous fungi from selected dung sample. : 2020, 259.

Makhuvele, R., Ncube, I., van Rensburg, E. L. J., & La Grange, D. C. (2017). Isolation of fungi from dung of wild herbivores for application in bioethanol production. *brazilian journal of microbiology*, 48(4), 648-655.

Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(2), 105-114.

Maurya, D. P., Singla, A., & Negi, S. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5(5), 597-609.

Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 522-550.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., & Burton, A. L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1(2), 127-132.

Min, H., Uk, H., Kyu, S., Hyub, J., & Moon, J. (2013). Influence of thermophilic aerobic digestion as a sludge pre-treatment and solids retention time of mesophilic anaerobic digestion on the methane production , sludge digestion and microbial communities in a sequential digestion process. *Water Research*, 1–14.

Mitchell, D. A., Krieger, N., & Beroviè, M. (2006). Solid-state fermentation bioreactors- Fundamentals of design and operation, pp Springer-Verlag. *Berlin Heidelberg*.

Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., & Aroca, G. (2015). Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol : Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1349–1361. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.097>

Naresh, M., Rajarathinam, K., Senniyappan, R., Moorthy, T., & Kumar, R. (2018). Choice of Pretreatment Technology for Sustainable Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass : Bottle Necks and Recommendations. *Waste and Biomass Valorization*, 0(0), 0.

Nielsen, S. S. (2007). *Análisis de los Alimentos* (pp. 169–177). Zaragoza España: Acribia.

Noreen, N., Ramzan, N., Perveen, Z., & Shahzad, S. (2019). A Comparative study of cow dung compost, goat pellets, poultry waste manure and plant debris for thermophilic, thermotolerant and mesophilic microflora with some new reports from pakistan. *Pak. J. Bot*, 51(3), 1155-1159.

Orlando J. Rojas (2016) *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*, New York, Springer International Publishing Switzerland.

Ouensanga, A., Largitte, L., & Arsene, M. A. (2003). The dependence of char yield on the amounts of components in precursors for pyrolysed tropical fruit stones and seeds. *Microporous and mesoporous materials*, 59(2-3), 85-91.

Ouensanga, A., Largitte, L., & Arsene, M. A. (2003). The dependence of char yield on the amounts of components in precursors for pyrolysed tropical fruit stones and seeds. *Microporous and mesoporous materials*, 59(2-3), 85-91.

Palmqvist, E., Almeida, J. S., & Hahn-Hägerdal, B. (1999). Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and bioengineering*, 62(4), 447-454.

Pandey, A., Soccol, C. R., & Larroche, C. (Eds.). (2008). *Current developments in solid-state fermentation*. Springer Science & Business Media.

Pizarro Martínez, D. (2020). *Secuenciación metagenómica y nuevos procedimientos bioinformáticos para entender la evolución de hongos liquenizados* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Rahman, I. A. (2003). Utilization of guava seeds as a source of activated carbon for removal of methylene blue from aqueous solution. *MALAYSIAN JOURNAL OF CHEMISTRY (MJChem)*, 5(1), 8-14.

Rahman, I. A., & Saad, B. (2003). Utilization of *guava seeds* as a source of activated carbon for removal of methylene blue from aqueous solution. *Malaysian Journal of Chemistry*, 5(1), 8-14.

Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. M. (2004). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Editorial Hélice.

Rojas, O. J. (Ed.). (2016). *Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials* (Vol. 271). Springer.

Sakes, A., van der Wiel, M., Henselmans, P. W., van Leeuwen, J. L., Dodou, D., & Breedveld, P. (2016). Shooting mechanisms in nature: a systematic review. *Plos one*, 11(7), e0158277.

Schiener, P., Stanley, M. S., Black, K. D., & Green, D. H. (2016). Assessment of saccharification and fermentation of brown seaweeds to identify the seasonal effect on bioethanol production. *Journal of Applied Phycology*, 28(5), 3009-3020.

Sediawan, W. B., Sulisty, H., & Hidayat, M. (2016). Sulfuric acid hydrolysis of various lignocellulosic materials and its mixture in ethanol production,

Serna Cock, L., Mera Ayala, J. D., Angulo Lopez, J. E., & Gomez Schouben, A. L. (2013). Kinetics of alcoholic fermentation using guava (*Psidium guajava*) seed flour and dry mycelium of *Aspergillus niger* as nitrogen sources. *Dyna*, 80(180), 113-121.

Serna Cock, L., Mera Ayala, J. D., Angulo Lopez, J. E., & Gómez Schouben, A. L. (2013). Kinetics of alcoholic fermentation using guava (*Psidium guajava*) seed flour and dry mycelium of *Aspergillus niger* as nitrogen sources. *Dyna*, 80(180), 113-121.

Shaheen, M., Choi, M., Ang, W., Zhao, Y., Xing, J., Yang, R., ... & Chen, J. (2013). Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 57, 462-468.

Singh Oberoi H, Venkata Vadlani P, Madl RL. Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. *J Agric Food Chem*. 2010:3422-9.

Singh, J., Suhag, M., & Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydrate polymers*, 117, 624-631.

Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(6), 701-708.

Thangavelu SK, Ahmed AS, Ani FN. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016; 56:820-35.

Tofalo, R., Fusco, V., Böhnlein, C., Kabisch, J., Logrieco, A. F., Habermann, D., ... & Neve, H. (2020). The life and times of yeasts in traditional food fermentations. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3103-3132.

Vázquez, B. C., Roa-Morales, G., Rangel, R. N., Hernandez, P. B., & Luna, J. S. (2017). Thermal hydrolysis of orange peel and its fermentation with alginate beads to produce ethanol. *BioResources*, 12(2), 2955-2964.

Vucurovic VM, Razmovski RN. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2012:128-34.

Wang, L., Littlewood, J., & Murphy, R. J. (2013). Environmental sustainability of bioethanol production from wheat straw in the UK. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, 715–725.

Widmer W, Zhou W, Grohmann K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010:5242–9.

Widmer W, Zhou W, Grohmann K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010:5242–9.

Wyman, C. (1996), *Handbook on Bioethanol Production and Utilization*. New York: Ed. Taylor & Francis, Pag,1, 10.

Wyman, C. (1996). *Handbook on bioethanol: production and utilization*. CRC press.

Yahia, E. M. (Ed.). (2018). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2 Volumes*. John Wiley & Sons.

Ye Lee, J., Li, P., Lee, J., Ryu, H. J., & Oh, K. K. (2013). Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, 127, 119-125.

Zah, R., Böni, H., Gauch, M., Hischer, R., Lehmann, M., & Wäger, P. (2007). Life cycle assessment of energy products: environmental impact assessment of biofuels. *Executive Summary. Mimeographed. Empa, St. Gallen, Switzerland*.

Zohri, A. N. A., Abdelazim, M., & Ibrahim, S. (2018). 2-Aminoethanaminium 2-(ethoxycarbonyl)-4, 6-dinitrophenolate as a greener route in reducing sugar quantification. *MethodsX*, 5, 609-612.