



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE PIÑA”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

I.BQ. Jhony Gilberto Morales Vázquez

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Leticia López Zamora

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

JUNIO 2020



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Orizaba, Veracruz, 08/06/2020

Dependencia: **División de Estudios de
Posgrado e Investigación**

Asunto: **Autorización de Impresión**

OPCION: **I**

C. JHONY GILBERTO MORALES VÁZQUEZ

Candidato a Grado de Maestro en:

CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

P R E S E N T E . -

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE PIÑA".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®



Delma Vargas López

LI. DELMA VARGAS LOPEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
PROFESIONALES





EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2020, Año de Leonor Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Orizaba, Veracruz, **Junio 2 de 2020.**

Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.
JHONY GILBERTO MORALES VÁZQUEZ

La cual lleva el título de:
PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE PIÑA

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

FIRMA

SECRETARIO: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

FIRMA

VOCAL: MC. MARIA ELENA GARCÍA REYES

FIRMA

VOCAL SUP.: DR. FUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

FIRMA

FTI-TI-013



Declaración

Yo, Jhony Gilberto Morales Vázquez, certifico que esta tesis, que tiene una extensión de 104 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección de Dra. Leticia López Zamora y Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga y no ha sido sometida en ningún otra institución previamente.

Fui admitido como estudiante de la maestría en enero del 2018 y mi trabajo de tesis fue liberado para su impresión el 8 de junio del 2020

También declaro que, al presentar esta tesis, el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba tiene permiso para publicarla en formato electrónico bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Fecha: 8 de junio de 2020

Firma: 

Vo. Bo.

Asesor: Dra. Leticia López Zamora

Firma del asesor: 



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

OFICIO No. 168/JFE/MCIQ/2020
Asunto: Carta de liberación de Plagio

Dra. OFELIA LANDETA ESCAMILLA
COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE

Por este conducto me permito informarle que en base a los resultados obtenidos por el software institucional de la institución es posible afirmar que el porcentaje de plagio de la tesis es menor al máximo permitido por el Consejo Académico. La tesis analizada corresponde al C. **Jhony Gilberto Morales Vázquez** con número de control **M07020961**, perteneciente al programa de posgrado de **Maestría en Ciencias en Ingeniería Química** cuyo título de su tema de tesis es: **Producción de etanol a partir de residuos de piña** el cual está dirigido por la **Dra. Leticia López Zamora** y la **Dra. Ma. Guadalupe Aguilar Uscanga**.

En base a la descrito anteriormente, se establece la tesis como **LIBERADA DE PLAGIO**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo,

A T E N T A M E N T E
EXCELENCIA EN EDUCACION TECNOLOGICA®
Ciencia-Técnica-Cultura®

Dr. Oscar Osvaldo Sandoval González
Encargado Institucional para el Análisis de Plagio
C.p.p. Coordinación académica
C.p.p. Archiv

M00-PM-PLAGIO-F03



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a ti, mi amada esposa Sandra, porque asumiste con gran esfuerzo tu rol de ayuda idónea para que yo no renunciara a mis deseos y pudiese iniciar y concluir esta maestría.

A ti mamá, porque sin tener recurso alguno y dependiendo completamente de mí, decidiste darme de lo que tenías, tu apoyo, tu esfuerzo y tu amor para que yo siguiera con mis planes; pronto habrá recompensa mamá.

A mis maestros en los cuales hallé gracia delante de sus ojos dándome un voto de confianza a pesar de mi muy particular situación en la que tuve que realizar esta maestría y también, cuando se trataba de responder una pregunta o explicar una y otra vez si algo no me quedaba claro, a ellos les agradezco que hayan entendido que su principal deber no es demostrar que saben sino transmitir lo que saben a otros.

A mis compañeros de aula, porque en medio de todas las exigencias y cada quien, con sus propios asuntos, fueron muy buenos compañeros de maestría, gracias por su compañerismo, aprecio y aceptación en el grupo, por las risas y compañía en el laboratorio cuando el trabajo se extendía por varias horas.

A mi directora de tesis, Dra. Leticia, gracias porque a pesar de todos los inconvenientes que yo pude representar, siempre mantuvo la voluntad de terminar con este trabajo y se logró de la mejor manera.

A mi codirectora de tesis, Dra. Guadalupe, gracias por haber aceptado trabajar conmigo, darme acceso completo a su laboratorio y demás recursos, y mostrar siempre voluntad de concluir este trabajo a pesar de todo.

Por último y mucho más importante que todos los anteriores, te dedico este trabajo a ti, mi Dios, porque a pesar de todas mis limitaciones tú sabes que me esforcé y que di todo de mí en todos los aspectos para llegar hasta este punto, gracias porque cumpliste conmigo tu promesa de usar a quien es descartado para demostrar a los más destacados que eres tú quien hace todas las cosas posibles, gracias porque, así como en el pasado, hoy, lo hiciste de nuevo.

RECONOCIMIENTOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

2019	Expositor	Study of the effect of deep eutectic solvents (DES) in pineapple waste applying experimental design. VI Jornada de Ingeniería de Alimentos/Meeting of Food Engineering 2019 (MFE19). 16 – 18 de octubre del 2019. Tuxtepec, Oaxaca. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec en el marco del día mundial de la alimentación.
2019	Expositor	Estudio de hidrólisis enzimática sobre rastrojo de piña pretratado con solvente eutéctico profundo (DES). VI Encuentro Internacional Sobre Biotecnología. 1 – 4 de diciembre del 2019. Tlaxcala, Tlax. Universidad autónoma de Tlaxcala.

RESUMEN

PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE PIÑA

Elaborado por: Ing. Jhony Gilberto Morales Vázquez
Dirigido por: Dra. Leticia López Zamora
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Transformar la biomasa lignocelulósica en biocombustibles u otros productos de valor agregado es de interés mundial debido a que es un recurso fácilmente disponible, económico y renovable. La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de polisacáridos, celulosa y hemicelulosa (50-65%), y el biopolímero aromático, lignina (10-30%). La ruta comercial más prometedora para la utilización de la biomasa lignocelulósica es la fermentación de azúcares de celulosa y hemicelulosa en etanol. Un proceso general incluye reducción de tamaño, pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación como los principales pasos. El pretratamiento es esencial para reducir la característica recalcitrante de la biomasa y lograr altas eficiencias en la hidrólisis enzimática. Los azúcares obtenidos pueden fermentarse para producir etanol. El objetivo de este trabajo fue aprovechar la disponibilidad de los residuos de piña para emplearlos como materia prima después de ser pretratados químicamente con Solventes Eutécticos Profundos (por sus siglas en inglés, DES) para la producción de bioetanol, mediante hidrólisis enzimática y fermentación por lote. Para ello, primero se llevó a cabo una optimización del pretratamiento químico con DES mediante un Diseño Central Compuesto (DCC), evaluando la relación sólido líquido (RSL) (1:20, 1:24 y 1:28 p/p), el tiempo de reacción (8, 12 y 16 h) y la proporción molar de la parte ácida del DES respecto al ácido fórmico (1, 2 y 3 mol). Posteriormente, fue optimizada la etapa de hidrólisis enzimática variando la concentración de enzima (3, 5 y 7% p/v) y los moles de ácido fórmico en el DES (1.5, 3 y 4.5 mol), este proceso de sacarificación se llevó a cabo utilizando las enzimas Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3 a un pH 5, RSL 1:6 g/mL, temperatura de 50 °C y una agitación de 250 rpm durante 40 h. Una vez obtenidos los azúcares fermentables en la hidrólisis enzimática, se llevó a cabo la fermentación por lote para la transformación de los azúcares en etanol. Los resultados obtenidos mostraron que el DCC para el pretratamiento bajo una RSL 1:24 g/g, un tiempo de reacción de 12 h y una relación molar respecto al ácido fórmico de 3.41, permitió una remoción máxima de Lignina Soluble en Ácido (ASL) del 54.64% y un incremento máximo de celulosa del 259.4%, esto, respecto a la materia prima sin pretratar. Estos efectos observados en el pretratamiento, fueron los que permitieron alcanzar valores mayores a 40 (g/L) de glucosa y 15 (g/L) de xilosa en la hidrólisis enzimática. En el proceso de fermentación del hidrolizado enzimático con la levadura *S. cerevisiae* ITV-01 bajo un pH de 5.5, 150 rpm, 30 °C y una concentración inicial de 3×10^6 cell viables/mL se logró obtener hasta 10.42 (g/L) de bioetanol en un tiempo de 12 h, obteniendo un rendimiento y productividad de 0.404 y 0.868 respectivamente. Los resultados obtenidos refuerzan lo prometedor que son los residuos lignocelulósico, el pretratamiento con DES y la hidrólisis enzimática con enzimas mejoradas en el desarrollo del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación.

ABSTRACT

ETHANOL PRODUCTION FROM PINEAPPLE WASTE

By: Ing. Jhony Gilberto Morales Vázquez
Advisor(s): Dra. Leticia López Zamora
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Transforming lignocellulosic biomass into biofuels or other value-added products is of global interest because it is a readily available, inexpensive, and renewable resource. Lignocellulosic biomass is mainly composed of polysaccharides, cellulose and hemicellulose (50-65%), and the aromatic biopolymer, lignin (10-30%). The most promising commercial route for the use of lignocellulosic biomass is the fermentation of cellulose and hemicellulose sugars in ethanol. A general process includes size reduction, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation and distillation as the main steps. Pretreatment is essential to reduce the recalcitrant characteristic of biomass and achieve high efficiencies in enzymatic hydrolysis. The sugars obtained can be fermented to produce ethanol. The objective of this work was to take advantage of the availability of pineapple waste to use them as raw material after being chemically pretreated with Deep Eutectic Solvents (DES) for the production of bioethanol, by enzymatic hydrolysis and batch fermentation. For this, an optimization of the chemical pretreatment with DES was first carried out by means of a Central Composite Design (CCD), evaluating the solid liquid relation (SLR) (1:20, 1:24 and 1:28 w/w), the reaction time (8, 12 and 16 h) and the molar ratio of the acid part of DES regarding formic acid (1, 2 and 3 mol). Subsequently, the enzymatic hydrolysis step was optimized by varying the enzyme concentration (3, 5 and 7% w / v) and the moles of formic acid in the DES (1.5, 3 and 4.5 mol), this saccharification process was carried out using the Cellic® CTec3 and Cellic® HTec3 enzymes at a pH of 5, SLR 1: 6 g/mL, temperature of 50 °C and a stirring of 250 rpm for 40 h. Once the fermentable sugars were obtained in the enzymatic hydrolysis, the batch fermentation was carried out for the transformation of the sugars into ethanol. The results obtained showed that the CCD for pretreatment under an SLR 1:24 g/g, a reaction time of 12 h and a molar ratio with respect to formic acid of 3.41, allowed a maximum removal of Acid Soluble Lignin (ASL) from the 54.64% and a maximum increase in cellulose of 259.4%, this, compared to raw material without pretreatment. These effects observed in the pretreatment were those that allowed reaching values greater than 40 (g/L) of glucose and 15 (g/L) of xylose in the enzymatic hydrolysis. In the fermentation process of the enzymatic hydrolyzate with the *S. cerevisiae* ITV-01 yeast under a pH of 5.5, 150 rpm, 30 ° C and an initial concentration of 3×10^6 viable cells/mL, it was possible to obtain up to 10.42 (g/L) of bioethanol in a time of 12 h, obtaining a yield and productivity of 0.404 and 0.868 respectively. The obtained results reinforce how promising are the lignocellulosic residues, the pretreatment with DES and the enzymatic hydrolysis with improved enzymes in the development of the process of obtaining second generation bioethanol.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	IX
NOMENCLATURA	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Bioetanol como fuente de energía	4
1.1.1 Bioetanol de primera y segunda generación	4
1.1.2 Bioetanol de tercera y cuarta generación	5
1.2 La piña (<i>Ananas comosus</i>)	5
1.3 Producción de piña, proyección y perspectiva como biomasa	6
1.3.1 Procesamiento de la piña y sus residuos	8
1.3.2 Material lignocelulósico de la piña y otras fuentes de biomasa	8
1.4 Material lignocelulósico	9
1.4.1 Celulosa	10
1.4.2 Hemicelulosa	10
1.4.3 Lignina	10
1.5 Descripción general de la conversión del material lignocelulósico	11
1.5.1 Pretratamientos físicos	11
1.5.2 Pretratamiento ácido	11
1.5.3 Pretratamiento alcalino	12
1.5.4 Pretratamiento con disolventes orgánicos	12
1.5.5 Métodos de pretratamiento para el material lignocelulósico	12
1.6 Breve descripción de la química sostenible	12
1.6.1 Solventes verdes	14
1.6.2 Solventes fluorados	14
	v

1.6.3	Líquidos iónicos	15
1.6.4	Fluidos supercríticos	16
1.7	Solventes Eutécticos Profundos	17
1.7.1	Interacciones de puentes de hidrógeno presentes en los DES	18
1.7.2	Cloruro de Colina	19
1.7.3	Sustancias aceptores (HBA) y donadores de hidrógeno (HBD)	20
1.8	Aplicaciones de los Solventes Eutécticos Profundos	20
1.8.1	Procesamiento de metales	20
1.8.2	Síntesis química	21
1.8.3	Adsorción de gases	22
1.8.4	Biotransformaciones	23
1.8.5	Purificación y fabricación de biodiesel	24
1.9	Pretratamiento de residuos lignocelulósicos	24
1.10	Hidrólisis enzimática	26
1.11	Fermentación por lote de los azúcares liberados	27
1.12	Conversión de los azúcares fermentables en bioetanol	29
1.12.1	Estequiometría y cinética en cultivo por lote	31
1.13	Diseño experimental	32
1.13.1	Análisis de diseños de superficie de respuesta	34
1.14	Antecedentes	35

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Metodología general	43
2.2	Pretratamiento físico del material lignocelulósico, secado y molienda	44
2.3	Análisis lignocelulósico, humedad y cenizas	44
2.4	Preparación de los solventes eutécticos profundos (DES)	46
2.5	Pretratamiento químico del material lignocelulósico RP1 con DES	47
2.6	Estudio del pretratamiento con DES	48
2.6.1	Evaluación del efecto del DES aplicada a la hidrólisis enzimática	49
2.7	Optimización de la Hidrólisis Enzimática	49

2.8	Medios de cultivo	50
2.8.1	Medio de conservación	50
2.8.2	Medio de fermentación	50
2.8.3	Precultivo y preinóculo	51
2.8.4	Inóculo y fermentación por lote del hidrolizado enzimático	52
2.9	Métodos analíticos	52
2.9.2	Análisis de biomasa	52
2.9.3	Cuantificación celular	53
2.9.4	Viabilidad celular	53
2.10	Cuantificación de azúcares y etanol	54
2.11	Análisis de datos experimentales	55

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Caracterización lignocelulósica de los residuos de piña	57
3.2	Pretratamiento de RP1 con DES	59
3.3	Resultados del pretratamiento de RP1 con DES basado en el DCC	60
3.4	Resultados de la hidrólisis enzimática sobre RP2 pretratado con DES	62
3.5	Optimización de la hidrólisis enzimática sobre RP2 pretratado con DES	67
3.6	Resultados de la fermentación por lote del hidrolizado enzimático	71

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

ANEXOS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1 Esquema de la estructura del material lignocelulósico	10
1.2 Interacciones de puente de hidrógeno presentes en las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión basadas en ChCl	19
1.3 Curva de crecimiento de cultivo bacteriano	27
1.4 Catabolismo de la D-Glucosa en <i>S. cerevisiae</i>	30
1.5 Diseño Central Compuesto para 2 y 3 factores	33
1.6 Diseño de Box-Behnken de tres factores	33
2.1 Proceso de obtención de etanol a partir de residuos de piña	43
3.1 Gráfica de efectos principales para la variable de respuesta % de celulosa	60
3.2 Gráfica de superficie de respuesta: a) Tiempo (h) vs RSL (g/L), b) RSL (g/L) vs Ác. Fórmico (mol) y c) Ác. Fórmico (mol) vs Tiempo (h)	64
3.3 Gráfica de contornos: a) Tiempo (h) vs. RSL (g/g), b) Ác. Fórmico (mol) vs. RSL (g/g) y c) Ác. Fórmico (mol) vs. Tiempo (h)	65
3.4 Gráfica de superficie de respuesta: Ác. Fórmico (mol) vs % Enzima	69
3.5 Gráfica de contornos: Ác. Fórmico (mol) vs. % Enzima	70
3.6 Cinéticas fermentativas del hidrolizado enzimático	71
3.7 Rendimientos y productividad del estudio de fermentación	72
3.8 Velocidad específica de crecimiento del estudio de fermentación	73
3.9 Velocidades globales y específicas del estudio de fermentación	74
A1 Aceptores de hidrógeno descritos para la síntesis de DES	84
A2 Donantes de hidrógeno descritos para la síntesis de DES	85
C1 Gráfica de probabilidad normal en la optimización del pretratamiento del RP2. La respuesta es Azúcares Totales (g/L)	89
C2 Gráfica de probabilidad normal en la optimización de la hidrólisis enzimática del RP2 pretratado con DES. La respuesta es Azúcares Totales (g/L)	91

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1 Producción y proyección de la piña en México	7
1.2 Composición porcentual de residuos agroindustriales/materiales lignocelulósicos	9
1.3 Métodos de pretratamiento para material lignocelulósico	13
1.4 Comparativa entre pretratamientos ácidos, alcalinos y DES	25
1.5 Ecuaciones para el cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos	31
1.6 Cuadro grecolatino codificado	32
2.1 Características físicas de los reactivos para la síntesis de los DES	46
2.2 Relaciones para formar los DES en pesos moleculares (g/mol)	47
2.3 CGL decodificado	47
2.4 Matriz del DCC para el pretratamiento	48
2.5 Matriz del DCC para la evaluación del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática	49
2.6 DCC para la optimización de la hidrólisis enzimática	50
2.7 Medio de conservación de la <i>S. cerevisiae</i> ITV-01	50
2.8 Medio sintético de activación para la levadura <i>S. cerevisiae</i> ITV-01	51
2.9 Medio de pre-adaptación para la levadura <i>S. cerevisiae</i> ITV-01	51
2.10 Medio de fermentación para la levadura <i>S. cerevisiae</i> ITV-01	51
3.1 Caracterización de residuos de piña	57
3.2 Comparación de la estructura lignocelulósica de la piña	58
3.3 Resultados del pretratamiento con DES basados en el CGL	59
3.4 Resultados del pretratamiento con DES basados en el DCC	61
3.5 Resultados de la hidrólisis enzimática y evaluación lignocelulósica sobre el RP2 con DES	62
3.6 Comparativa de remoción de ASL y Lignina e incremento de Celulosa respecto a la materia prima RP2	63

3.7	Resultados de la hidrólisis enzimática y evaluación lignocelulósica sobre el RP2 con DES	67
3.8	Comparativa de remoción de ASL y Lignina e incremento de Celulosa respecto a la materia prima RP2	68
3.9	Comparación de resultados de la fermentación entre distintos autores	76
C1	ANOVA, regresión de superficie de respuesta para Azúcares Totales (g/L)	88
C2	ANOVA, regresión de superficie de respuesta para Azúcares Totales (g/L)	90
C3	Resultados de la cinética de fermentación	92
C4	Resultados de la cinética de fermentación	92
C5	Rendimientos, productividad, velocidades globales, específicas y eficiencia del estudio de las tres cinéticas de fermentación	93

NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidad
A_{IL}	Lignina Insoluble en Ácido (Acid Insoluble Lignin)	(%)
A_{IR}	Residuo Insoluble en Ácido (Acid Insoluble Residue)	(%)
A_{SL}	Lignina Soluble en Ácido (Acid Soluble Lignin)	(%)
dp	Diferencial de producto entre el tiempo final e inicial	(g/L)
ds	Diferencial de sustrato entre el tiempo inicial y final	(g/L)
dt	Diferencial entre el tiempo inicial y final	(h)
dx	Diferencial de biomasa entre el tiempo final e inicial	(g/L)
ODW	Peso Seco (Oven Dry Weight)	(g)
P_0	Concentración de producto al inicio de la fermentación	(g/L)
P_f	Concentración de producto al final de la fermentación	(g/L)
r_p	Velocidad global de producción de producto	(g/L*h)
r_s	Velocidad global de consumo de sustrato	(g/L*h)
r_x	Velocidad global de crecimiento de biomasa	(g/L*h)
S_0	Concentración de sustrato al inicio de la fermentación	(g/L)
S_f	Concentración de sustrato al final de la fermentación	(g/L)
t_f	Tiempo transcurrido al final de la fermentación	(h)
V_p	Velocidad específica de formación de producto	(g/g*h)
V_s	Velocidad específica de consumo de sustrato	(g/g*h)
X	Concentración de biomasa total	(g/L)
X_0	Concentración de biomasa al inicio de la fermentación	(g/L)
X_f	Concentración de biomasa al final de la fermentación	(g/L)
μ	Velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)
η	Eficiencia del proceso de fermentación	(%)

INTRODUCCIÓN

La economía global se basa en los costos de la energía y su disponibilidad. Actualmente los combustibles fósiles constituyen la principal fuente de energía que se usa en el mundo. Hoy en día, si se compara la tasa de retorno energética de estos combustibles con la de hace 20 años, se sabe que es inferior, esto, debido al difícil acceso a los pozos petroleros, los cuales requieren de equipos más sofisticados, lo que conlleva a una mayor inversión para la exploración y producción de energía a partir de fuentes fósiles.

En este sentido, es necesario buscar procesos de producción más eficientes en términos de reducción del consumo energético, simplificación de la tecnología utilizada y el desarrollo de nuevos procedimientos para la obtención de energía.

El bioetanol de segunda generación, es la alternativa energética más estudiada en los últimos años con el objetivo de colocarse como fuente principal de combustible, esto, debido a la capacidad de ser producido a partir de fuentes completamente renovables y sustentables y, a su vez, reducir la contaminación aprovechando los residuos orgánicos, los cuales, son empleados como biomasa lignocelulósica en el proceso de obtención de bioetanol.

Los residuos de piña tienen un alto potencial de uso como material lignocelulósico para obtener bioetanol a partir de ellos. En 2017, México fue décimo lugar a nivel mundial en producción de piña, siendo el estado de Veracruz el primer lugar en producción de este fruto a nivel nacional. Se estima que los residuos de la piña pueden alcanzar hasta el 65% del peso total del fruto, esto, sin considerar los residuos del rastrojo derivados de la cosecha (planta de la piña seca).

Para el pretratamiento de material lignocelulósico en la producción de bioetanol, existen distintos métodos ya establecidos, sin embargo, los mismos, aun presentan algunos inconvenientes en alguna fase de su implementación.

En respuesta a este tipo de desafíos, una nueva alternativa de pretratamiento con disolventes “verdes” ha emergido basado en la aplicación de Solventes Eutécticos Profundos (Deep Eutectic Solvents, por las siglas en inglés, DES).

Las principales ventajas de los DES son la alta solubilidad de la lignina, fácil y económica preparación, no hay consumo energético de purificación y eliminación de desechos del solvente, la recuperación y reutilización del solvente es posible, se pueden usar compuestos de baja toxicidad o no tóxicos para prepararlos, muchos DES y los componentes que los integran, tienen una biocompatibilidad y biodegradabilidad superior; por lo tanto, las enzimas son estables y activas en presencia de un DES, además, durante el uso en el pretratamiento no se generan inhibidores que puedan afectar la hidrólisis enzimática o la posterior fermentación del hidrolizado.

En base a la gran disponibilidad de los residuos lignocelulósicos de la piña, se emprendió un estudio para obtener bioetanol a partir de estos desechos, Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) Caracterizar la composición química del bagazo y rastrojo de piña en función de lignina, celulosa, hemicelulosa, porcentaje de humedad y cenizas, 2) Optimizar las condiciones del pretratamiento con solventes eutécticos profundos del bagazo y rastrojo de piña, 3) Optimizar las condiciones de la hidrólisis enzimática del residuo pretratado y 4) Establecer las condiciones de fermentación del hidrolizado enzimático utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante todos estos objetivos planteados, se obtuvo como producto final bioetanol con potencial de ser implementado como biocombustible a través de procesos adicionales de purificación.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Bioetanol como fuente de energía

El bioetanol es un recurso energético procesado a partir de materia obtenida de las plantas y sus frutos denominada “biomasa”, la cual puede presentarse en estado líquido, sólido o gaseoso. La finalidad del bioetanol obtenido a partir de biomasa es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión. Existen varios tipos de bioetanol, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos, debido a los avances en la tecnología, esta clasificación se realiza por generaciones en función de la fuente y material a utilizar (Álvarez, 2009).

1.1.1 Bioetanol de primera y segunda generación

La materia prima para el bioetanol de primera generación está conformada por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de azúcares, almidón y aceites, como, por ejemplo, remolacha azucarera, sorgo dulce y caña de azúcar, materiales con almidón, como el trigo, maíz y cebada y aceites como los de semilla de girasol, aceite de soya entre otras opciones más. En particular, el bioetanol de primera generación tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos (Bertrand *et al.*, 2016).

El principal material para el bioetanol de segunda generación son residuos agroindustriales y forestales compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (material lignocelulósico). Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, cáscaras de frutos, etc. La principal ventaja en la producción de este bioetanol radica en que no se emplean alimentos provenientes de la agricultura para este propósito. Su principal desventaja es la dificultad en la separación de la celulosa de la lignina para su posterior conversión en bioetanol (Aditiya *et al.*, 2016).

1.1.2 Bioetanol de tercera y cuarta generación

Para el bioetanol de tercera generación se implementan vegetales no alimenticios, de rápido crecimiento y con una alta capacidad energética almacenada en sus componentes químicos, entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y algas. Su principal desventaja es la utilización de tierras de cultivo de alimentos para sembrar los insumos, con excepción de las algas (Jambo *et al.*, 2016).

El bioetanol de cuarta generación es producido a partir de bacterias modificadas genéticamente, estas bacterias emplean dióxido de carbono u otra fuente de carbono para la obtención de este biocombustible. Bacterias u organismos genéticamente modificados para realizar alguna parte de los procesos también son empleadas en la obtención de bioetanol de las generaciones anteriores, pero, en este caso, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de este tipo de bioetanol (Ingram *et al.*, 1999; Niphadkar *et al.*, 2017).

1.2 La piña (*Ananas comosus*)

La planta de piña (*Ananas comosus*), es una hierba perenne que crece de 1 a 1.5 m de alto. Cuando se va a producir la fruta, se generan alrededor de 200 flores, cuyos frutos se combinan para formar la piña. Cada planta tiene de 70 a 80 hojas, que son una especie de vainas o láminas dispuestas en espiral, por lo general en capas. Sus flores poseen escamas foliares que retienen el agua. El fruto es ovalado y grueso que mide 30 cm de largo y 15 cm de diámetro, en promedio. Su pulpa comestible está rodeada de brácteas verdes que pasan a anaranjadas al madurar, formando la piel del fruto. En el extremo superior las brácteas se transforman en una corona de hojas. Su pulpa, amarilla o blanca, es carnosa, aromática, jugosa y dulce. En su interior hay un tronco fibroso duro que va desde la corona al pedículo. Este cultivo se puede sembrar todo el año siempre y cuando se cuente con un sistema de riego. Debe seleccionarse la semilla por tamaño y tipo para uniformar

cada superficie plantada; necesita sembrarse a una profundidad adecuada de modo que al crecer y fructificar no se vaya a volcar por el peso de la fruta y el efecto del viento (SAGARPA, 2017).

1.3 Producción de piña, proyección y perspectiva como biomasa

La piña es una fruta perecedera que generalmente se almacena solo durante 4-5 días después de la cosecha en condiciones ambientales. Normalmente, se consume fresca o como jugo. La piña que se produce en el país tiene tres usos como destino final: el primero es el consumo de fruto fresco como principal destino con aproximadamente el 70%; la segunda es la industrialización del fruto dedicada a la elaboración de almíbar y jugo representando alrededor del 24% de la producción; y finalmente la tercera con el 6% destinada al mercado de exportación de piña en fresco. Tan solo en el año 2017 se produjeron 27,402,956 toneladas de piña a nivel mundial. Costa Rica (3,056,445 Ton), Filipinas (2,671,711 Ton), Brasil (2,253,897 Ton), Tailandia (2,123,177 Ton), India (1,861,000 Ton), Indonesia (1,795,986 Ton), Nigeria (1,642,376 Ton), China (1,576,405 Ton), Colombia (1,091,042 Ton) y México (945,210 Ton), siendo éstos los 10 principales países productores de piña con una suma total de 19,017,249 toneladas de este fruto (Sánchez *et al.*, 2015; FAOSTAT, 2018).

En el periodo 2012-2017 la producción nacional de piña creció 24.4% (185,234 Ton), para Veracruz, en el mismo periodo, la producción de piña creció 12.3% (66,180 Ton). Al cierre del 2017 Veracruz es primer lugar en la producción de piña que se consume a nivel nacional. La piña es un fruto tropical con alto valor en el mercado internacional y con potencial en la fabricación de productos agroindustriales. La Tabla 1.1 muestra la producción y proyección de piña en México de 2016 y hasta 2030. (SAGARPA, 2017; SIAP-1, 2018; SIAP-2, 2018).

Tabla 1.1 Producción y proyección de la piña en México

Estimaciones **					Crecimiento acumulado (%)**				Crecimiento promedio anual (%)	
Año/periodo	2016	2018	2024	2030	2003 - 2016	2016 - 2018	2016 - 2024	2016 - 2030	2003 - 2016	2016- 2030
Producción potencial*** (miles de Ton)	875.84	912.71	1,023.31	1,133.91	29.07	4.21	12.12	29.47	1.98	1.74
Exportaciones (miles de Ton)	86.27	103.66	154.77	201.46	313.96	20.16	49.31	133.54	11.55	5.82
Valor de exportaciones (millones de dólares a precios de 2016)	42.57	51.16	76.38	99.42	---	---	---	---	---	---

(SAGARPA, 2017)

**Estimaciones realizadas por la Coordinación de asesores de la Subsecretaría de Agricultura

***Estimada con base en la capacidad instalada actual, rendimientos de referencia históricos y considerando que no se incrementará la frontera agrícola reportada en 2016

De las 13 entidades del país que se dedican al cultivo de la piña, Veracruz sembró 34 mil 926 hectáreas de piña obteniendo 604 mil 929 toneladas, por encima del estado de Oaxaca, que obtuvo 130 mil 437 toneladas de este fruto. El estado de Veracruz aportó el 64% de la cosecha consumida en México en 2017. José Azueta, Isla y Juan Rodríguez Clara son los principales productores de piña en la entidad con 171,505.5 Ton, 157,240 Ton y 154,118 Ton respectivamente, estos municipios contribuyeron con el 79.8% de la producción en Veracruz con un total de 482,863.5 Ton (SEDARPA-1, 2018; SEDARPA-2, 2018; SIAP-2, 2018).

El rastrojo de la cosecha de piña y sus residuos derivados de procesos agroindustriales y alimenticios (aproximadamente 338,760.24 – 393,203.85 Ton para el estado de Veracruz en 2017, considerando el porcentaje residual referenciado de Sánchez *et al.*, 2015) han sido tratados literalmente como basura sin obtener ningún tipo de aprovechamiento o beneficio de ello, incluso, los residuos pueden contribuir a la contaminación del medio ambiente. Lo anterior indica que México y específicamente Veracruz, tienen un enorme potencial para aprovechar, las grandes cantidades de residuos de la piña que se generan anualmente derivadas de la producción y consumo, como material lignocelulósico. El

aprovechamiento de estos residuos para la obtención de bioetanol contribuiría a reducir el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos, como la caña de azúcar, por ejemplo, así como reducir el uso excesivo de tierras de cultivo de alimentos para vegetales no alimenticios como sucede en la producción de bioetanol de tercera generación. Además, el bioetanol obtenido tiene un valor agregado y podría convertirse en un beneficio para los productores de piña y la sociedad en general. A través de pretratamientos y fermentación de los azúcares presentes en estos residuos, se puede obtener bioetanol, el cual posee una amplia gama de aplicaciones (Antonio *et al.*, 2011).

1.3.1 Procesamiento de la piña y sus residuos

Las formas más comunes de industrialización son las rebanadas y trozos en almíbar enlatados, purés y jugos. Los desechos de la industrialización de la piña constituyen del 56 - 65% del fruto, utilizándose solo el restante 44 - 35%, lo que representa una gran merma. El aprovechamiento de las fibras de rastrojo de piña en materiales compuestos, es una alternativa a las prácticas de eliminación de estos desechos. Dichos residuos fibrosos son considerados lignocelulósicos por estar formados principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, esta composición les confiere propiedades y estructura para ser usados en composta, textiles, en la manufactura de pulpa, papel, producción de combustibles alternativos, enzimas, alimento para ganado, confitería y materias primas para repostería (López, 2010; Sánchez *et al.*, 2015).

1.3.2 Material lignocelulósico de la piña y otras fuentes de biomasa

La presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina se ha documentado en distintos materiales de desecho (Sun y Cheng, 2002; Sánchez *et al.*, 2014), la Tabla 1.2 muestra la composición de distintos residuos agroindustriales incluidos los residuos de la piña, se puede apreciar la presencia de material lignocelulósico también presente en este tipo de desecho.

Tabla 1.2 Composición porcentual de residuos agroindustriales/materiales lignocelulósicos

Material Lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Tallos de maderas duras	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Tallos de maderas blandas	45 - 50	25 - 35	25 - 35
Cáscara de nuez	25 - 30	25 - 30	30 - 40
Mazorca de maíz	45	35	15
Gramíneas	25 - 40	35 - 50	10 - 30
Papel	85 - 99	0	0 - 15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15 - 20	80 - 85	0
Pelos de semilla de algodón	80 - 95	5 - 20	0
Periódico	40 - 55	25 - 40	18 - 30
Césped	45	31.4	12
Piña (Corona)	45.53 ± 1.17	21.88 ± 0.22	13.88 ± 1.70
Piña (Cáscara)	40.55 ± 1.02	28.69 ± 0.35	10.01 ± 0.38
Piña (Corazón)	24.53 ± 1.68	28.53 ± 1.37	5.78 ± 0.429
Piña (Rastrojo)	32.2	21	2.83

Tomado y adaptado de Sun y Cheng, (2002); López *et al.*, (2009), Sánchez *et al.*, (2014)

La composición química de los residuos de piña, muestra factibilidad de fermentar los azúcares presentes en el material celuloso mediante levaduras. Las fracciones de celulosa y hemicelulosa de los residuos agroindustriales pueden ser despolimerizadas en azúcares fermentables que dan lugar respectivamente a hexosas (glucosa y manosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), ya sea por hidrólisis enzimática o química (Tropea *et al.*, 2014).

1.4 Material lignocelulósico

La biomasa es materia orgánica que puede utilizarse como una fuente de energía renovable proveniente de diferentes formas. Incluye cultivos agrícolas, residuos de cultivos, madera, residuos animales, grasa animal, residuos municipales, plantas acuáticas, hongos, etc. La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis (Figura 1.1). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la

composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Cuervo *et al.*, 2009, Refaat, 2012).

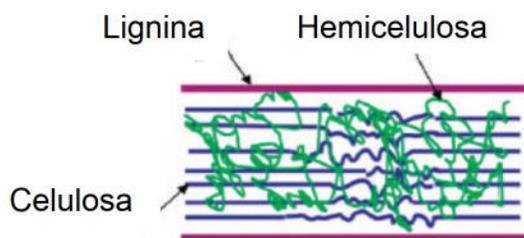


Figura 1.1 Esquema de la estructura del material lignocelulósico

1.4.1 Celulosa

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando y Waliszewski, 2005).

1.4.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez *et al.*, 2002).

1.4.3 Lignina

La lignina consiste en tres monómeros fenilpropanoides, a saber, alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumarílico. Estos monómeros están interconectados por una multitud de enlaces entre unidades que incluyen varios

tipos de éteres y enlaces carbono-carbono. La lignina da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Hu *et al.*, 2011, Watkins *et al.*, 2015).

1.5 Descripción general de la conversión del material lignocelulósico

En general, se pueden describir tres principales pasos para el proceso de conversión del material lignocelulósico a bioetanol: 1) Pretratamientos físicos y químicos, 2) Hidrólisis enzimática del material pretratado y 3) Fermentación del material hidrolizado (Cuervo *et al.*, 2009).

1.5.1 Pretratamientos físicos

El material lignocelulósico es fragmentado, triturado o molido para aumentar el área de contacto, lo que facilitará el acceso de las enzimas celulasas a las fibras de celulosa aumentando su conversión (Cuervo *et al.*, 2009).

1.5.2 Pretratamiento ácido

En la hidrólisis ácida se emplean ácidos como el H_2SO_4 y el HCl. En la hidrólisis ácida diluida la estructura firme de los materiales lignocelulósicos se rompe, seguida de la eliminación de la hemicelulosa, esto aumenta la porosidad y la digestibilidad enzimática de la biomasa. La hidrólisis ácida concentrada se lleva a cabo en condiciones de temperatura suave con diferentes tipos de materia prima y alto rendimiento de celulosa, esto, y la alta solubilidad de hemicelulosa y lignina en ácido, son sus principales ventajas. Sin embargo, la recuperación de los ácidos y el equipo resistente a la corrosión son costosos. Además, los inhibidores de la fermentación, como el hidroximetilfurfural, se producen con mucha frecuencia en altas concentraciones, lo que reduce la efectividad de este método (Badiei *et al.*, 2014).

1.5.3 Pretratamiento alcalino

El tratamiento diluido con NaOH causa hinchazón al material lignocelulósico, esto conlleva al aumento del área de superficie interna, disminuye el grado de polimerización, disminuye la cristalinidad, separa los enlaces entre lignina y carbohidratos y rompe la estructura de la lignina (Sun y Cheng, 2002).

1.5.4 Pretratamiento con disolventes orgánicos

El pretratamiento del material lignocelulósico con disolventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol o trietilenglicol, agua, entre otros), implica el uso de los mismos, por ejemplo, con o sin adición de catalizadores como oxálico, salicílico y ácido acetilsalicílico. Esta mezcla hidroliza los enlaces de lignina y los enlaces de lignina-carbohidrato, pero muchos de los enlaces de carbohidrato en la hemicelulosa también se rompen. La lignina se disuelve como resultado de la acción del solvente y la celulosa permanece en el material sólido residual (Mussatto y Teixeira, 2010).

1.5.5 Métodos de pretratamiento para el material lignocelulósico

Existen una gran variedad de pretratamientos físicos, químicos y biológicos documentados y empleados en el material lignocelulósico, algunos de ellos, se sintetizan y resumen en la Tabla 1.3.

1.6 Breve descripción de la química sostenible

Los solventes sostenibles son un tema de creciente interés tanto en la comunidad de investigación como en la industria química debido a una creciente conciencia del impacto de los solventes en la contaminación, el uso de energía y las contribuciones a la calidad del aire y el cambio climático. Las pérdidas de solventes representan una parte importante de la contaminación orgánica, y la eliminación de solventes

representa una gran proporción del consumo de energía del proceso. Para contrarrestar estos problemas, se ha propuesto y desarrollado una gama de solventes más ecológicos o más sostenibles en las últimas tres décadas. El objetivo de la química ecológica es reducir el uso y la producción de sustancias peligrosas para los procesos químicos, al tiempo que reduce el consumo de energía y avanza hacia fuentes renovables (Clarke *et al.*, 2018).

Tabla 1.3 Métodos de pretratamiento para material lignocelulósico

Tipo	Pretratamiento	Principales efectos	Ventajas	Desventajas
Biológico	Empleo de micro-organismos	<ul style="list-style-type: none"> • Degrada la lignina y hemicelulosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo consumo energético 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja tasa de hidrólisis
Químico	Líquidos iónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce la cristalinidad de la celulosa • Elimina la lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta dilución de hemicelulosa y lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación complicada, contaminante y costosa • Purificación • Biocompatibilidad inferior con enzimas/organismos
	Ozonólisis	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce el contenido de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin formación de inhibidores • Condiciones operativas suaves 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo de gran cantidad de ozono necesario
Físico	Explosión de vapor	<ul style="list-style-type: none"> • Transformación de la lignina y la solubilización de hemicelulosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Económico • Mayor rendimiento de glucosa y hemicelulosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Generación de compuestos inhibidores • Degradación parcial de la hemicelulosa
	Tecnología de fluidos supercríticos	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta el área de superficie accesible 	<ul style="list-style-type: none"> • Económico • Sin formación de inhibidores 	<ul style="list-style-type: none"> • No afecta a la lignina y hemicelulosa. • Muy altos requisitos de presión
	Oxidación húmeda	<ul style="list-style-type: none"> • Elimina la lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja formación de inhibidores. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto coste de oxígeno y catalizador alcalino
	Explosión de fibra de amoníaco	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta acceso al área de superficie • Elimina lignina y hemicelulosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja formación de inhibidores 	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiente para biomasa con alta lignina • Alto costo de gran cantidad de amoníaco.
	Percolación de amoníaco	<ul style="list-style-type: none"> • Elimina la lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Deslignificación selectiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto consumo energético

Tomado y adaptado de Aditiya *et al.*, 2016

1.6.1 Solventes verdes

Debido a que muchos disolventes convencionales utilizados en la industria son inflamables, volátiles, o tienen efectos agudos o crónicos en la salud y el medio ambiente, se buscan disolventes alternativos para llevar a cabo reacciones y procesos libres de estas desventajas y que contribuyan a proveer condiciones más seguras para la integridad de los trabajadores de la industria química y del medio ambiente. Es por esto que, los denominados “solventes verdes” tales como los líquidos iónicos, fluidos supercríticos, los DES, entre otros, toman un papel importante en la solución de estos problemas (Sierra *et al.*, 2014).

1.6.2 Solventes fluorados

Son disolventes orgánicos en los que los enlaces C-H se han sustituido, total o parcialmente, por enlaces C-F. Este enlace les confiere propiedades químicas inertes, por lo que al usarlos se evitan reacciones laterales y se facilita la purificación, son térmicamente estables, no son inflamables ni tóxicos, son accesibles en un amplio rango de puntos de ebullición, son inmiscibles con muchos disolventes orgánicos y con el agua, lo que permite su uso en sistemas bifásicos y facilita los procesos de separación. Los solventes fluorados se pueden utilizar para extraer metales de mezclas de reacciones orgánicas por la formación de complejos metálicos fluorados.

Algunos ejemplos de solventes fluorados son: perfluorohexano (C_6F_{14}), α , α , α -trifluorotolueno ($CF_3C_6H_5$), perfluoropolieter $CF_3[(OCF(CF_3)CF_2)_n(OCF_2)_m]OCF_3$, perfluorooctano (C_8F_{18}), perfluorotributilamina ($C_{12}F_{27}N$), perfluorodecalina ($C_{10}F_{18}$), perfluorometilciclohexano ($C_6F_{11}CF_3$). La escasa capacidad disolvente de los líquidos fluorados hace necesario modificar las especies que se desean disolver en ellos. Así, los catalizadores se modifican mediante la introducción de cadenas fluoradas, en general hace falta al menos un 60% en peso de contenido en flúor

para lograr una buena solubilidad, lo que a menudo resulta una limitación importante (Pérez, 2007; Morales, 2013).

1.6.3 Líquidos iónicos

Son sales que por lo general funden a una temperatura menor a 100 °C y están compuestas por un catión orgánico voluminoso y un anión inorgánico más pequeño. Cuentan con ventajas tales como una presión de vapor muy baja (no son volátiles), poseen alta estabilidad térmica (no se descomponen fácilmente al elevar la temperatura), alto calor específico (absorben gran cantidad de calor elevando muy poco su temperatura), alto poder disolvente (disuelven una amplia gama de moléculas orgánicas como plásticos, tintes, petróleo, incluso ADN y moléculas inorgánicas), frecuentemente son excelentes catalizadores y son fácilmente reciclables. A pesar de ser llamados “disolventes verdes”, por su volatilidad casi nula, es necesario tener en cuenta todo el proceso desde su síntesis hasta su reciclaje y disposición, debido a que actualmente para obtenerlos y reciclarlos se utilizan compuestos orgánicos volátiles o agua. Su impacto ambiental resultante depende de su proceso de producción, toxicidad y aplicación. La definición dada hasta ahora se basa únicamente en la temperatura de fusión (Sierra *et al.*, 2014).

Respecto a su composición química puede afirmarse, de forma general, que están compuestos por un catión orgánico siendo los más comunes los de tetraalquilamonio, tetraalquilfosfonio, N-alquilpiridina y N, N'-dialquilimidazolio; y un anión poliatómico entre los que destacan el hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis((trifluorometil)sulfonyl)imida, trifluoroacetato y triflato. Si se encuentran rutas limpias para su síntesis y disposición, los líquidos iónicos podrían representar una alternativa importante a varios problemas actuales de contaminación por disolventes comunes (Morales, 2013).

1.6.4 Fluidos supercríticos

Por encima de su presión y temperatura crítica, los compuestos se encuentran en una fase que no es líquida ni gaseosa, sino que comparten las propiedades de ambas, fluye como un gas y es capaz de disolver sustancias como un líquido. En estas condiciones los fluidos carecen de tensión superficial y viscosidad, son totalmente miscibles con los gases y no presentan limitaciones de transporte de masas. Muchos de ellos son inertes y no tóxicos, lo que permite clasificarlos como disolventes verdes; además, son relativamente baratos y sus propiedades son ajustables mediante variaciones de presión (Pérez, 2007).

El dióxido de carbono (CO_2) es el que ha encontrado mayor número de aplicaciones a nivel industrial, debido a que es relativamente fácil de obtener en grandes cantidades. Las aplicaciones más conocidas del dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) se encuentran en procesos de extracción. Así, se usa en la extracción de cafeína del café, en la extracción de aromas y fragancias de semillas y plantas, de grasas de las patatas fritas e incluso de aromas de los corchos del embotellado del vino (Pérez, 2007).

Por otro lado, el agua como disolvente en condiciones supercríticas tiene unas propiedades muy diferentes, su polaridad es similar a la de la acetona, por lo que es capaz de disolver sustancias orgánicas y sales, ocurriendo las reacciones en fase homogénea. El producto iónico disminuye, con lo cual cambian las propiedades ácido-base. Puede usarse como catalizador de reacciones ácido-base. En condiciones subcríticas, es posible usar el agua como disolvente de reacciones orgánicas. Las reacciones de hidrólisis funcionan con facilidad, y se usa, por ejemplo, en el reciclado del polietileno tereftalato (PET). También se usa para llevar a cabo reacciones de catálisis básica o de catálisis ácida sin necesidad de usar un catalizador. Si bien, el uso de fluidos supercríticos presenta ventajas, tiene el inconveniente del coste de las instalaciones y del coste energético necesario para su generación (Pérez, 2007).

1.7 Solventes Eutécticos Profundos

Los solventes eutécticos profundos pueden ser empleados para el pretratamiento del material lignocelulósico, a fin de remover la mayor cantidad de lignina posible y exponer la celulosa para su posterior sacarificación y fermentación. El término solventes eutécticos profundos (Deep Eutectic Solvents, por sus siglas en inglés DES) fue acuñado por Abbott *et al.*, (2003); son mezclas eutécticas líquidas que generalmente se forman simplemente calentando dos componentes (al menos uno como un sólido), que actúan como aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) y donantes de enlaces de hidrógeno (HBD), respectivamente. La palabra eutéctico deriva del griego *eutektos* y que significa fácilmente fusible. Este concepto en la síntesis de un DES, se relaciona con la máxima temperatura a la que puede producirse la mayor cristalización del solvente y soluto, también se define como la temperatura más baja a la cual puede fundir una mezcla de sólidos A y B con una composición fija (Shackelford, 2005; Tang *et al.*, 2017).

Un DES es una mezcla de dos o más componentes con un punto de congelación, fusión o de vaporización inferior al correspondiente a cada uno de los compuestos en estado puro. Esto ocurre en mezclas que poseen alta estabilidad en estado líquido, cuyos componentes son insolubles en estado sólido. Las sales de amonio cuaternario, como el cloruro de colina (ChCl) o betaína $((\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-)$, generalmente se emplean como HBA, mientras que las sales de metales, urea, ácidos carboxílicos y polioles se pueden usar como HBD. Los DES están emergiendo como una nueva familia de solventes verdes y llaman mucho la atención porque comparten la mayoría de las ventajas de los líquidos iónicos (IL) tradicionales, pero superan muchos de sus inconvenientes (Vidal, 2013; Tang *et al.*, 2017).

Los DES ahora son ampliamente reconocidos como una nueva clase de análogos de IL porque comparten muchas características y propiedades. Los términos DES e IL se han usado indistintamente en la literatura, aunque es necesario señalar que

en realidad son dos tipos diferentes de solventes. Aunque la mayoría de los DES están elaborados de ChCl como una especie iónica, no pueden considerarse como IL por dos razones: (1) no están completamente compuestos de especies iónicas, (2) pueden obtenerse de especies no iónicas. En comparación con los IL tradicionales, los DES derivados de ChCl reúnen ventajas tales como bajo precio y fácil preparación debido a que los DES se obtienen simplemente mezclando dos componentes, evitando así todos los problemas de purificación y eliminación de desechos que generalmente se encuentran con los IL y, la mayoría de los DES son biodegradables, biocompatibles y no tóxicos, lo que los incluye dentro de la química verde (Smith *et al.*, 2014).

Las Propiedades físico-químicas de los DES (densidad, viscosidad, índice de refracción, conductividad, tensión superficial, etc.) son muy similares a las de los IL comunes. Por esta razón en algunos estudios, los DES derivados de ChCl se han confundido y denominado familiarmente como "líquidos iónicos biocompatibles" o "líquidos iónicos biorenovables" (Zhang *et al.*, 2012).

Gracias a su baja huella ecológica y su atractivo precio, los DES ahora son cada vez más interesantes a nivel académico e industrial, por esto, el número de publicaciones dedicadas al uso de los DES está aumentando rápidamente en la literatura actual, en los últimos quince años el número de publicaciones ha crecido de manera exponencial, en el año 2017 se alcanzaron cerca de 750 publicaciones acerca de los DES, lo que demuestra aún más el atractivo de estos medios (Zhang *et al.*, 2012; Sattlewal *et al.*, 2018).

1.7.1 Interacciones de puentes de hidrógeno presentes en los DES

Existen diferentes teorías que explican la formación de estos líquidos eutécticos de bajo punto de fusión. La mayoría apoya el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los componentes de la mezcla. Los DES son, por tanto, el resultado de la fuerte interacción entre un donante de hidrógeno (HBD) y un aceptor de hidrógeno

(HBA), la Figura 1.2 representa esta interacción basadas en ChCl (Francisco *et al.*, 2013).

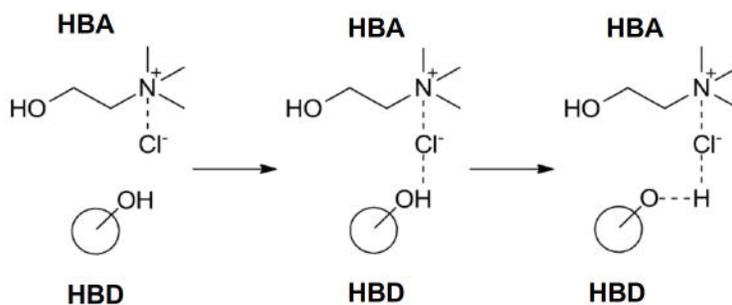


Figura 1.2 Interacciones de puente de hidrógeno presentes en las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión basadas en ChCl

Estas interacciones entre HBD y HBA favorecen el descenso de entropía de la transición de fase. La fuerza de los enlaces de hidrógeno está relacionada con la temperatura de transición de fase, la estabilidad y las propiedades como disolvente de la mezcla eutéctica. Así, existe una gran diversidad de combinaciones posibles de los materiales de partida lo que constituye una herramienta potencial para controlar las propiedades físicas y de fase de los DES, modulando la habilidad para disolver solutos de muy distinta naturaleza (Francisco *et al.*, 2013).

Abbott *et al.*, (2003), sugirieron interacciones de enlace de hidrógeno entre la urea y el ion cloruro de la sal de colina como la causa principal de la caída del punto de congelación de la mezcla. En general, cuanto mayor es la capacidad de enlace de hidrógeno de las contrapartes (el HBD y el anión de la sal), mayor es la disminución en el punto de congelación. Por lo tanto, la simetría del catión de la sal también influye en las tendencias en las temperaturas de transición. En este sentido, uno de los componentes más utilizados para la generación de los DES es el anteriormente mencionado ChCl (Francisco *et al.*, 2013).

1.7.2 Cloruro de Colina

El cloruro de trimetilamonio (2-hidroxiethyl) o comúnmente llamado cloruro de colina (peso molecular 139.62 g/mol y punto de fusión de 302 °C) es una sal cuaternaria de amonio muy barata, biorenovable, biodegradable y no tóxica, que es un nutriente esencial agrupado en los complejos de la vitamina B y que puede ser obtenida a partir de biomasa. Es compatible con una multitud de procesos metabólicos y sirve como un suplemento dietético de alimentos para animales.

La colina se produce normalmente por la reacción de trimetilamina, óxido de etileno y agua. Su cloruro puede ser producido por la reacción de trimetilamina con clorohidrina. Si bien existen otras vías de síntesis, el proceso industrial dominante es la reacción del óxido de etileno con trimetilamina y agua, o un ácido si se desea una de sus sales, por ejemplo, HCl, para obtener ChCl. El ChCl en combinación con una especie donante de hidrógeno (que ha de cumplir las mismas características de biorenovabilidad, precio y toxicidad) como urea, ácidos carboxílicos renovables (oxálico, succínico, cítrico, láctico y aminoácidos) o polioles naturales (glicerol y carbohidratos), es capaz de formar mezclas eutécticas biorenovables y no tóxicas con puntos de fusión por debajo de los 30 °C (Atwater, 2001; Vidal, 2013).

1.7.3 Sustancias aceptores (HBA) y donadores de hidrógeno (HBD)

Existen diferentes combinaciones posibles de las sustancias de partida para la formación de lo DES, el ChCl como HBA, sin embargo, es posible formar DES con otras sustancias HBA. El Anexo A1 presenta un listado de sustancias (HBA y HBD) documentadas en la síntesis de distintos DES.

1.8 Aplicaciones de los Solventes Eutécticos Profundos

1.8.1 Procesamiento de metales

La industria tradicional de la electrodeposición, electropulido y extracción de metales y el procesamiento de óxidos metálicos se basa en sistemas acuosos

debido a la alta solubilidad de los electrolitos y las sales metálicas en el agua, lo que da como resultado soluciones altamente conductoras. Sin embargo, la tecnología no es ideal, el agua tiene un potencial relativamente estrecho y, por lo tanto, la deposición de algunos metales se ve obstaculizada por una corriente deficiente y / o la fragilización por hidrógeno del sustrato. La industria enfrenta más problemas con la legislación debido a la limitación de las aplicaciones de cromo (Cr) acuoso, y el sector de las placas de Cobalto (Co) y Níquel (Ni) se ve cada vez más afectado por los problemas de toxicidad y el aumento del precio de los metales.

Actualmente, las aplicaciones principales para los DES implican la incorporación de iones metálicos en soluciones para la deposición, la disolución o el procesamiento de metales. Las ventajas clave de usar DES sobre los electrolitos acuosos son la alta solubilidad de las sales metálicas, la ausencia de agua y la alta conductividad en comparación con los solventes no acuosos. El potencial de los DES es mayor que el de las soluciones acuosas, pero menor que el de algunos IL con aniones discretos, como BF_4^- $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$. Dado que los DES son comparativamente más baratos que los IL convencionales y son mucho más fáciles de producir en lotes a gran escala, la ampliación y comercialización de DES, los procesos basados en el acabado de metales y las industrias de extracción de metales han sido, y siguen siendo tema de discusión (Smith *et al.*, 2014).

1.8.2 Síntesis química

El control legislativo está fomentando la adopción de metodologías más ecológicas en la síntesis química, y se ha anunciado a los IL como un reemplazo de algunos solventes orgánicos más volátiles. Sin embargo, las credenciales "verdes" de los IL y los DES se siguen debatiendo debido a la escasez de estudios toxicológicos. Los DES se han propuesto recientemente como solventes alternativos benignos para la síntesis y se han considerado en revisiones sobre el tema; sin embargo, la posibilidad de usar los DES como solventes para la síntesis no ha recibido tanta atención en la investigación como la utilización de los DES como solventes

alternativos para aplicaciones en metales. Para que esta área de investigación florezca, es necesario realizar investigaciones más substanciales sobre las aplicaciones ambientales a largo plazo del uso de los DES para realizar estos procedimientos sintéticos. Se ha iniciado el desarrollo de los DES basados en ChCl y ZnCl₂ como alternativas asequibles y fácilmente disponibles en comparación a la síntesis en IL (Smith *et al.*, 2014).

1.8.3 Adsorción de gases

La adsorción y el secuestro de CO₂, son con el objetivo de reducir el calentamiento global. Se hacen grandes esfuerzos en desarrollar fuentes de energía que no emitan CO₂, sin embargo, estos no se encuentran en la etapa en la que se pueden implementar a gran escala. El diseño de un proceso sintético sostenible para la preparación de absorbentes sólidos reciclables que muestren capacidad mejorada de absorción es vital.

El uso de DES para preparar estos materiales parece prometedor en términos de eficiencia y sostenibilidad. Se ha utilizado la síntesis ionotérmica para producir estructuras porosas adecuadas para la captura de CO₂. Hay información sobre la síntesis de una serie de estructuras metálicas y orgánicas, algunas con capacidades prometedoras de almacenamiento de gas.

El resorcinol: 3-hidroxipiridina: cloruro de colina se ha utilizado como medio líquido, agente que dirige la estructura y la fuente de carbono y nitrógeno para producir carbones jerárquicos dopados con nitrógeno. Se ha informado la alta eficacia catalítica de DES ChCl: urea, soportada en tamices moleculares para la fijación química de CO₂ a carbonatos cíclicos, este nuevo catalizador biodegradable y verde es muy activo y selectivo y tiene el potencial para sintetizar carbonatos cíclicos del CO₂ y epóxidos. Después de la reacción, el catalizador sólido y los productos se pueden separar fácilmente porque el DES es insoluble en los productos y el catalizador es reutilizable. Se han reportado nano hojas de carbono porosas

sintetizadas en DES con espesores controlables que pueden separar el CO₂ del N₂. El ChCl: ácido láctico se ha investigado como solvente para capturar el CO₂. Esta mezcla es fácilmente sintonizable; sin embargo, la solubilidad del CO₂ es más baja que en otros DES estudiados. El SO₂ es uno de los principales contaminantes del aire emitidos por la quema de combustibles fósiles, se ha encontrado que ChCl: glicerol adsorbe rápidamente SO₂, con una liberación fácil y rápida (Smith *et al.*, 2014).

1.8.4 Biotransformaciones

Una biotransformación es una modificación química hecha por un organismo o enzima en un compuesto químico, y es vital para la supervivencia, debido a que le permite al cuerpo humano transformar los nutrientes absorbidos (alimentos, oxígeno, etc.) en sustancias necesarias para funcionar. El cuerpo humano también utiliza la biotransformación o el metabolismo para convertir un fármaco absorbido en el agente activo o para convertir las toxinas en el cuerpo en sustancias menos dañinas que pueden ser excretadas. Tradicionalmente, las biotransformaciones se han realizado en disolventes acuosos, sin embargo, también se ha intentado la biocatálisis en solventes orgánicos polares como acetona, metanol o dimetilsulfóxido (DMSO), aunque los solventes orgánicos polares desnaturalizan las enzimas regularmente. Reemplazar los disolventes orgánicos polares con DES permite que los sustratos se disuelvan sin desactivar las enzimas. Los DES se pueden usar de tres maneras diferentes: como un codisolvente con agua para ayudar a que los sustratos no polares se disuelvan en solución acuosa, como una segunda fase en una mezcla de agua-DES, o como un reemplazo no volátil para un disolvente no acuoso. Los DES proponen ser una alternativa técnica y económicamente viable a los solventes orgánicos. Las reacciones estudiadas hasta ahora han involucrado procesos catalizados por lipasa, como la transesterificación, aminólisis, hidrólisis de epóxidos, nalkilación de aminas primarias aromáticas y reacciones de condensación de Knoevenagel. En general, han mostrado tasas y

enantioselectividades comparables o superiores a las reportadas para los solventes orgánicos convencionales (Smith *et al.*, 2014).

1.8.5 Purificación y fabricación de biodiesel

El proceso de fabricación de biodiesel es similar, independientemente del producto natural que se utilice, como materia prima de aceite: el aceite de triglicérido extraído de plantas se transesterifica en ésteres de alquilo utilizando un catalizador para producir 3 mol de éster y 1 mol de glicerol por mol de triglicérido utilizado. El glicerol es un subproducto no deseado y debe eliminarse antes de que se pueda usar el biodiesel como combustible, ya que la viscosidad del glicerol presente impide el sistema de inyección a alta presión de un moderno diésel. El principal obstáculo para el uso generalizado del biodiesel es que es más barato perforar y refinar aceite diésel mineral que cultivar, extraer, transesterificar y purificar el biodiesel utilizando los métodos convencionales de adsorción sobre reactores de membrana de sílice o la adición de cal y ácido fosfórico. Para resolver esto, varios grupos de investigación han estado trabajando en nuevos métodos para extraer glicerol de biodiesel utilizando DES. Se ha reportado la extracción exitosa del exceso de glicerol del biodiesel en presencia de KOH usando una mezcla básica de Lewis con una relación de sal: 2 glicerol usando un DES (ChCl: glicerol, 1: 1). Posteriormente se recupera una porción del 25% del ChCl de la mezcla mediante la adición de 1-butanol como un codisolvente líquido. También se encontró que el ChCl y el etileno glicol o el 2,2,2-trifluoracetamida tienen éxito en la extracción de glicerol a partir de biodiesel (Smith *et al.*, 2014).

1.9 Pretratamiento de residuos lignocelulósicos

Debido a la gran solubilidad de la lignina en varios DES, es inevitable la continua investigación en pretratamientos de los distintos materiales lignocelulósicos con una amplia variedad de los DES, la Tabla 1.4 muestra una comparativa entre los

pretratamientos más utilizados para el material lignocelulósico, los cuales son los ácidos y alcalinos frente a los DES (Tang *et al.*, 2017).

Tabla 1.4 Comparativa entre pretratamientos ácidos, alcalinos y DES

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Hidrólisis ácida	Ácidos como H ₂ SO ₄ y HCl son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere alta temperatura • Bajo pH • Condiciones de operación corrosivas • Ácidos tóxicos y peligrosos • El ácido concentrado debe recuperarse para que el proceso sea económicamente viable • Pueden producirse diferentes inhibidores químicos • Requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación
Hidrólisis alcalina	La adición de bases como el NaOH permite la disolución de la lignina causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos	<ul style="list-style-type: none"> • Altos costos • No competitiva a gran escala
DES	<ul style="list-style-type: none"> • Se pueden preparar mediante procedimientos económicos • No hay consumo energético de purificación y/o la eliminación de desechos • Se pueden usar compuestos de baja toxicidad o no tóxicos para prepararlos • Muchos DES y sus componentes tienen una biocompatibilidad y biodegradabilidad superior; por lo tanto, las enzimas son estables y activas en presencia de un DES 	Relativamente poco conocimiento en pretratamientos de biomasa

Adaptado de Sun y Cheng, (2002); Tang *et al.*, (2017)

Si se analizan las características y ventajas mencionadas de los DES, en general se puede argumentar una amplia justificación para elegir la implementación de estos solventes como pretratamiento químico del material lignocelulósico en variación a los pretratamientos habituales ácidos y alcalinos en la obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósico (Sun y Cheng, 2002; Antonio *et al.*, 2011; Jönsson y Martín, 2015).

1.10 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo mediante enzimas celulasas específicas, los productos de la hidrólisis son generalmente azúcares reductores, incluida la glucosa. El costo de la hidrólisis enzimática es bajo en comparación con la hidrólisis ácida o alcalina, generalmente se realiza en condiciones moderadas (pH 4.5 – 5.5 y temperatura de 45 – 55 °C) y no hay problemas relacionados con la corrosión. Tanto las bacterias como los hongos pueden producir celulasas para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Zhang, 2010).

Las celulasas suelen ser una mezcla de varias enzimas, considerándose principalmente al menos tres grupos en el proceso de hidrólisis: (1) endoglucanasa que ataca las regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa, creando extremos de cadena libres; (2) exoglucanasa o celobiohidrolasa que degrada aún más la molécula al eliminar las unidades de celobiosa de los extremos de cadena libres; (3) β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa para producir glucosa. La actividad de la celulasa disminuye durante la hidrólisis, la adsorción irreversible de celulasa en celulosa es parcialmente responsable de esta desactivación. Las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa, que es un inhibidor de la actividad de la celulasa. Una mezcla de hemicelulasas o pectinasas con celulasas ha mostrado un aumento significativo en el grado de conversión de celulosa. Las celulasas se pueden recuperar del líquido sobrenadante o los residuos sólidos, el reciclaje de enzimas puede aumentar efectivamente la velocidad y el rendimiento de la hidrólisis y disminuir el costo de la enzima (Sun y Cheng, 2002).

1.11 Fermentación por lote de los azúcares liberados

Una fermentación es el proceso para la producción de un producto por medio del cultivo en masa de un microorganismo. El producto puede ser la propia célula denominada biomasa o un producto específico derivado del crecimiento del microorganismo (Pumphrey y Julien, 1996).

Una fermentación por lote o discontinua puede considerarse un sistema cerrado. En el momento $t = 0$, la solución nutritiva esterilizada en el fermentador se inocula con microorganismos y se permite la incubación. En el curso de toda la fermentación, no se agrega nada, excepto oxígeno (en el caso de microorganismos aeróbicos), un agente antiespumante y ácido o base para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolito generalmente cambian constantemente como resultado del metabolismo de las células. Después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismos y el cultivo en condiciones fisiológicas, se observan cuatro fases típicas de crecimiento como se indica en la Figura 1.3 (Pumphrey y Julien, 1996).

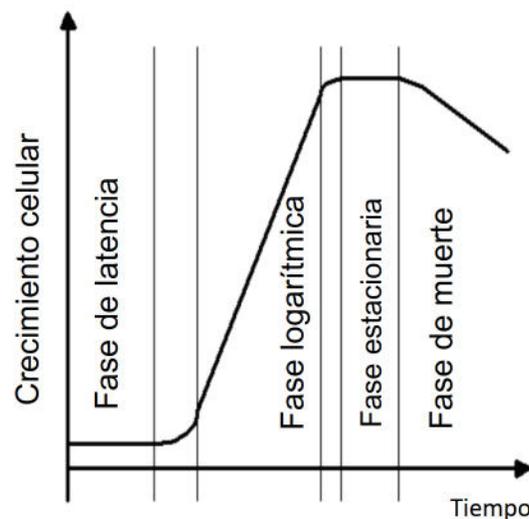


Figura 1.3 Curva de crecimiento de cultivo bacteriano

Fase de latencia. En esta fase hay equilibrio fisicoquímico entre microorganismos y medio ambiente tras la inoculación; solo hay adaptación del microorganismo a las condiciones de cultivo con nula velocidad de crecimiento (Pumphrey y Julien, 1996).

Fase logarítmica. Al final de la fase de latencia, las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. El crecimiento de la masa celular ahora se puede describir cuantitativamente como una duplicación del número de células por unidad de tiempo para bacterias y levaduras, o una duplicación de la biomasa por unidad de tiempo para organismos filamentosos como hongos. Al trazar el número de células o biomasa en función del tiempo en un gráfico semi-logarítmico, se obtiene una línea recta, de ahí el término fase logarítmica. Aunque las células alteran el medio a través de la absorción de sustratos y la excreción de productos metabólicos, la tasa de crecimiento permanece constante durante esta fase. La tasa de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato siempre que haya un exceso de sustrato (Pumphrey y Julien, 1996).

Fase estacionaria. Tan pronto como el sustrato se metaboliza o se forman sustancias tóxicas, el crecimiento disminuye o se detiene por completo. La biomasa aumenta solo gradualmente o permanece constante durante esta fase estacionaria, aunque la composición de las células puede cambiar. Debido a la lisis, se liberan nuevos sustratos que luego pueden servir como fuentes de energía para el lento crecimiento de las células aún sobrevivientes. Los diversos metabolitos formados en la fase estacionaria son a menudo de gran interés biotecnológico (Pumphrey y Julien, 1996).

Fase de muerte. En esta fase se agotan las reservas de energía de las células. Se puede obtener una línea recta cuando se hace una gráfica semi-logarítmica de células sobrevivientes en función del tiempo, lo que indica que las células se están muriendo a una tasa exponencial. El período de tiempo entre la fase estacionaria y la fase de muerte depende del microorganismo y el proceso utilizado. La

fermentación generalmente se interrumpe al final de la fase logarítmica o antes de que comience la fase de muerte (Pumphrey y Julien, 1996).

1.12 Conversión de los azúcares fermentables en bioetanol

Las levaduras biológicas son microorganismos multicelulares o eucariotas clasificados bajo el reino de los hongos. Varios tipos de cepas de levadura están disponibles en el mercado mundial. Por lo general, las levaduras se utilizan en los procesos de fermentación tradicionales desde la antigüedad para producir diferentes tipos de alcohol. Se han utilizado varias especies de *Saccharomyces* en los procesos de fermentación de levadura, debido a su eficacia para la conversión de azúcares complejos en etanol y otras sustancias. Los biólogos afirman que, entre los muchos tipos de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* es la más eficiente levadura empleada en una amplia variedad de experimentos (Hossain *et al.*, 2017).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fermenta la glucosa, el azúcar dominante en todos los hidrolizados de plantas, a tasas altas incluso en condiciones anaeróbicas. La tasa de producción de etanol anaeróbico en medios definidos es tan alta como $30 \text{ mmol g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La *Saccharomyces cerevisiae* contiene un sistema elaborado para el transporte de hexosa. Los 32 miembros de la familia HXT (transportador de hexosa) en *S. cerevisiae* difieren con respecto a la regulación transcripcional y postranscripcional, la especificidad del sustrato y la afinidad por la glucosa. Sin embargo, como todos ellos transportan la glucosa a través de la difusión facilitada, la captación de glucosa solo requiere un gradiente de concentración a través de la membrana plasmática. Después de la captación, la disimilación de la glucosa procede a través de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof (Figura 1.4). Esta vía oxida la glucosa a dos piruvato, lo que resulta en la formación neta de dos ATP por glucosa (Van Maris *et al.*, 2006).

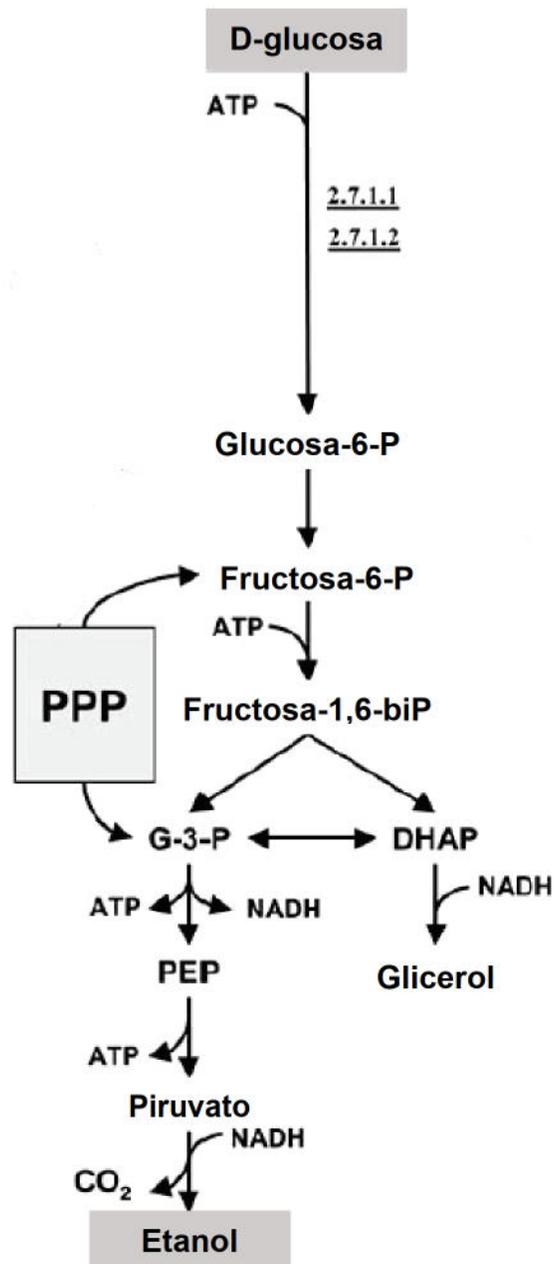


Figura 1.4 Catabolismo de la D-Glucosa en *S. cerevisiae*

Los números subrayados representan enzimas / etapas presentes en el metabolismo de *S. cerevisiae*. Catabolismo de la glucosa: 2.7.1.1, hexocinasa (HXK1 / HXK2); 2.7.1.2, glucocinasa (GLK1); G-3-P, gliceraldeído-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; PEP, fosfo-enol piruvato; PPP, vía fosfato de pentosa (Van Maris *et al.*, 2006).

1.12.1 Estequiometría y cinética en cultivo por lote

El seguimiento de la fermentación se evalúa en función de la cinética y estequiometría del proceso (rendimiento, productividad y velocidades tanto globales como específicas); estos parámetros son empleados para seleccionar las mejores condiciones del proceso y para ello se emplean las ecuaciones presentadas en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5 Ecuaciones para el cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos

RENDIMIENTOS Y PRODUCTIVIDAD		
VARIABLE	ECUACIÓN	No.
Rendimiento de biomasa $Y_{X/S}$ (g de biomasa / g de sustrato)	$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$	(1.1)
Rendimiento de producto $Y_{P/S}$ (g de producto / g de sustrato)	$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$	(1.2)
Productividad Volumétrica Q (g de producto / L*h)	$Q = \frac{P_f}{t_f}$	(1.3)
VELOCIDADES GLOBALES		
Producción de biomasa r_x (g / L*h)	$r_x = \frac{dx}{dt}$	(1.4)
Consumo de sustrato r_s (g / L*h)	$r_s = \frac{ds}{dt}$	(1.5)
Producción de producto r_p (g / L*h)	$r_p = \frac{dp}{dt}$	(1.6)
VELOCIDADES ESPECÍFICAS		
Crecimiento de microorganismos μ (h ⁻¹)	$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$	(1.7)
Consumo de sustrato V_s (g / g*h)	$V_s = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt}$	(1.8)
Generación de producto V_p (g / g*h)	$V_p = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt}$	(1.9)

Tomado y adaptado de Doran, 1995 y Ertola *et al.*, 2006

1.13 Diseño experimental

El diseño experimental es fundamental en la búsqueda de las mejores condiciones operativas porque arroja datos valiosos para establecer los parámetros que proporcionan los mayores rendimientos de etanol. El diseño del cuadrado grecolatino (Tabla 1.6) puede emplearse para controlar sistemáticamente fuentes extrañas de variabilidad. Se usa para hacer un análisis por bloques en distintas direcciones (Montgomery, 2013).

Tabla 1.6 Cuadro grecolatino codificado

Factor	Factor			
	1	2	3	4
1	A α	B β	C γ	D δ
2	B δ	A γ	D β	C α
3	C β	D α	A δ	B γ
4	D γ	C δ	B α	A β

El diseño permite analizar cuatro factores (renglón, columna, letra griega y letra latina), cada uno con sus respectivos niveles. El factor representado por las letras griegas es ortogonal a los renglones, las columnas y los tratamientos de la letra latina porque cada letra griega ocurre una sola vez en cada renglón, en cada columna y para cada letra latina (Montgomery, 2013).

Por otra parte, un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que ayudan a entender y optimizar la respuesta. Hay dos tipos principales de diseños de superficie de respuesta: Diseños centrales compuestos (DCC) y Diseños de Box-Behnken. El DCC es el experimento diseñado de superficie de respuesta que más se utiliza, es un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura, son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y

centrales, la Figura 1.5 muestra la estructura de un DCC de dos y tres factores (Montgomery, 2013).

Por otro lado, Los diseños de Box-Behnken por lo general tienen menos puntos de diseño que los DCC y, por consiguiente, resulta menos costoso ejecutarlos con el mismo número de factores, siempre tienen 3 niveles por factor, nunca incluyen corridas donde todos los factores estén en su valor extremo, como por ejemplo todos los valores de configuración bajos, son útiles si se conoce la zona de operación segura del proceso, no tienen puntos axiales, por lo que se puede estar seguro de que todos los puntos del diseño se encuentran dentro de una zona de operación segura, también aseguran que no se establezcan todos los factores en sus niveles altos al mismo tiempo.

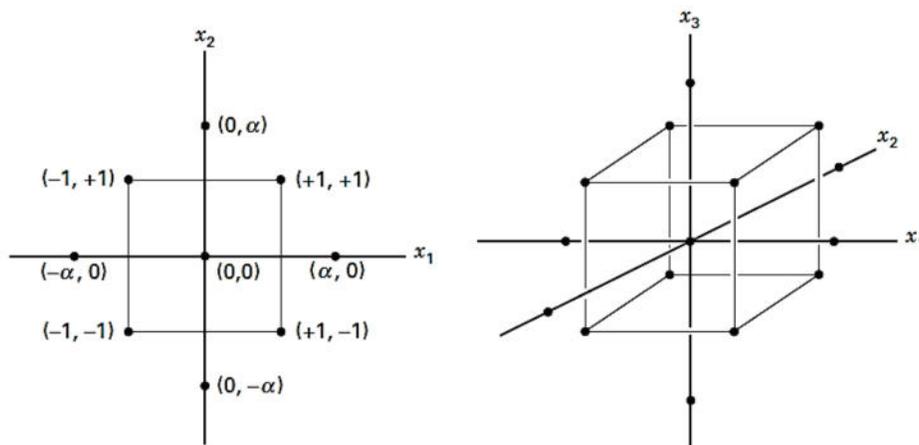


Figura 1.5 Diseño Central Compuesto para 2 y 3 factores

La Figura 1.6, muestra un diseño de Box-Behnken de tres factores. Los puntos del diagrama representan las corridas experimentales que se realizan (Montgomery, 2013).

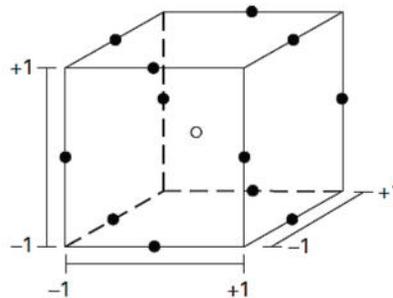


Figura 1.6 Diseño de Box-Behnken de tres factores

1.13.1 Análisis de diseños de superficie de respuesta

En un diseño de superficie de respuesta, siempre se desean determinar los niveles de X_1, X_2, \dots, X_n que maximizan o minimizan la respuesta, para ello, se necesita identificar el punto estacionario. Dicho punto podría representar un punto de respuesta máxima, un punto de respuesta mínima, o bien, un punto de silla. El punto estacionario se obtiene a través de la ecuación 1.10 (Montgomery, 2013).

$$X_s = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (1.10)$$

Donde b es la matriz ($n \times 1$) de coeficientes de regresión de primer orden, y B es una matriz simétrica ($n \times n$) cuya diagonal principal está formada por los coeficientes de los términos cuadráticos puros, mientras que los elementos fuera de esta diagonal corresponden a un medio del valor de los coeficientes de las interacciones. Una vez que el punto estacionario X_s es encontrado, se puede determinar la respuesta predicha en dicho punto mediante la ecuación 1.11 (Montgomery, 2013).

$$\hat{y}_0 = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2} X_s' b \quad (1.11)$$

Donde $\hat{\beta}_0$ es el coeficiente de regresión codificado del diseño experimental.

Por otra parte, también es necesario caracterizar el tipo de superficie de respuesta que hay en los alrededores del punto estacionario; la forma más directa de hacer esto es a través del análisis canónico. La ventaja de la ecuación canónica (ecuación 1.12), es que proporciona información a simple vista sobre el tipo de superficie que se está observando y sobre su forma. Si todos los valores de λ_i tienen signo positivo, entonces X_s es un punto de respuesta mínima; si todos los valores de λ_i tienen signo negativo, entonces X_s es un punto de respuesta máxima; y si los valores de λ_i tienen signos distintos entre sí, entonces X_s es un punto de silla (Montgomery, 2013).

$$\hat{y} = \hat{y}_0 \pm \lambda_1 w_1^2 \pm \lambda_2 w_2^2 \pm \dots \pm \lambda_n w_n^2 \quad (1.12)$$

donde las w_i son las variables independientes transformadas y las λ_i son los valores propios, también llamados, raíces características, autovalores o eigenvalores de la matriz \mathbf{B} .

1.14 Antecedentes

Diversas investigaciones se han hecho en la obtención de bioetanol a partir de desechos lignocelulósicos agroindustriales y otras fuentes, así como el estudio de la solubilidad de la lignina, hemicelulosa y celulosa en distintos solventes. Son estas investigaciones las que aportan soporte a esta tesis, si bien, el empleo de los DES específicamente sobre residuos y rastrojo de piña aún no se ha reportado, es una oportunidad de investigar y explorar las características de estos nuevos solventes sobre dichos residuos disponibles en una cantidad considerable en el estado de Veracruz.

Francisco *et al.*, (2014) estudiaron la solubilidad de la lignina al 96 %, celulosa al 90 % y almidón puro con 26 distintos DES (como HBA emplearon alanina, betaína, ChCl, glicina, histidina, prolina y Ác. nicotínico y como HBD Ác. láctico, Ác. málico y Ác. oxálico anhidro y dihidratado). Varias combinaciones seleccionadas mostraron una solubilidad de lignina de 11.82 - 14.9 % del peso inicial respectivo, y muy baja o despreciable solubilidad de celulosa con hasta 0.78 % del peso inicial. Por lo tanto, las selectividades para la separación de lignina / celulosa son muy altas. Las mezclas de Ác. láctico:ChCl no mostraron solubilidad de la celulosa, pero la solubilidad de la lignina aumentó hasta 7.27 % más del peso inicial con la proporción de ácido. Para la serie que contuvo Ác. málico:prolina, se encontraron las solubilidades más altas para el almidón de hasta 5.9 % del peso y para la celulosa de hasta 0.78 % del peso, esto, en comparación con los otros pares estudiados. También, para el DES Ác. málico:prolina, se demostró que las solubilidades

aumentaban con la proporción de prolina, siendo para el almidón de 0 – 5.9 % del peso y para la celulosa de 0 – 0.78 % de peso.

Sánchez *et al.*, (2014) deshidrataron corona, cáscara y corazón de la piña hasta que el contenido de humedad fue inferior al 10% medida a 60 °C. Los carbohidratos se determinaron como extracto libre de nitrógeno (NFE), emplearon el método para la determinación del contenido de fibra detergente neutra (NDF) como lo describió Van Soest *et al.*, (1991) para cuantificar el contenido de hemicelulosa y utilizaron este residuo de este análisis para determinar el contenido de celulosa y lignina llamada fibra detergente ácida (ADF), utilizando el método 973.18. Los resultados obtenidos fueron para la corona 45.53 ± 1.17 de celulosa, 21.88 ± 0.22 de hemicelulosa y 13.88 ± 1.70 de lignina, para la cáscara 40.55 ± 1.02 de celulosa, 28.69 ± 0.35 de hemicelulosa y 10.01 ± 0.38 de lignina, por último, para el corazón 24.53 ± 1.68 de celulosa, 28.53 ± 1.37 de hemicelulosa y 5.78 ± 0.429 de lignina.

Tropea *et al.*, (2014) caracterizaron la corona, la cáscara, pulpa y el núcleo de la piña. Para la fermentación emplearon la cepa *S. cerevisiae* NCYC 2826. Obtuvieron azúcares de las muestras de alcohol insoluble residual (AIR) mediante hidrólisis de Saeman por dispersión de muestra en H₂SO₄ al 72% durante 3 h a temperatura ambiente, seguida de hidrólisis en H₂SO₄ 1 M durante 1 h a 100 °C. Probaron y compararon tres modos diferentes de fermentación, fermentación directa, hidrólisis y fermentación separadas, y sacarificación y fermentación simultáneas de la biomasa, empleando un fermentador discontinuo de 2.5 L. Reportan su mayor rendimiento de etanol después de 30 h. de sacarificación y fermentación simultáneas, el rendimiento teórico se calculó como el rendimiento máximo de etanol en relación con la materia seca: 0.511 g de alcohol / 1.0 g de materia seca. El etanol se cuantificó mediante HPLC.

Pornpunyapat *et al.*, (2014) ocuparon como materia prima el jugo de cáscara de piña a pH inicial en 3.79, ajustándolo hasta pH de 5.00 con NaOH 0.1 M antes de la fermentación. Este último, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Fermentaron con contenidos de levadura de 1, 3 y 5% en peso del jugo y tiempos de 3, 5 y 7 días para investigar las condiciones en la producción de etanol. Emplearon la levadura *S. cerevisiae* cultivada en jugo de cáscara de piña e indican que la producción óptima de etanol fue para un contenido de levadura del 5% en peso y los tiempos de fermentación de 5 días alcanzando una producción de etanol de 9.08 g / L.

Kumar *et al.*, (2015) pretrataron paja de arroz con DES, separaron lignina y holocelulosa de alta calidad en un solo paso. El análisis cualitativo del extracto de DES mostró que la lignina extraída era de alta pureza (> 90%), y el análisis cuantitativo mostró que casi el 60 ± 5 %p/p de la lignina total se separó de la biomasa lignocelulósica. La adición de 5.0 %v/v de agua durante el tratamiento previo mejoró significativamente la extracción total de lignina, y casi 22 ± 3 % más de lignina se liberó de la biomasa residual al extracto de DES. Los estudios de difracción de rayos X de la paja de arroz no tratada y pretratada mostraron que la relación del índice de cristalinidad disminuyó marginalmente del 46.4 al 44.3%, lo que indica sutiles alteraciones estructurales en las regiones cristalina y amorfa de las fracciones celulósicas. El DES ácido láctico / ChCl en una relación molar de 5:1 extrajo lignina máxima de 68 ± 4 mg g⁻¹ de la biomasa de paja de arroz, y la subsecuente hidrólisis enzimática de la biomasa residual mostró niveles máximos de azúcar reductores 333 ± 11 mg g⁻¹ con una eficiencia de sacarificación de 36.0 ± 3.2 % en 24 h con 10% de carga de sólidos.

Procentese *et al.*, (2015) reportan su mejor rendimiento al pretratar la mazorca de maíz con ChCl:imidazol (3:7) a una temperatura relativamente baja (80 °C) con 92.3% de glucosa y 59.5% de xilosa y una remoción de 55% de lignina. Recuperaron 41 g de azúcares fermentables (27 g de glucosa y 14 g de xilosa) / 100 g de mazorca de maíz, lo que representa, 76% (86% y 63% respectivamente) de los carbohidratos inicialmente disponibles. Encontraron que las condiciones de pretratamiento producían concentraciones de compuestos inhibidores por debajo de los niveles de

una inhibición significativa de las cepas de levadura convencionales, eliminando la necesidad de estrategias de desintoxicación adicionales.

Jablonský *et al.*, (2015) pretrataron paja de trigo con seis diferentes DES compuestos de ChCl: urea (1:2), ácido malónico (1:1), láctico (1:9; 1:10), málico (1:1) y ácido oxálico (1:1). La biomasa pretratada la caracterizaron en términos de contenido de lignina, ceniza y holocelulosa. Encontraron que el DES compuesto de ChCl: ácido oxálico dihidratado, produce los mejores resultados de deslignificación (57.9%). Sin embargo, la aplicación del ácido oxálico está restringida debido a sus propiedades tóxicas y cáusticas. Por consiguiente, los DES combinados de ChCl / ácido láctico (1:10) o ChCl / ácido málico (1:1) son alternativas más adecuadas con una remoción de lignina de 29.1 y 21.6% respectivamente.

Xu *et al.*, (2015) emplearon con éxito el DES ChCl:ácido fórmico en rastrojo de maíz logrando remover 66.2% de hemicelulosa, 23.8% de lignina y alcanzando una concentración de glucosa de 17 (g/L) y un rendimiento del 99%. El hidrolizado lo utilizaron exitosamente en la fermentación de butanol por *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 logrando un título de butanol de 5.63 (g/L) con un rendimiento de 0.17 g g⁻¹ de azúcar total y una productividad de 0.12 g/L*h. Este estudio demuestra que el DES podría usarse como un método de tratamiento previo prometedor y biocompatible para la conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustible.

Gunny *et al.*, (2015) evaluaron la aplicabilidad de solventes eutécticos profundos para hidrólisis enzimática de cáscara de arroz, así como la actividad de celulasa en presencia de DES. Los DES que emplearon fueron a base de ChCl con glicerol, etilenglicol y ácido malónico en proporciones molares 1:2 para los tres casos. La celulasa mostró una mayor actividad y estabilidad mayor al 90% de su actividad original en presencia del DES ChCl:Glicerol y ChCl:Etilenglicol. Basaron sus conclusiones en la mayor producción de glucosa y el menor consumo de energía en comparación con el método de pretratamiento alcalino diluido, siendo el DES

ChCl:Glicerol y ChCl:Etilenglicol considerados como solventes potenciales para el pretratamiento. Entre los dos DES estudiados, se encontró que el sistema Etilenglicol-Celulosa fue relativamente eficiente ya que mostró el rendimiento cinético más alto de hasta 1 mM de glucosa y la tasa más alta de mejora de la glucosa hasta en 200% considerando el consumo energético (J).

Shinde y Patil, (2016) produjeron etanol mediante *Saccharomyces cerevisiae* utilizando cáscaras de naranja y cáscaras de plátano. Realizaron su estimación cuantitativa del etanol por el método de gravedad específica utilizando la Tabla AOAC. Obtuvieron porcentajes de alcohol tanto en condiciones aerobias como anaerobias, para la cáscara de naranja obtuvieron 18.62 y 37.71% respectivamente, y para la cáscara de banana 23.72 y 28.63% respectivamente. Se demuestra que puede producirse etanol a partir de cáscaras de naranja y cáscaras de plátano, ambos residuos agrícolas empleados como sustrato.

Soontornchaiboon *et al.*, (2016) produjeron etanol a partir de residuos de piña y la implementación de las sepas de *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 y *Candida shehatae* KCCM 11422. Obtuvieron un rendimiento óptimo de azúcar reductor total a 21.84 g /g de muestra seca después del pretratamiento con NaOH con asistencia ultrasónica durante 60 min y posteriormente mediante hidrólisis enzimática. Las composiciones de residuos de piña pretratados fueron $40.52 \pm 0.99\%$ de celulosa, $24.03 \pm 1.52\%$ de hemicelulosa y $2.27 \pm 0.23\%$ de lignina. La concentración máxima de etanol y el rendimiento de etanol después de 24 h de fermentación fueron 9.73 ± 0.15 (g/L) y 0.45 ± 0.01 g/g, respectivamente. Determinaron el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de acuerdo con el método de Van Soest *et al.*, (1991). La concentración de azúcar reductora total la determinaron mediante el método del DNS. La concentración de glucosa, xilosa y etanol se analizaron utilizando un detector de índice de refracción equipado con HPLC con una columna SUGARPAX.

Zhang *et al.*, (2016) obtuvieron sus mejores resultados con el DES glicerol:ChCl (2:1) removiendo el 71.3% de lignina presente en mazorca de maíz y un rendimiento de glucosa del 96.4%. La cantidad de ácido, la resistencia del ácido y la naturaleza de los aceptadores de enlaces de hidrógeno ejercieron una gran influencia en los resultados del tratamiento previo. La consistencia de los resultados de la caracterización indicó que los DES destruyeron las estructuras de la mazorca de maíz al eliminar la hemicelulosa y la lignina. Además, la temperatura y el tiempo óptimos de pretratamiento demostraron ser 24 h y 90 °C.

Zulkefli *et al.*, (2017) pretrataron tronco de palma aceitera (OPT) con DES. Todos los DES se prepararon mezclando sal de amonio y donador de enlaces de hidrógeno en una proporción de 1: 2 moles respectivamente. La mezcla se agitó y calentó a 80 °C durante 1 h o hasta que se hizo homogénea obteniendo un líquido incoloro. El 5% de fibra OPT en DES se preparó mezclando 0.5 g de fibra OPT en 9.5 g de DES. La mezcla se incubó en baño de aceite a 100 °C con agitación vigorosa durante 48 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó y se filtró para obtener la fibra sin disolver. La fibra no disuelta se lavó con etanol: agua destilada (1: 2) y la muestra se secó en horno a 50 °C hasta peso constante. El DES cloruro de etilamonio: etilenglicol eliminó exitosamente la lignina y la hemicelulosa en un 47 y 87% respectivamente. La eliminación de lignina y la conversión de hemicelulosa en celulosa facilitó la hidrólisis enzimática de la fibra pretratada, donde se obtuvo la mayor conversión (74%) en condiciones óptimas (50 FPU / g de Celluclast 1.5 L y 100 CBU / mL como la carga de enzimas, 15 mg / mL como la concentración de sustrato a 50 °C durante 24 h).

Procentese *et al.*, (2017) pretrataron hojas de la lechuga desechadas de la industria con el DES hecho de ChCl / glicerol en relación molar 1:2. Investigaron el tiempo de reacción a 3, 6 y 16 h. y la temperatura de operación a 80, 115 y 150 °C con una relación de líquido:sólido de 16:1 (g/g) para todas las corridas. Obtuvieron rendimientos enzimáticos de glucosa y xilosa de 94.9% y 75.0%, respectivamente, cuando la biomasa se trató previamente a 150 °C durante 16 h. Los azúcares

contenidos en el hidrolizado de biomasa se fermentaron en cultivos discontinuos de *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 792.

Fang *et al.*, (2017) pretrataron residuos de palmeras datileras con el DES ChCl / glicerol con una relación molar 1:2. Los sólidos se mezclaron con ChCl / glicerol y se trataron a 70 °C durante 6 h con una relación sólido / líquido de 1: 5 (g / g). Para la biomasa tratada solo con DES, los sólidos se mezclaron con ChCl / glicerol y se trataron directamente a 70 °C durante 6 h y 15 h. Demostraron que el tratamiento con ChCl / glicerol mejoró significativamente la extracción de lignina ($21.6 \pm 0.2\%$ y xilano $24.9 \pm 1.9\%$) y, en consecuencia, aumentó el rendimiento de glucosa en 1.7 veces en el proceso de hidrólisis cuando se realizó un tratamiento previo hidrotérmico de residuos de palma datilera. Especulan que las eliminaciones significativas de lignina y xilano son las responsables del aumento de la digestibilidad enzimática y no la modificación de la cristalinidad de celulosa mediante el tratamiento con DES observada en su estudio.

Oiwoh *et al.*, (2018) obtuvieron bioetanol a partir de la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) por lotes de las cáscaras de piña utilizando celulasa y *Saccharomyces cerevisiae*. Optimizaron la producción de bioetanol utilizando un diseño experimental de Box-Behnken (BBD) de tres factores. Las respuestas obtenidas del BBD se optimizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM). Cada uno de los factores a optimizar se codificó en tres niveles que dieron un rango para la carga de levadura (2-10% v / v), pH (2-6), concentración de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) (1-5 g / L). La concentración de bioetanol se eligió como la respuesta para la optimización del proceso utilizando RSM. Las condiciones óptimas obtenidas usando el modelo de regresión fueron pH 6, carga de levadura 8 mL y concentración de sulfato de amonio, 5 (g/L), lo que dio un valor óptimo de concentración de etanol de 5.82% (v/v).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general

En la Figura 2.1 se describe de manera general las etapas del proceso completo que se siguieron en esta investigación en la obtención de bioetanol a partir del aprovechamiento del material lignocelulósico proveniente del rastrojo y residuos de piña.

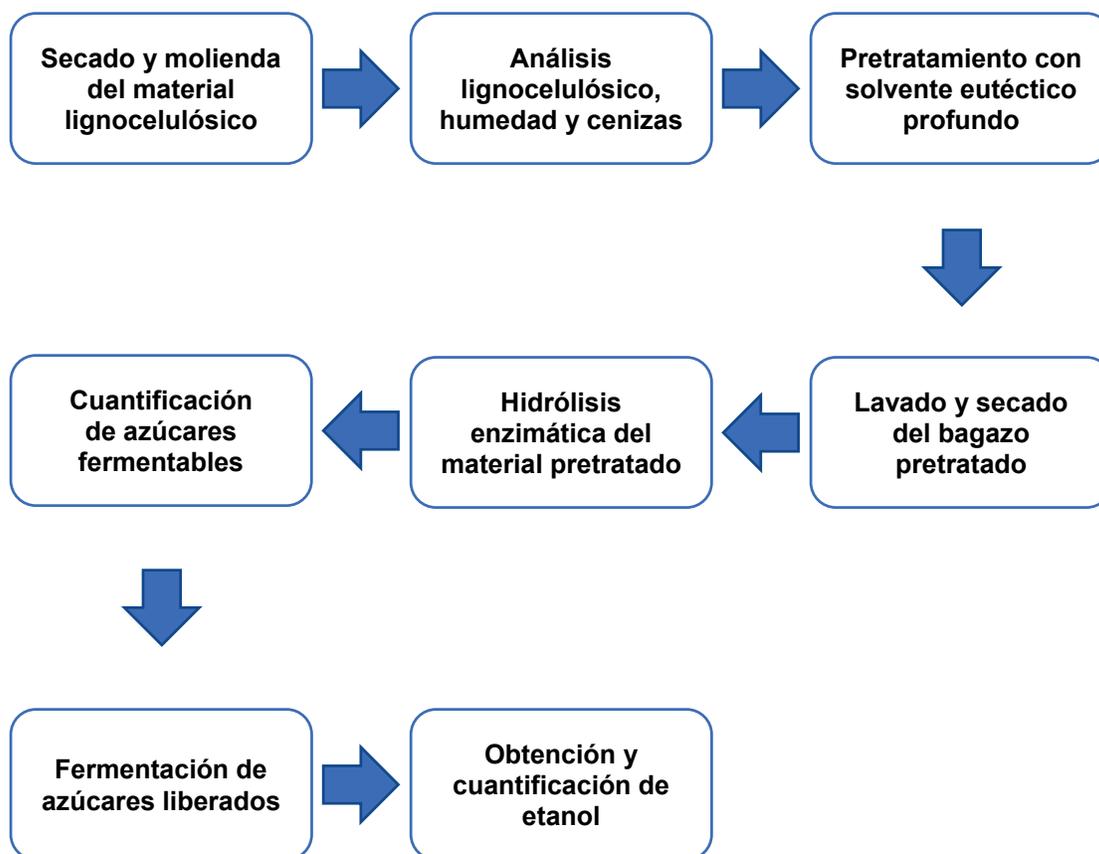


Figura 2.1 Proceso de obtención de etanol a partir de residuos de piña

2.2 Pretratamiento físico del material lignocelulósico, secado y molienda

Se emplearon residuos de dos tipos: 1) Corona, Cáscara y Corazón de piña comprada en las inmediaciones del mercado Zapata de la ciudad de Orizaba, Ver., (RP1) y 2) Rastrojo de piña, obtenido de un sembradío del estado de Veracruz (RP2). Todos los desechos fueron deshidratados en una estufa de secado Lab-line instrument Inc. Model 3471 a 80 °C durante 24 h, la humedad se cuantificó en una termobalanza ADAM AMB-50.

Al final del secado, los residuos fueron molidos para seleccionar un tamaño de partícula de entre 0.6 – 1.18 mm empleando tamices W. S. Tyler ASTM E-11 specification No. 30 y No. 16 respectivamente; con el objetivo de facilitar la manipulación del material e incrementando la superficie de contacto para el posterior pretratamiento químico con los DES.

2.3 Análisis lignocelulósico, humedad y cenizas

La determinación de la composición lignocelulósica se realizó mediante la técnica Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, establecida por el National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter *et al.*, 2008) (Anexo B) evaluando la composición porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Las ecuaciones 2.1 a 2.5 fueron empleadas para determinar el % de lignina presente en el material lignocelulósico:

$$ODW = \frac{\% \text{ total de sólidos} * \text{peso de la muestra}}{100} \quad (2.1)$$

$$\%AIR = \frac{\text{peso del crisol con AIR} - \text{peso del crisol}}{ODW} * 100 \quad (2.2)$$

$$\%AIL = \frac{(\text{peso crisol con AIR} - \text{peso crisol}) - (\text{peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol})}{ODW} * 100 \quad (2.3)$$

$$\%ASL = \frac{\text{absorbancia} * 0.08673 * \text{dilución-peso del crisol}}{25 * ODW * \text{longitud de celda}} * 100 \quad (2.4)$$

$$\%Lignina = \%AIL + \%ASL \quad (2.5)$$

Las ecuaciones 2.6 a 2.10 fueron empleadas para determinar el % de celulosa presente en el material lignocelulósico:

$$\text{Concentración glucosa} = \text{concentración glucosa HPLC} * \text{dilución} \quad (2.6)$$

$$\text{masa glucosa} = \frac{\text{concentración glucosa} * 87}{1000} \quad (2.7)$$

$$\text{masa corregida glucosa} = \text{masa glucosa} * 0.9 \quad (2.8)$$

$$\%Glucanos = \frac{\text{masa corregida glucosa} * 100}{ODW} \quad (2.9)$$

$$\%Celulosa = \frac{\%Glucanos * 100}{90} \quad (2.10)$$

Las ecuaciones 2.11 a 2.15 fueron empleadas para determinar el % de hemicelulosa presente en el material lignocelulósico:

$$\% Hemicelulosa = \frac{\% xilosa * 100}{70} \quad (2.11)$$

$$\% xilano = \frac{\text{masa corregida} * 100}{ODW} \quad (2.12)$$

$$\text{masa corregida xilosa} = \text{masa xilosa} * 0.88 \quad (2.13)$$

$$masa\ xilosa = \frac{concentración * 87}{1000} \quad (2.14)$$

$$Concentración = Concentración\ xilosa\ HPLC * dilución \quad (2.15)$$

Las cenizas fueron determinadas por diferencia entre el peso constante de los crisoles empleados y el peso final de los crisoles más cenizas después de 4 h en un horno de mufla FISHER SCIENTIFIC a 575 °C.

2.4 Preparación de los solventes eutécticos profundos (DES)

Los DES fueron preparados considerando que el aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) fue el Cloruro de colina (ChCl) ≥99% USP 32 Standard. Como donantes de enlaces de hidrógeno (HBD) se consideraron cuatro diferentes reactivos, Ácido Láctico (C₃H₆O₃) al 85%, Ácido Fórmico (CH₂O₂) al 88%, Glicerol Anhidro (C₃H₈O₃) al 99.9% y Etilenglicol (C₂H₆O₂) al 99.9%, todos J.T. Baker.

Para conformar cada DES, es necesario considerar: los pesos moleculares, las densidades y sus respectivas purezas (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Características físicas de los reactivos para la síntesis de los DES

Reactivo	Peso Molecular (g/mol)	Densidad (g/mL)	Pureza (%)
Cloruro de Colina (C ₅ H ₁₄ ClNO)	139.62	N/A	99
Ácido Láctico (C ₃ H ₆ O ₃)	90.08	1.20	85
Ácido Fórmico (CH ₂ O ₂)	46.03	1.22	88
Glicerol Anhidro (C ₃ H ₈ O ₃)	92.09	1.26	99.9
Etilenglicol (C ₂ H ₆ O ₂)	62.07	1.11	99.9

Las mezclas de los DES fueron preparadas en relaciones molares, ChCl:C₃H₆O₃ (1:2), ChCl:CH₂O₂ (1:4), ChCl:C₃H₈O₃ (1:2) y ChCl:C₂H₆O₂ (1:3), conforme a la

Tabla 2.2. Se tomó el volumen correspondiente de cada uno de los HBD, mientras que para el ChCl se pesó un mol para conformar cada DES.

Tabla 2.2 Relaciones para formar los DES en pesos moleculares (g/mol)

ChCl:C₃H₆O₃	ChCl:CH₂O₂	ChCl:C₃H₈O₃	ChCl:C₂H₆O₂
140 : 180	140 : 184	140 : 184	140 : 186

El volumen de cada HBD se mantuvo en calentamiento a 90 °C y agitación de 250 rpm en una parrilla eléctrica con agitación magnética mientras se añadía el ChCl, durante 60 min o hasta alcanzar un líquido transparente uniforme sin pasos subsecuentes de purificación, los DES se dejaron enfriar en un desecador hasta ser usados directamente en el material lignocelulósico.

2.5 Pretratamiento químico del material lignocelulósico RP1 con DES

Se empleó un diseño experimental de Cuadro Greco-Latino (CGL), sobre los RP1, donde las letras latinas corresponden a los niveles de temperatura (°C) y las letras griegas al tiempo (h). Las variables analizadas (Tabla 2.3) fueron, tipo de DES (ChCl:C₃H₈O₃, ChCl:CH₂O₂, ChCl:C₃H₆O₃, ChCl:C₂H₆O₂), temperatura (70, 80, 90 y 100 °C), tiempo (10, 14, 18 y 22 h) y RSL (1:15, 1:18 y 1:21 y 1:24 g/g). Para la RSL la muestra de sólido fue de 4 g y para cada DES en cada RSL fue de 60, 72, 84 y 96 g respectivamente, la variable de respuesta después del pretratamiento fue el % de celulosa disponible.

Tabla 2.3 CGL decodificado

Variables Decodificadas				
RSL (g/g)	Solvente			
	ChCl:C ₃ H ₈ O ₃	ChCl:CH ₂ O ₂	ChCl:C ₃ H ₆ O ₃	ChCl:C ₂ H ₆ O ₂
1 : 15	70 (10)	80 (14)	90 (18)	100 (22)
1 : 18	80 (22)	70 (18)	100 (14)	90 (10)
1 : 21	90 (14)	100 (10)	70 (22)	80 (18)
1 : 24	100 (18)	90 (22)	80 (10)	70 (14)

Este diseño experimental se empleó para explorar e identificar la combinación de los distintos niveles de temperatura, tiempo y RSL con cada DES, que proporcione el mayor porcentaje de celulosa disponible en el material lignocelulósico.

Para la experimentación se empleó una estufa de secado Lab-line instrument Inc. Model 3471, todos los tratamientos se llevaron a cabo en frascos de vidrio con tapa de rosca de 500 mL cada uno. Una vez transcurrido el tiempo, el sólido resultante se filtró a través de un tamiz W. S. Tyler ASTM E-11 specification No. 70 con apertura de malla de 0.212 mm para recuperar el DES usado, posteriormente, el sólido se lavó con agua potable hasta alcanzar un pH entre 5 y 7 sometiéndolo a secado de 24 h a 80 °C empleando una estufa de secado Lab-line instrument Inc. Model 3471 y alcanzar una humedad menor al 10%. La determinación de la composición lignocelulósica del material pretratado con DES se realizó empleando la técnica descrita en la sección 2.3.

2.6 Estudio del pretratamiento con DES

A partir de los resultados del CGL, se consideraron los DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ y $\text{ChCl}:\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ como los más adecuados para este proyecto. Se empleó un Diseño Central Compuesto (DCC) para evaluar la cantidad de celulosa disponible después del pretratamiento con DES, estableciendo como factor fijo la temperatura a 90 °C y dos variables independientes: RSL (g/g) y Tiempo (h), se consideraron 1:24 g/g y 17 h como puntos centrales respectivamente y un valor de $\alpha = 1.4142$. La matriz del DCC se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Matriz del DCC para el pretratamiento

FACTORES	NIVELES		
	-1	0	+1
RSL (g/g)	1:22	1:24	1:26
Tiempo (h)	12	17	22

2.6.1 Evaluación del efecto del DES aplicada a la hidrólisis enzimática

A partir de los resultados obtenidos, se planteó un DCC con tres variables (Tabla 2.5) y temperatura a 90 °C. Las variables independientes fueron: RSL (g/g), Tiempo (h) y relación molar ChCl:CH₂O₂ (mol:mol), siendo la variable de respuesta la concentración de Azúcares Totales (g/L) obtenidos en la hidrólisis enzimática.

Tabla 2.5 Matriz del DCC para la evaluación del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática

FACTORES	NIVELES		
	-1	0	+1
RSL (g/g)	1:20	1:24	1:28
Tiempo (h)	8	12	16
Relación molar ChCl:CH ₂ O ₂ (mol:mol)	1:1	1:2	1:3

Para la hidrólisis enzimática se empleó enzima tipo celulasa: Cellic® CTec3 y enzima tipo hemicelulasa: Cellic® HTec3 ambas de Novozymes (densidad = 1.2 g/mL), como fase líquida se utilizó una solución 0.05 M de acetato de sodio anhidro y ácido acético glacial. Las condiciones de la hidrólisis enzimática se llevaron a cabo con una muestra pretratada de 1 g, bajo pH 5, con una RSL 1:6 g/mL, la carga de la enzima fue del 5% p/p (0.0417 mL/g), 250 rpm, 50 °C en un tiempo de 40 h. La hidrólisis enzimática se realizó en una incubadora con agitación Marca Lab Tech, Modelo LSI3016A. Al término de la hidrólisis enzimática los azúcares liberados de glucosa y xilosa fueron cuantificados mediante HPLC.

2.7 Optimización de la Hidrólisis Enzimática

La optimización de la hidrólisis enzimática se llevó a cabo mediante un DCC con dos factores: relación molar ChCl:CH₂O₂ y % de carga de enzima, los factores fijos empleados en el pretratamiento fueron RSL 1:24 g/g, tiempo de 12 h y temperatura de 90 °C; la variable de respuesta fue la concentración de Azúcares Totales (g/L)

liberados al final de la hidrólisis enzimática. La Tabla 2.6 describe la matriz de este DCC.

Tabla 2.6 DCC para la optimización de la hidrólisis enzimática

FACTORES	NIVELES		
	-1	0	+1
Relación molar ChCl:CH ₂ O ₂ (mol:mol)	1:1.5	1:3	1:4.5
Carga de enzima (%)	3	5	7

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo bajo las mismas condiciones operativas indicadas en la sección 2.6.1.

2.8 Medios de cultivo

2.8.1 Medio de conservación

Como material biológico se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, la cual, es conservada en refrigeración a 4 °C y resembrada cada cuatro meses en el medio de conservación descrito en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Medio de conservación de la *S. cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración (g/L)
Agar-agar	20
Glucosa	100
Extracto de levadura	10

2.8.2 Medio de fermentación

Para llevar a cabo el proceso de fermentación y obtención de etanol se consideran tres tipos de medio: (a) cultivo sintético para la activación de la levadura (Tabla 2.8); (b) preinóculo, el cual contenía 100 mL del hidrolizado enzimático empleado como fuente de azúcares y medio de pre-adaptación de la levadura hacia el sustrato

(Tabla 2.9), y (c) un medio de inóculo, el cual contenía 150 mL del hidrolizado enzimático enriquecido con sales (Tabla 2.10).

Tabla 2.8 Medio sintético de activación para la levadura *S. cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4

Tabla 2.9 Medio de pre-adaptación para la levadura *S. cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración (g/L)
Azúcares Totales en hidrolizado enzimático	28
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4

Tabla 2.10 Medio de fermentación para la levadura *S. cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración óptima (g/L)
Azúcares Totales en hidrolizado enzimático	28
KH ₂ PO ₄	2.93
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.74
Extracto de levadura	1, 2 y 3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75

Concentraciones óptimas tomadas de Morales, 2019

2.8.3 Precultivo y preinóculo

La activación de la levadura, permite el desarrollo del microorganismo a lo largo del proceso de fermentación, para ello, se tomaron tres asadas de la caja Petri en la

que se encontraba sembrada la levadura *S. cerevisiae* ITV-01, se siembra en un matraz Erlenmeyer a un volumen operable de 100 mL de medio sintético (Tabla 2.8), se colocaron en una incubadora con agitación Marca Lab Tech, Modelo LSI3016A durante 12 h a 200 rpm, pH de 5.5 y 30 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza el paso al matraz de preinóculo con un volumen operable de 100 mL y con una concentración de células de 3×10^6 cell viables/mL, y se incubó a pH 5.5, durante 12 h más, a 200 rpm y 30 °C.

2.8.4 Inóculo y fermentación por lote del hidrolizado enzimático

Una vez obtenido el preinóculo, se trasvasaron 1.75 mL al matraz de fermentación final con un volumen operable (volumen total del hidrolizado enzimático en el matraz) de 150 mL, la fermentación se llevó a cabo bajo un pH de 5.5, 150 rpm, 30 °C y una concentración inicial de células de 3×10^6 cell viables/mL. Se realizó un estudio para determinar la cantidad de extracto de levadura más adecuada, para ello, se realizaron tres experimentos considerando 1, 2 y 3 g de levadura respectivamente y en adición de las cantidades óptimas de las sales para todos los matraces (Tabla 2.10) para enriquecer el medio de fermentación. La cinética de fermentación se llevó durante 24 h, muestreando cada dos horas incluyendo el tiempo cero para evaluar composición de sustrato, concentración de etanol, células y biomasa.

2.9 Métodos analíticos

2.9.2 Análisis de biomasa

El análisis de biomasa se hizo a través del conteo celular en el microscopio para posteriormente utilizar una correlación mediante un polinomio de primer orden en peso seco para *S. cerevisiae* ITV-01, dada por la ecuación 2.16 reportando la biomasa generada en (g/L).

$$\text{Biomasa (g/L)} = 3 \cdot 10^{-8} X + 0.429 \quad (2.16)$$

Donde X es número de células contadas en el microscopio.

2.9.3 Cuantificación celular

El conteo celular X se llevó a cabo mediante el empleo de la cámara de Thoma, realizando diluciones adecuadas para poder contar hasta un máximo de 300 células por lectura. Los conteos se realizaron en cinco principales cuadros que contiene la cámara, cuatro de ellos ubicados en las esquinas y uno en el centro, los cuales cuentan con 16 cuadros pequeños en su interior, reportando la concentración celular en cell/mL mediante la correlación expresada en la ecuación 2.17 y ecuación 2.18.

$$X = \frac{N \cdot d}{N_c \cdot 4} * 10^6 \quad (2.17)$$

$$d = \frac{V_t}{V_m} \quad (2.18)$$

Dónde N es el Número de células contadas, d es la dilución empleada y N_c es el número de cuadrantes usados de la cámara de Thoma. La dilución d empleada, se obtiene de dividir el volumen total V_t a analizar entre el volumen de la muestra V_m .

2.9.4 Viabilidad celular

El conteo de células viables de levadura se llevó a cabo mediante conteo en el microscopio de una suspensión celular previamente teñida con azul de metileno, en una relación 1:1. Después de 10 min de reposo, las células vivas (viables) no presentan tinción y las células muertas presentan una coloración azul. La solución de azul de metileno fue preparada con 1 g de azul de metileno disuelto en 1 L de solución de tricitrato de sodio trihidratado al 2 %. La solución debe conservarse en refrigeración a 4 °C y protegida de la luz. El porcentaje de viabilidad $\%V$ permitió

fijar con precisión la tasa de inoculación y el estado fisiológico de las levaduras durante la fermentación. La fórmula para calcular el %V está dada por la ecuación 2.19.

$$\%V = \frac{N_v}{N_t} * 100 \quad (2.19)$$

Dónde N_v es el número de células vivas y N_t es el número total de células (vivas más el número de células muertas).

2.10 Cuantificación de azúcares y etanol

Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C y congeladas, posteriormente se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (por sus siglas en inglés, HPLC). Antes de ser introducidas al HPLC, las muestras se tratan con una solución de BaO 0.3 M y de ZnSO₄ al 5 % p/v a fin de sedimentar y eliminar impurezas presentes como proteínas y almidones entre otras que son capaces de tapar tanto los filtros como la precolumna y columna del HPLC. La relación utilizada fue 8:1:1, después de agregar el BaO y el ZnSO₄ se realiza una agitación vigorosa a cada tubo eppendorf dejando reposarlos durante 10 min para finalmente realizar una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min.

La concentración de los sustratos (glucosa y xilosa) y los productos (etanol, glicerol y ácido acético) fueron determinados por HPLC, utilizando una columna Shodex SH1011, específica para la separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes. La fase móvil empleada es H₂SO₄ 0.05 N, Velocidad de flujo, 0.6 mL/min; Temperatura de la columna, 55 °C; Tipo de detector: índice de refracción Marca Waters modelo 2414; Volumen de inyección, 10 µL y 30 min de duración de análisis por muestra. El software a utilizar es Empower (Waters), que reporta directamente la concentración de la muestra mediante una correlación con estándares previamente realizados (glucosa anhidra, grado alimenticio de Golden Bell Reactivos y fructosa, grado reactivo de Baker, ambas en concentraciones de 100,

50, 16.6, 10, 5, 2.5, 1.66, 1.25, 1, 0.50 y 0.33 (g/L); glicerol anhidro, grado reactivo, Baker en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 (g/L) ; ácido acético glacial, grado reactivo, Baker en concentraciones de 30, 15, 5, 3, 1.5, 0.75, 0.5, 0.37, 0.3, 0.15 y 0.1 (g/L), y alcohol etílico absoluto anhidro, grado reactivo, Baker en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 (g/L)).

2.11 Análisis de datos experimentales

Los rendimientos, productividad, velocidades globales y velocidades específicas derivadas de la fermentación por lote, se determinaron mediante las ecuaciones referenciadas en la Tabla 1.5 para su análisis y comparación entre sí.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización lignocelulósica de los residuos de piña

Los resultados de la caracterización inicial del material lignocelulósico (residuos de piña) se presentan en la Tabla 3.1, estos resultados se obtuvieron tomando muestras representativas por triplicado de 0.3 g con tamaño de partícula de 0.6 – 1.18 mm de cada residuo específico, previamente deshidratados.

Tabla 3.1 Caracterización de residuos de piña

Característica (%)	RP1				RP2
	Cáscara	Corona	Corazón	Promedio	Rastrojo
Lignina	27.1302	31.1787	18.5147	25.6079	28.5934
Hemicelulosa	14.0283	16.4048	N/D	10.1444	N/D
Celulosa	24.3423	25.1169	28.5668	26.0087	12.6489
Humedad	0.920	7.680	4.067	4.2223	8.4125
ASL	5.5732	6.3815	6.3980	6.1176	9.8280

ASL: Lignina Soluble en Ácido, N/D: No Determinado

Existen distintos trabajos sobre residuos de piña, la variación de los componentes de celulosa, hemicelulosa y lignina es evidente entre ellos. La Tabla 3.2 resume los valores obtenidos y la composición de la biomasa entre algunas investigaciones de otros autores que han trabajado con residuos de piña. Si se analizan los datos de la composición estructural de los residuos de la piña se puede observar que los valores de celulosa en corazón y cáscara son ligeramente superiores (3%) a los reportados por Soontornchaiboon *et al.*, (2016), para la lignina en corona (hojas), el valor obtenido se encuentra dentro de los rangos reportados por Asim *et al.*, (2015) entre 4 – 15 %. El valor de hemicelulosa resultante en cáscara fue mayor (3%) al reportado por Jahid *et al.*, (2018). Por otro lado, respecto al rastrojo de piña, los valores de lignina de este trabajo son similares a los reportados por Quesada *et al.*, (2005).

Tabla 3.2 Comparación de la estructura lignocelulósica de la piña

Residuo	Autor	Composición (%)		
		lignina	hemicelulosa	celulosa
Hojas (Corona)	Ban-Koffi y Han (1990)	4.50	23.20	29.60
	Alam <i>et al.</i> , (2009)	2.89	13.39	74.44
	Daud <i>et al.</i> , (2014)	4.28	19.5	66.20
	Sánchez <i>et al.</i> , (2014)	13.88	21.88	43.53
	López <i>et al.</i> , (2014)	3.3	17.5	59
	Irías y Lutz (2014)	8	32	
	Asim <i>et al.</i> , (2015)	8.69	18.8	73.25
	Mansor <i>et al.</i> , (2019)	22	37	30
	Este trabajo (2019)	14.95	16.4	25.11
Cáscara	Ban-Koffi y Han (1990)	1.5	20.2	14
	Choonut <i>et al.</i> , (2014)	2.68	74.96	21.98
	Sánchez <i>et al.</i> , (2014)	10.01	28.69	40.55
	López <i>et al.</i> , (2014)	7.8	5.8	10.1
	Jahid <i>et al.</i> , (2018)	6.5	11.1	22.4
	Este trabajo (2019)	14.33	14.02	24.34
Corazón	Sánchez <i>et al.</i> , (2014)	5.78	28.53	24.53
	López <i>et al.</i> , (2014)	---	---	---
	Este trabajo (2019)	9.89	---	28.56
Corazón - cáscara	Soontornchaiboon <i>et al.</i> , (2016)	12.24	22.9	23.32
Rastrojo	Quesada <i>et al.</i> , 2005	27.73	42.71	
	Abdul Khalil <i>et al.</i> , (2006)	10.5	80.5	
	Mokhtar <i>et al.</i> , (2007)	4.78	9.45	78.11
	Cherian <i>et al.</i> , (2010)	4.04	13.66	83.72
	Irías y Lutz (2014)	10.8	37	
	López <i>et al.</i> , (2014)	3.4	17.3	25.8
	Este trabajo (2019)	28.59	---	12.64

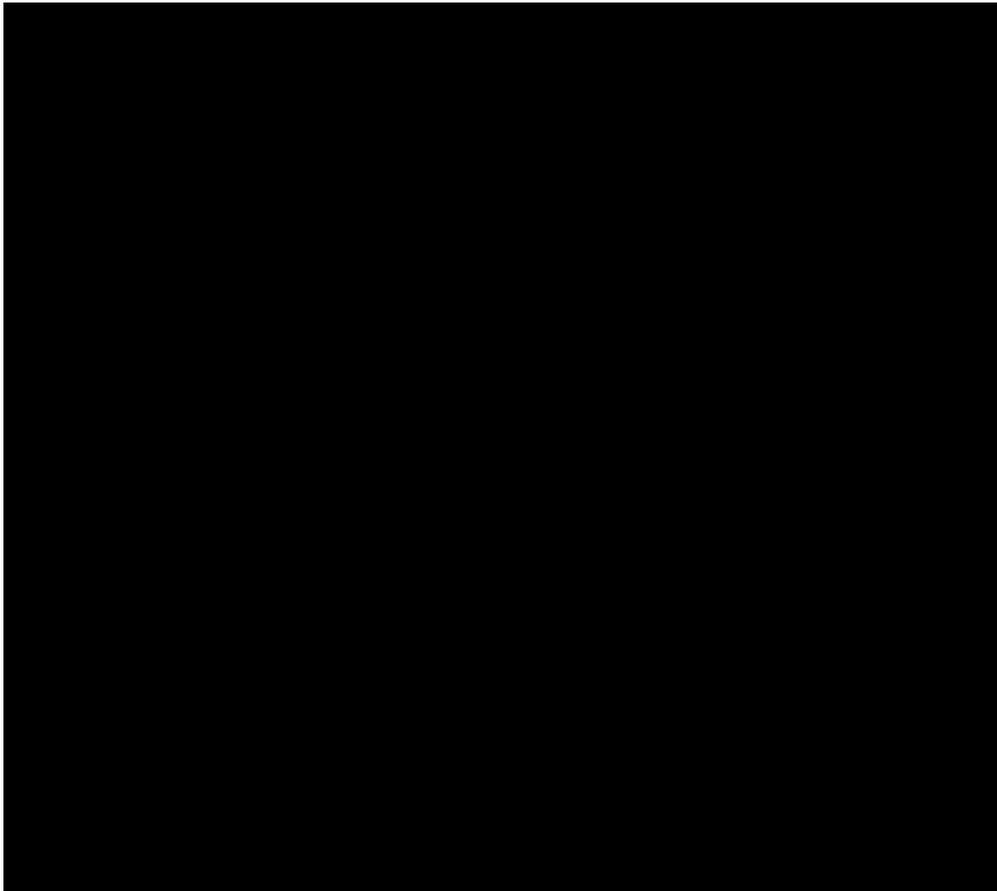
La variación depende en gran manera a la técnica de cultivo empleada, el clima predominante del sitio, la tierra de cultivo, la ubicación geográfica, la clase, el tipo de especie de piña sembrada y el método utilizado para la determinación de la composición.

Considerando los valores promedio de la Tabla 3.1 en específico los valores de la celulosa (variable de respuesta principal de interés) presente en el RP1, se empleó una muestra representativa de una mezcla uniforme de Corona, Cáscara y Corazón, el RP2, se trabajó en forma independiente.

3.2 Pretratamiento de RP1 con DES

El pretratamiento con DES se realizó mediante un diseño experimental CGL cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.3, alcanzando un valor máximo de celulosa disponible del 20.57% obtenido con el DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ con RSL 1:24 g/g a 90 °C durante 22 h y de un 19.91% de celulosa obtenido con el DES $\text{ChCl}:\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ con RSL de 1:15 g/g a 90 °C durante 18 h.

Tabla 3.3 Resultados del pretratamiento con DES basados en el CGL



El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Minitab® 18 (Minitab, LLC, USA) realizando la evaluación de los efectos principales de cada factor sobre la variable de respuesta como se muestra en la Figura 3.1.

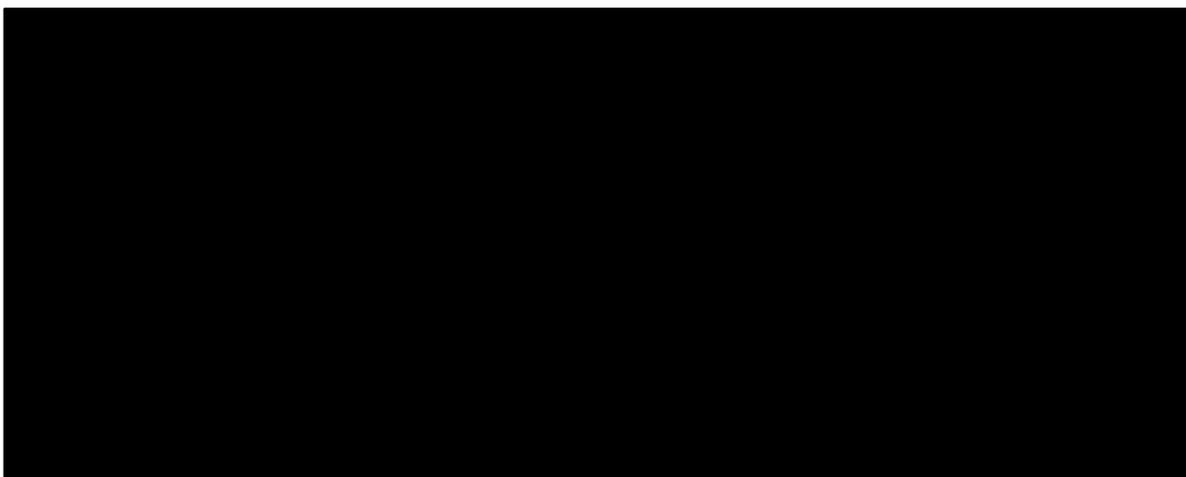


Figura 3.1 Gráfica de efectos principales para la variable de respuesta % de celulosa

En la Figura 3.1 se pueden identificar los efectos principales de los factores que influyen en la variable de respuesta. Se observa que el mayor % de celulosa disponible en el RP1 se obtuvo al emplear: RSL 1 (1:15 g/g) seguido de la RSL 4 (1:24 g/g), DES 2 (ChCl:CH₂O₂) seguido del DES 3 (ChCl:C₃H₆O₃), temperatura 3 (90 °C) y tiempo 1 (10 h) seguido del tiempo 4 (22 h).

3.3 Resultados del pretratamiento de RP1 con DES basado en el DCC

Los resultados del DCC tanto para el DES ChCl:CH₂O₂ como para el DES ChCl:C₃H₆O₃ se muestran en la Tabla 3.4. Los valores obtenidos con el DES ChCl:CH₂O₂ oscilaron entre de 6.21 – 21.87% de celulosa, mientras que, para el DES ChCl:C₃H₆O₃ el rango fue de 4.26 – 19.80% de celulosa, obteniéndose 2.07 % más con el DES ChCl:CH₂O₂. El mejor resultado obtenido fue de 21.87% de celulosa en 22 h con una RSL de 1:22 g/g, sin embargo, a 12 h con una RSL también de 1:22 g/g se logró obtener hasta 20.68% de celulosa disponible, reduciendo casi en un 50%

el tiempo empleado, con una diferencia mínima del 1.19% entre los dos mejores resultados obtenidos con el DES ChCl:CH₂O₂. Comparando el comportamiento entre los dos DES, la mezcla ChCl:CH₂O₂ presentó el mayor porcentaje de celulosa disponible después del pretratamiento.

Tabla 3.4 Resultados del pretratamiento con DES basados en el DCC

Solvente	Experimento	Variables Codificadas		Variables Decodificadas		Celulosa (%)
		RSL (g/g)	Tiempo (h)	RSL (g/g)	Tiempo (h)	
ChCl: CH ₂ O ₂	1	-1	-1	1:22	12	
	2	1	-1	1:26	12	
	3	-1	1	1:22	22	
	4	1	1	1:26	22	
	5	-1.41	0	1:21.17	17	
	6	1.41	0	1:26.83	17	
	7	0	-1.41	1:24	9.930	
	8	0	1.41	1:24	24.07	
	9	0	0	1:24	17	
	10	0	0	1:24	17	
	11	0	0	1:24	17	
ChCl: C ₃ H ₆ O ₃	1	-1	-1	1:22	12	
	2	1	-1	1:26	12	
	3	-1	1	1:22	22	
	4	1	1	1:26	22	
	5	-1.41	0	1:21.17	17	
	6	1.41	0	1:26.83	17	
	7	0	-1.41	1:24	9.93	
	8	0	1.41	1:24	24.07	
	9	0	0	1:24	17	
	10	0	0	1:24	17	
	11	0	0	1:24	17	

Los pretratamientos empleados en los RP1, permitieron observar que la ASL se redujo en un 50.34% y la hemicelulosa en un 17.04%, estos valores de remoción

están ligados al mejor resultado de celulosa disponible obtenido de 21.87%, sin embargo, un efecto no deseado como la remoción parcial (15.87%) o mínima de la celulosa también tuvo lugar. Debido a este efecto no deseado en el RP1, se determinó que no era la materia prima más adecuada para el pretratamiento con los DES, con la información obtenida hasta este punto se determinó continuar con la experimentación haciendo uso únicamente del RP2.

3.4 Resultados de la hidrólisis enzimática sobre RP2 pretratado con DES

Los resultados de la hidrólisis enzimática y el análisis lignocelulósico para el RP2, empleando el DCC propuesto en la Sección 2.6.1, se muestran en la Tabla 3.5.

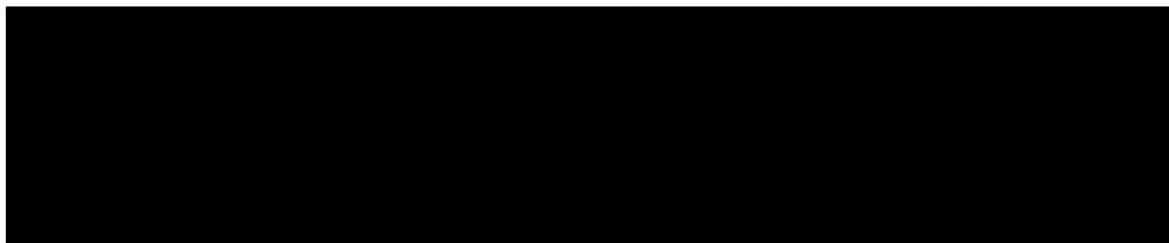
Tabla 3.5 Resultados de la hidrólisis enzimática y evaluación lignocelulósica sobre el RP2 con DES

Experimento	Variables Naturales		
	RSL (g/g)	Tiempo (h)	ChCl: CH ₂ O ₂
1	1:20	8	1:1
2	1:28	8	1:1
3	1:20	16	1:1
4	1:28	16	1:1
5	1:20	8	1:3
6	1:28	8	1:3
7	1:20	16	1:3
8	1:28	16	1:3
9	1:18.34	12	1:2
10	1:29.66	12	1:2
11	1:24	6.34	1:2
12	1:24	17.66	1:2
13	1:24	12	1:0.59
14	1:24	12	1:3.41
15	1:24	12	1:2
16	1:24	12	1:2
17	1:24	12	1:2

N/D: No Determinado

El diseño experimental permitió apreciar principalmente tres resultados destacados respecto a la reducción de ASL y Lignina total, así como el incremento de la Celulosa, esto, en comparación con la materia prima (Tabla 3.1). Los tres mejores resultados obtenidos corresponden a los experimentos 8, 14 y 15; un resumen completo de estas diferencias se describe en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Comparativa de remoción de ASL y Lignina e incremento de Celulosa respecto a la materia prima RP2



El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el software Minitab® 18 (Minitab, LLC, USA) empleando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Derivado del ANOVA (Anexo C1) se puede afirmar que el efecto de los moles de ácido fórmico (CH_2O_2) en la síntesis del DES es el factor más significativo (valor $p = 0.000$) seguido por el término cuadrático CH_2O_2 (mol)² (valor $p = 0.001$); respecto a las interacciones, la única interacción significativa fue la RSL (g/g) y moles de CH_2O_2 , esto es un indicio de que la variable de respuesta tiene cierta dependencia de la relación entre estos dos factores. El término cuadrático significativo de CH_2O_2 (mol)² indicó que la superficie de respuesta tiene una curvatura con una tendencia definida. El gráfico de probabilidad normal (Anexo C2) presenta una dispersión de 5.64%, obteniendo el polinomio de segundo orden de la ecuación 3.1. El modelo muestra un buen ajuste con los datos experimentales, teniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.927, implicando que el 92.7% de los datos de las variables se ajustan al modelo.

$$y = 52.60 - 2.67X_1 + 2.27X_2 + 11.27X_3 - 3.78X_1^2 - 1.77X_2^2 - 10.60X_3^2 - 1.92X_1X_2 + 4.85X_1X_3 - 1.79X_2X_3 \quad (3.1)$$

Donde y es la respuesta de Azúcares Totales (g/L), X_1 es la RSL (g/g), X_2 es el tiempo (h) y X_3 son los moles de CH_2O_2 en la síntesis del DES.

Mediante la metodología de superficie de respuesta, se obtuvieron las gráficas donde se puede apreciar la tendencia del modelo hacia la maximización de la concentración de los Azúcares Totales (g/L). La Figura 3.2 muestra las gráficas con una clara tendencia a la maximización.

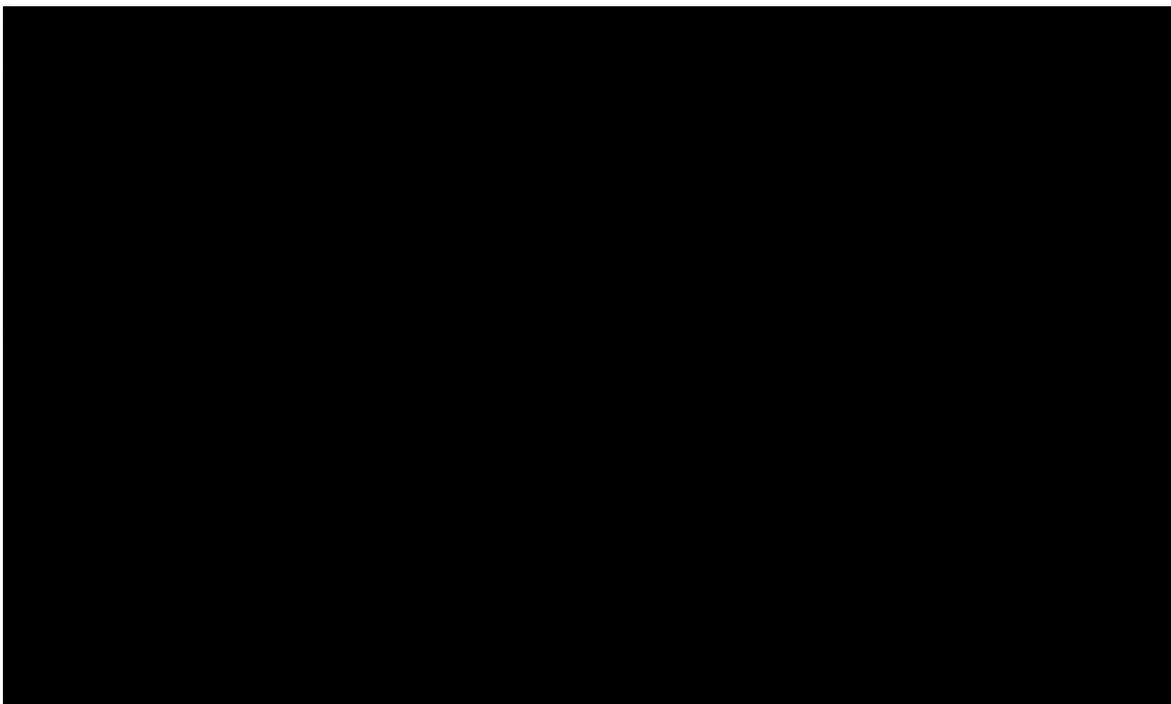


Figura 3.2 Gráfica de superficie de respuesta: a) Tiempo (h) vs RSL (g/L), b) RSL (g/L) vs Ác. Fórmico (mol) y c) Ác. Fórmico (mol) vs Tiempo (h)

A partir de las gráficas de contornos (Figura 3.3), se observan las zonas óptimas de operación para el pretratamiento, estableciéndose que los rangos son: para el tiempo en (h) de 11 – 17.5, para la RSL (g/g) de 20 – 26 y para los moles de CH_2O_2 de 2 – 2.85.



Figura 3.3 Gráfica de contornos: a) Tiempo (h) vs. RSL (g/g), b) Ác. Fórmico (mol) vs. RSL (g/g) y c) Ác. Fórmico (mol) vs. Tiempo (h)

Para concluir de manera analítica que el modelo tiende a maximizar o minimizar, se llevó a cabo el análisis canónico de los coeficientes codificados de la ecuación de regresión del modelo (ecuación 3.1). Para este análisis se emplearon las ecuaciones referenciadas en la sección 1.13.1.

Los puntos óptimos (X_s) para el pretratamiento fueron: RSL 1:23.16 g/g, tiempo 14.14 h y una relación molar para la formación del DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ de 1:2.43; estos valores tienen una alta precisión y coincidencia con los rangos que se pueden apreciar visiblemente en las gráficas de contorno (Figura 3.3). Bajo estas condiciones óptimas operativas se pudo obtener la respuesta predicha (\hat{y}_0) la cual arrojó un valor de 55.93 (g/L) de Azúcares Totales.

Finalmente, la forma canónica del modelo ajustado de segundo orden que se obtuvo está descrita por la ecuación 3.2, cuyos signos negativos ($\lambda_1 = -11.4112$, $\lambda_2 = -3.7223$, $\lambda_3 = -1.0165$) representan un máximo.

$$\hat{y} = 55.9393 - 11.4112X_1^2 - 3.7223X_2^2 - 1.0165X_3^2 \quad (3.2)$$

Los azúcares cuantificados después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática, pueden compararse parcialmente con lo obtenido por Xu *et al.*, (2015), emplearon hidrólisis enzimática sobre rastrojo de maíz pretratado con ChCl:CH₂O₂, logrando remover hasta 38.46% de ASL e incrementar la celulosa en un 54.51%. La hidrólisis enzimática la llevaron a cabo con una muestra de 1.5 g de rastrojo de maíz pretratado, aplicando un pH ligeramente inferior (4.8), a la misma temperatura, una velocidad de agitación menor (120 rpm) y un mayor tiempo de incubación (72 h), empleando enzima del tipo celulasa obtuvieron un máximo rendimiento de glucosa de 17 (g/L). En comparación, y a pesar de no ser la variable de respuesta principal, en este trabajo se logró obtener hasta un 152% (42.97 (g/L)) más de la concentración de glucosa y se redujo el tiempo de hidrólisis enzimática a 40 h.

Por otra parte, Xing *et al.*, (2017), pretrataron paja de arroz con el DES ChCl:CH₂O₂ (1:2, 2 h, 130 °C y RSL 1:20 g/g) logrando obtener hasta 18 (g/L) de Azúcares Totales después de una hidrólisis enzimática de 48 h empleando una carga de 50 FPU /sólidos totales de enzimas del tipo celulasas; en comparación con este trabajo, la concentración de Azúcares Totales (55.93 (g/L)) se pudo incrementar hasta en un 210% disminuyendo 8 h del tiempo empleado en la hidrólisis enzimática.

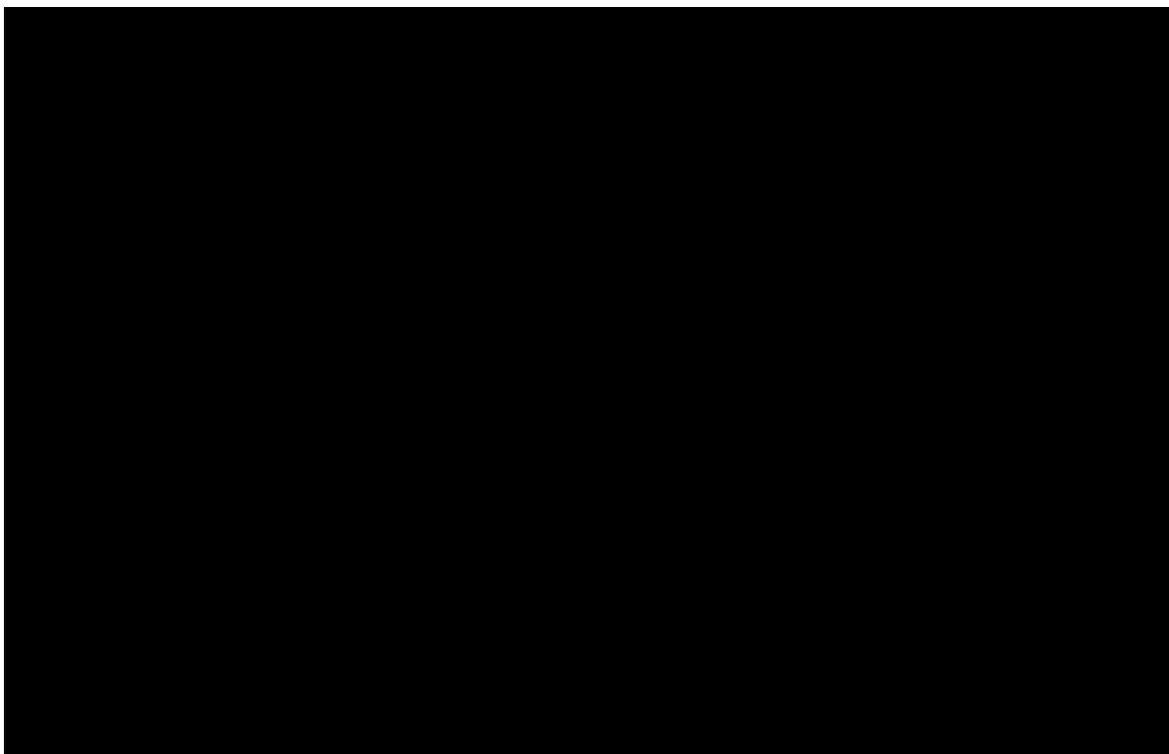
Finalmente, Teh *et al.*, (2019), pretrataron racimos vacíos de fruta de palma aceitera con el DES ChCl:CH₂O₂ (1:1.5, 2 h, 100 °C y RSL 1:19 g/g), logrando remover hasta 94.19% de lignina total e incrementar la hemicelulosa en un 146.31%, sin embargo, también obtuvieron resultados poco favorables debido a que la remoción de celulosa también tuvo lugar hasta en un 83.69%; en este trabajo, no solo se evitó la remoción de celulosa, sino que se obtuvo un incremento de hasta un 259% lo que favoreció

a la hidrólisis enzimática. El análisis de este y otros trabajos en los que se ha empleado el DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ permite concluir que se deben plantear diseños experimentales específicos para cada tipo de materia prima, debido a que esta, parece ser un factor significativo para el empleo de los DES en el pretratamiento.

3.5 Optimización de la hidrólisis enzimática sobre RP2 pretratado con DES

Los resultados obtenidos en la sección 3.4, permitieron establecer los niveles de los factores para la exploración e identificación de los puntos óptimos de moles de ácido fórmico (CH_2O_2) y % de carga de enzima; empleando las condiciones descritas en las secciones 2.6.1 y 2.7. Los resultados de la optimización de la hidrólisis enzimática y el análisis lignocelulósico para el RP2 empleando el DCC propuesto en la Sección 2.7, se muestran en la Tabla 3.7.

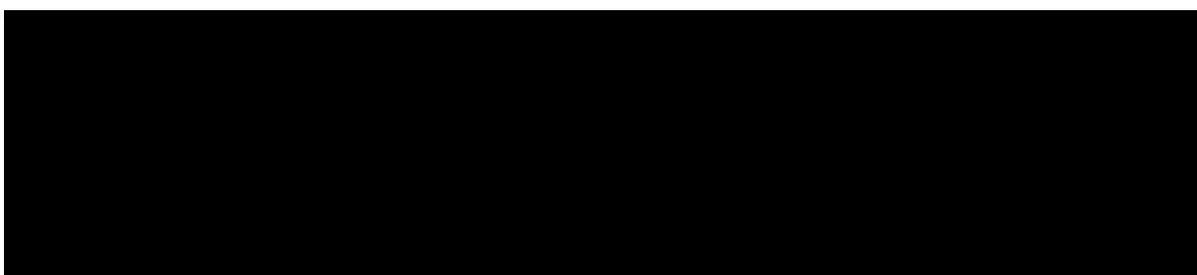
Tabla 3.7 Resultados de la hidrólisis enzimática y evaluación lignocelulósica sobre el RP2 con DES



N/D: No Determinado

En este estudio, se identificó una clara influencia de la proporción molar del CH_2O_2 para la formación del DES. Los experimentos 2, 4 y 6 fueron los que presentaron los mayores incrementos en los porcentajes de celulosa disponible y al mismo tiempo la mayor reducción de ASL y Lignina total, esto, en comparación con la materia prima (Tabla 3.1); un resumen completo de estas diferencias se describe en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Comparativa de remoción de ASL y Lignina e incremento de Celulosa respecto a la materia prima RP2



El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el software Minitab® 18 (Minitab, LLC, USA) empleando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Derivado del ANOVA (Anexo C3) se puede afirmar que el efecto del término cuadrático de la carga de enzima fue el más significativo (valor $p = 0.022$) seguido del término cuadrático de los moles de CH_2O_2 en la síntesis del DES (valor $p = 0.039$). Los términos cuadráticos significativos indican que la superficie de respuesta tiene una curvatura con una tendencia definida. El gráfico de probabilidad normal (Anexo C4) presenta una dispersión de 9.02%, obteniéndose el polinomio de regresión de segundo orden (ecuación 3.3). El modelo muestra un buen ajuste con los datos experimentales, teniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.8167, implicando los datos obtenidos sólo presentan un error del 18.33%.

$$y = 51 + 5.91X_1 + 5.91X_2 - 10.58X_1^2 - 12.47X_2^2 - 4.54X_1X_2 \quad (3.3)$$

Donde y es la respuesta de Azúcares Totales (g/L), X_1 los moles de CH_2O_2 en la síntesis del DES y X_2 la carga de enzima en porcentaje.

A partir de la gráfica de superficie de respuesta (Figura 3.4), se puede observar un comportamiento hacia la maximización de la concentración de los Azúcares Totales (g/L).

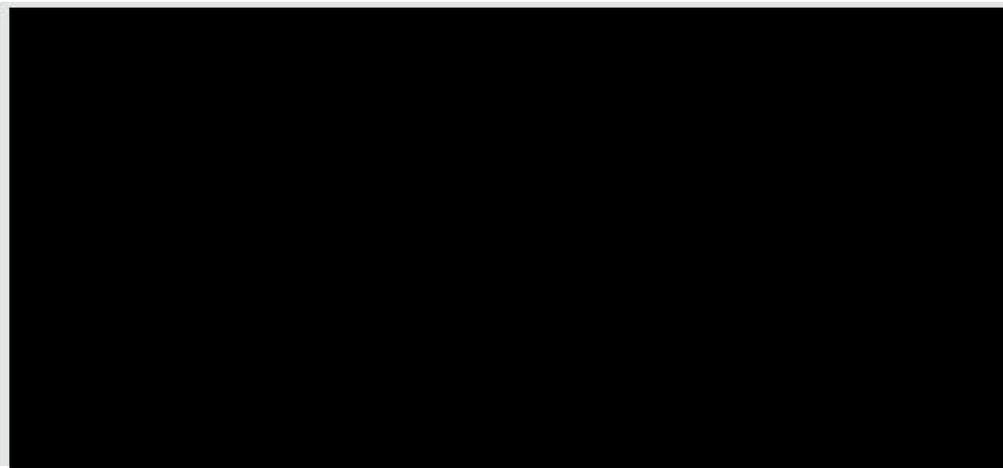


Figura 3.4 Gráfica de superficie de respuesta: Ác. Fórmico (mol) vs % Enzima

En la Figura 3.5, se presenta la gráfica de contornos, en la cual se observa la región óptima, siendo los rangos: para el porcentaje de carga de enzima de 3.8 – 7 (%) y para los moles de CH_2O_2 de 2 – 4.6 (mol).

A partir del análisis canónico, se establecieron los puntos óptimos (X_s) siendo: relación molar para la formación del DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ de 1:3.35 y carga enzimática del 5.38%; estos valores tienen una alta precisión y coincidencia con los rangos que se pueden apreciar visiblemente en la gráfica de contorno (Figura 3.5). con una respuesta predicha (\hat{y}_0) de 52.27 (g/L) de Azúcares Totales.

Finalmente, la forma canónica del modelo ajustado de segundo orden que se obtuvo está descrita por la ecuación 3.4, cuyos signos negativos ($\lambda_1 = -13.9838$, $\lambda_2 = -9.0662$) representan un máximo.

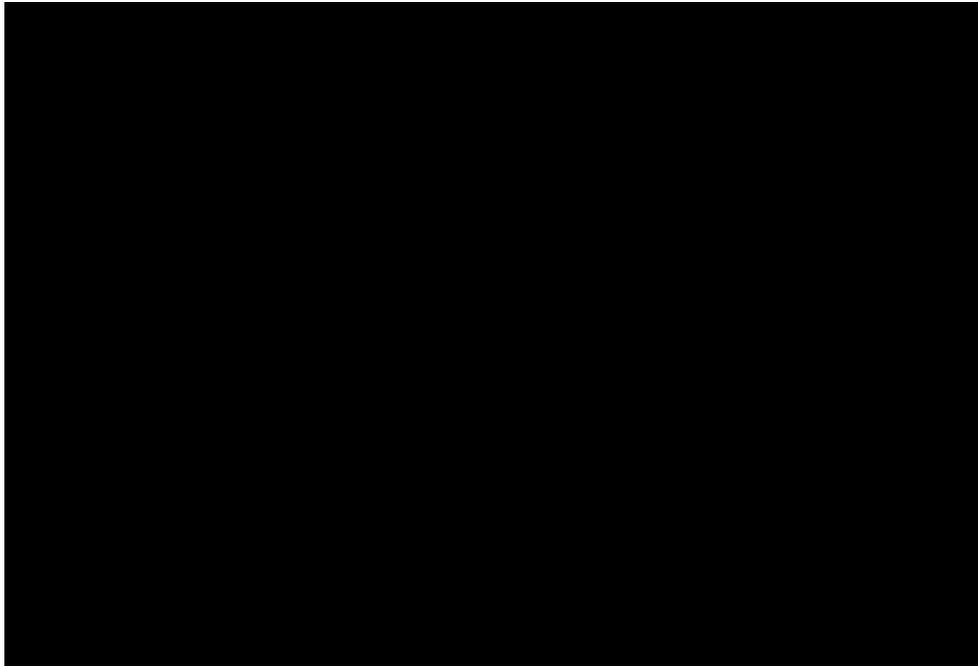


Figura 3.5 Gráfica de contornos: Ác. Fórmico (mol) vs. % Enzima

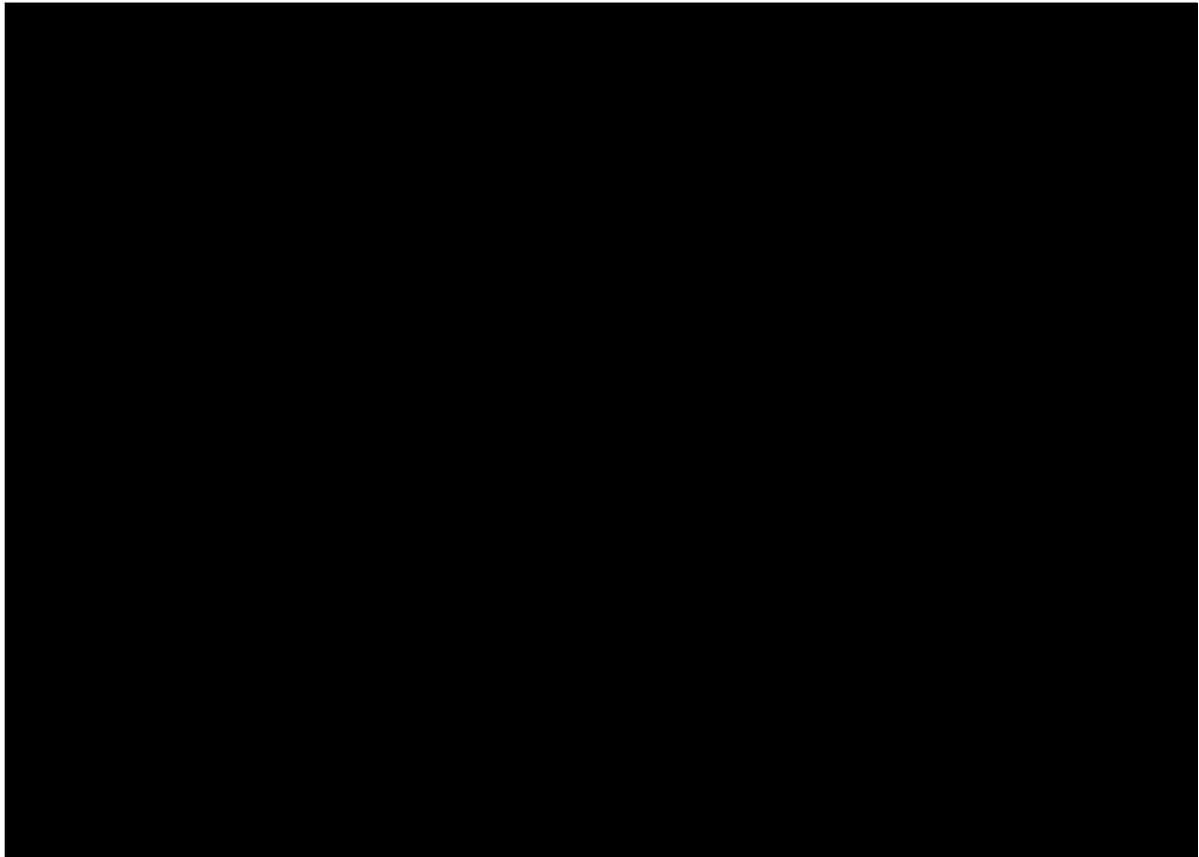
$$\hat{y} = 52.2748 - 13.9838X_1^2 - 9.0662X_2^2 \quad (3.4)$$

Los resultados obtenidos del pretratamiento e hidrólisis enzimática, se validaron empleando 2.5 g de RP2 bajo las condiciones óptimas y mediante HPLC se detectaron 44 (g/L) de glucosa, pero no se detectó la presencia de xilosa cuyo valor ha oscilado entre 10 – 15 g/L. Los azúcares cuantificados experimentalmente resultaron 15.83 % menor a la respuesta predicha, sin embargo, se encuentra dentro de la región óptima.

El proceso de pretratamiento se escaló 30.5 veces (122.23 g de RP2) y a través de HPLC se registró una concentración de 28 (g/L) solo de glucosa sin detectar xilosa. Este efecto no deseado puede estar asociado a una relación no lineal entre la cantidad del DES establecido y la cantidad del residuo, de tal manera que, a mayores escalas de experimentación no se conserva el efecto de la RSL (g/g) del DES sobre el residuo pretratado, como sucede a escalas mínimas.

3.6 Resultados de la fermentación por lote del hidrolizado enzimático

El hidrolizado enzimático obtenido del pretratamiento se sometió a un estudio de fermentación bajo las condiciones operativas descritas en la sección 2.9.3. La Figura 3.6 muestra los resultados obtenidos del estudio de las tres cinéticas de fermentación que se llevaron a cabo durante 24 h (Anexo C5).



—●— Azúcares Totales Extracto Levadura 1 (g/L)	—●— Etanol Extracto Levadura 1 (g/L)
—●— Azúcares Totales Extracto Levadura 2 (g/L)	—●— Etanol Extracto Levadura 2 (g/L)
—●— Azúcares Totales Extracto Levadura 3 (g/L)	—●— Etanol Extracto Levadura 3 (g/L)

Figura 3.6 Cinéticas fermentativas del hidrolizado enzimático

Durante las cinéticas de fermentación, el extracto de levadura de 2 (g/L), mostró el mejor de los resultados en la obtención de etanol como producto final, en él, se alcanzó una concentración máxima de etanol de 10.44 (g/L) en un tiempo de 16 h,

sin embargo, a las 12 h se alcanzó una concentración de etanol de 10.42 (g/L) habiendo una diferencia despreciable entre sí de 0.02 (g/L) de etanol, pero con un tiempo significativo de diferencia de 4 h entre estos dos resultados, por lo que las 12 h se consideraron como el tiempo en el que se alcanzó la máxima concentración de etanol.

Empleando las ecuaciones referidas en la sección 1.12.1 se obtuvieron los rendimientos y productividad, La Figura 3.7 muestra una comparativa de estos resultados.

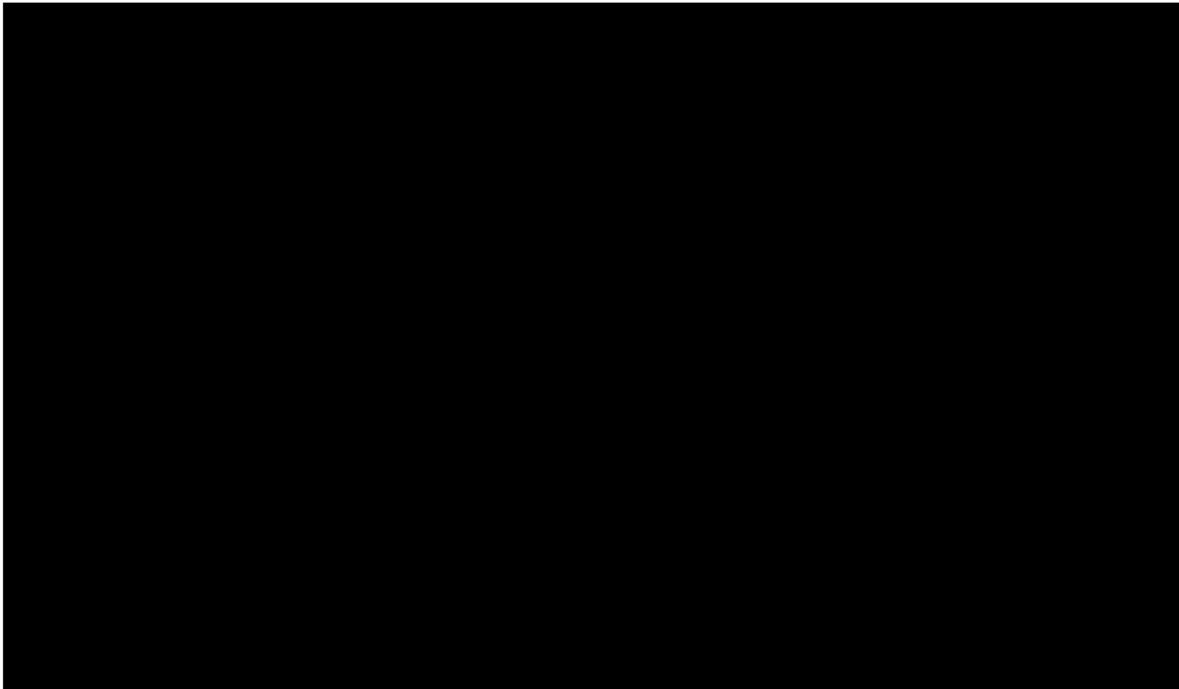


Figura 3.7 Rendimientos y productividad del estudio de fermentación

Derivado de la comparación entre los tres procesos de fermentación, se observó que el rendimiento de biomasa por gramo de sustrato $Y_{x/s}$ del experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura, fue superior en 6.18% al que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura y 0.98% superior al rendimiento del que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura. Para el rendimiento del producto por cada gramo de sustrato $Y_{p/s}$, el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura tuvo un 15.1% mayor al que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura y 6.04% más que el que contenía 3 (g/L)

de extracto de levadura. Para la productividad Q , el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura tuvo un 17.45% de productividad mayor al que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura, y un 7.96% mayor a la productividad del que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura.

De la misma forma, se obtuvo la velocidad específica de crecimiento del microorganismo para cada experimento de fermentación, en la Figura 3.8 se puede apreciar una comparativa de esta velocidad entre los tres experimentos.

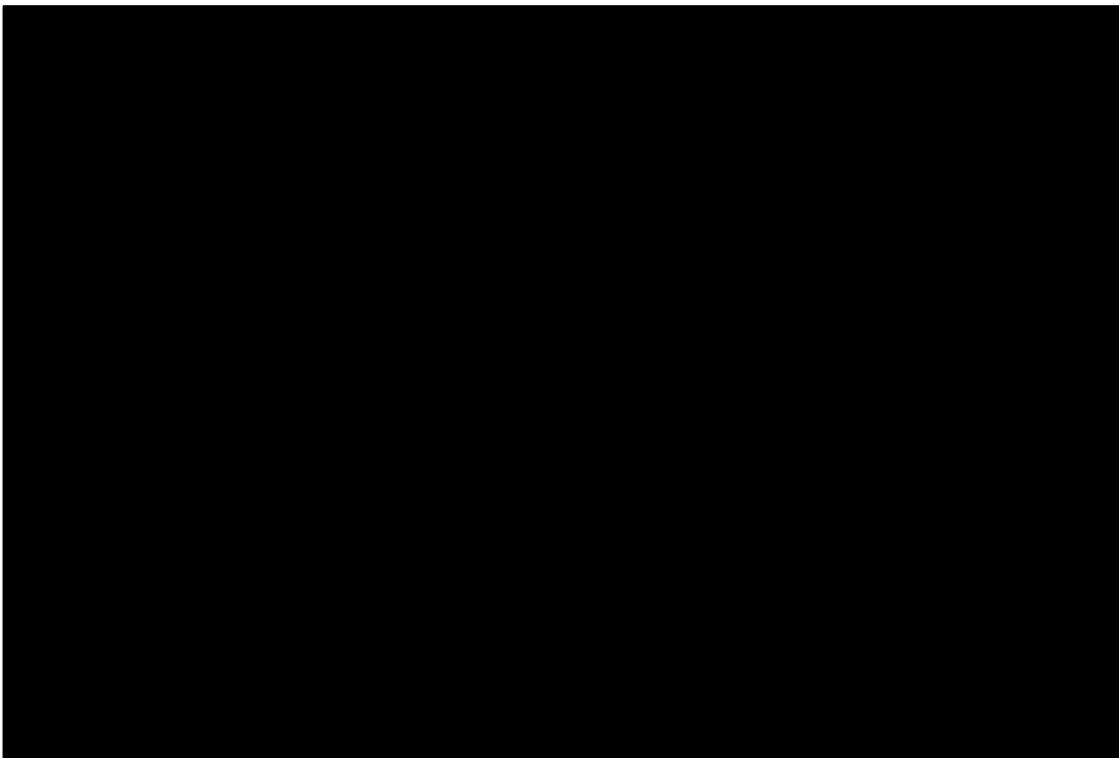


Figura 3.8 Velocidad específica de crecimiento del estudio de fermentación

La velocidad de crecimiento del microorganismo μ , en el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura, fue 1.44% mayor para ambos casos de comparación entre el que contenía 1 y 3 (g/L) de extracto de levadura.

Por otra parte, se obtuvieron las velocidades globales y específicas de los experimentos de fermentación. La figura 3.9 muestra una comparativa gráfica de estas velocidades para los tres casos de fermentación.



Figura 3.9 Velocidades globales y específicas del estudio de fermentación

Respecto a la velocidad global de producción de biomasa r_x , el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura tuvo mejores resultados en comparación con el que contenía 1 y 3 (g/L) de extracto de levadura con 8.33% y 2.79% más, respectivamente.

Se observó que la velocidad global de consumo de sustrato r_s , en el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura, consumió un 2% más de lo que se consumió en el que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura, y 1.94% más de él que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura.

Para la velocidad global de producción de producto r_p , fue un 17.45% mayor en el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura respecto al que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura, y un 7.96% más respecto al que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura.

En tanto, la velocidad específica de consumo de sustrato V_s , fue más rápida en el experimento con 1 (g/L) de extracto de levadura con 4.72% más que en el que contenía 2 (g/L) de extracto de levadura y 4.56% más que en el que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura.

Mientras que, para la velocidad específica de generación de etanol como producto V_p , el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura fue superior en un 10.04% más, que el que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura y 5.79% más, que el que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura.

Finalmente, la mejor eficiencia η se encontró en el experimento con 2 (g/L) de extracto de levadura, la cual, fue de 78.98% lo que significó un 10.38% más eficiente respecto al que contenía 1 (g/L) de extracto de levadura y 4.38% más eficiente respecto al que contenía 3 (g/L) de extracto de levadura. La eficiencia η se basó en un rendimiento teórico de 0.511 g etanol/g glucosa (Vázquez y Dacosta 2007). En el Anexo C6 se puede consultar en tablas todos los resultados de los rendimientos, productividad, velocidades y eficiencia.

De acuerdo a Kumar *et al.*, (2015) dos de las principales características de un proceso viable de bioetanol, es que el rendimiento $Y_{p/s}$ de bioetanol sea mayor al 90% del máximo teórico y que la productividad Q sea mayor a 1 (g/L*h), citando nuevamente a Vázquez y Dacosta (2007), el rendimiento teórico es de 0.511 g etanol/g glucosa; en este estudio fermentativo el mayor rendimiento fue de 0.404 g/g (2 (g/L) de extracto de levadura), este valor representa un 79.06% del rendimiento teórico. Respecto a la productividad, el mayor resultado fue de 0.868 g/g (2 (g/L) de extracto de levadura). Los resultados son ligeramente menores a los

mínimos requeridos para calificar esta fermentación como un proceso viable, sin embargo, estos resultados tienen que ver más con el pretratamiento químico del residuo lignocelulósico y la posterior hidrólisis enzimática del mismo. Si se logran incrementar las concentraciones de azúcares totales bajo los parámetros de optimización (o zonas cercanas a ellos) obtenidos en el pretratamiento, existe una gran probabilidad de llevar a cabo fermentaciones altamente viables y productivas de los residuos lignocelulósicos pretratados con DES.

Por otra parte, la Tabla 3.9 muestra una comparación entre los mejores resultados de fermentación de esta investigación y los resultados de fermentación de otros autores que también pretrataron químicamente con DES algún material lignocelulósico y posteriormente lo hidrolizaron enzimáticamente.

Tabla 3.9 Comparación de resultados de la fermentación entre distintos autores

Autor	Residuo Empleado	DES Utilizado	Levadura Usada	Producto	Rendimiento $Y_{p/s}$ (g/g)	Productividad Q (g/L*h)
Xu <i>et al.</i> , 2015	Rastrojo de maíz	ChCl: Ác. Fórmico	<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSM 13864	Butanol 5.63 g/L En 48 h	0.17	0.12
Procentese <i>et al.</i> , 2017	Hojas de lechuga	ChCl: Glicerol	<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSMZ 792	Butanol 0.5 g/L En 30 h	0.04	0.016
Xing <i>et al.</i> , 2017	Paja de arroz	ChCl: Ác. Fórmico: Ác. Acético	<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSM 13864	Butanol 9.5 g/L En 72 h	0.25	0.13
Yu <i>et al.</i> , 2017	Residuos herbales de Akebia	ChCl: Ác. Fórmico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y2034	Etanol 14 g/L En 160 h	1	0.0875
Guo <i>et al.</i> , 2019	<i>Miscanthus x giganteus</i>	ChCl: Glicerol: Ác. silicotungstico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol 8.77 g/L En 48 h	0.818	0.18
Este Trabajo, 2019	Rastrojo de Piña	ChCl: Ác. Fórmico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01	Etanol 10.42 g/L En 12 h	0.404	0.868

Derivado del análisis comparativo de la Tabla 3.9, se puede argumentar que los resultados de este trabajo sostienen una mejora substancial respecto al rendimiento y productividad del proceso de fermentación. Uno de los resultados más directos y semejantes de comparación con este trabajo, son los obtenidos por Yu *et al.*, (2017), si bien, ellos obtuvieron hasta 25.57% (3.58 g/L) más de etanol de lo obtenido en esta investigación, no se debe perder de vista que su proceso fermentativo se prolongó hasta 160 h de incubación, lo que representa hasta un 92.5% más del tiempo empleado en este estudio, este tiempo les permitió obtener un rendimiento de etanol de hasta 100% (59.6% más que este trabajo) pero a costa de una productividad tan baja de 0.08 (g/L*h) lo que representa un 89.91% menos productivo en comparación con este trabajo.

Por otro lado, Guo *et al.*, (2019) lograron obtener un rendimiento de etanol de 81.8%, esto representa un 50.61% más de lo que se obtuvo en este trabajo, sin embargo, la concentración de etanol que obtuvieron fue 15.83% (1.65 g/L) menor a lo obtenido en esta investigación, además, ellos requirieron de hasta 36 h más (300% h) de incubación para alcanzar sus mejores resultados, por lo que su productividad fue menor hasta en 79.26% en comparación con lo obtenido en esta investigación.

Para el resto de los resultados obtenidos por Xing *et al.* (2017); Xu *et al.*, (2015) y Procentese *et al.*, (2017), en este trabajo se obtuvo de 8.82 – 95.20% más producto como resultado de la fermentación, con un rendimiento también mayor que fue desde 38.11 – 90.09% más, por último, respecto a la productividad, en este trabajo se obtuvo de 85.02 – 98.15% más productividad. Estos valores soportan sólidamente que el proceso fermentativo se desempeñó con buenos resultados, incluso mejorando lo obtenido por otras investigaciones. Los resultados apoyan fuertemente la posibilidad de abandonar pronto lo prometedor que son los DES en el proceso de obtención de etanol de segunda generación para pasar a la viabilidad sostenible en la obtención de bioetanol.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los fundamentos teóricos de esta investigación se cumplen. La caracterización del rastrojo de piña como materia prima en función de lignina total, ASL y celulosa, arrojó valores promedio de 28.59, 9.82 y 12.64% respectivamente, estos valores iniciales permitieron apreciar el potencial del rastrojo de piña para ser pretratado químicamente con los DES en el proceso de obtención de bioetanol.

Con el pretratamiento químico al rastrojo de piña, empleando el DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$; la lignina total se redujo un 20% en promedio, la ASL disminuyó en promedio un 50% y la celulosa se incrementó en un promedio de 200%. Este tipo de efectos facilitaron la sacarificación del residuo pretratado y la fermentación efectiva del hidrolizado enzimático.

Con los diseños experimentales para el pretratamiento, se definieron las condiciones óptimas operativas para maximizar la concentración de azúcares totales liberada en la hidrólisis enzimática (<55 (g/L)). El DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ resultó ser el más adecuado para pretratar rastrojo de piña con una relación molar de 1:2.43, una RSL de 1:23.16 g/g y una duración de 14.14 h bajo una temperatura de 90 °C.

En la hidrólisis enzimática se analizaron dos principales factores, los moles de ácido fórmico (CH_2O_2) en la síntesis del DES para el pretratamiento y el % de enzima empleado en la hidrólisis enzimática, con estos factores, se maximizó la concentración de azúcares totales liberada en la sacarificación del residuo (<52 (g/L)). Este diseño experimental definió el DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ con una relación molar de 1:3.35 y una carga enzimática de 5.38% como los niveles óptimos de operación. La carga enzimática, en su término cuadrático, fue el factor más significativo, seguido del factor cuadrático del número de moles del ácido fórmico en el DES. Estos resultados apoyan que se eligieron de manera adecuada los factores y sus respectivos niveles para el análisis.

Conclusiones y Recomendaciones

El estudio del proceso de fermentación por lotes de los azúcares reductores obtenidos del rastrojo de piña, estableció que una carga de extracto de levadura de 2 g/L, permitió la obtención de una concentración de etanol de 10.42 g/L en un tiempo de 12 h.

El proceso de pretratamiento se escaló 30.5 veces (4 g → 122.23 g), a través de HPLC se registró una concentración de 28 (g/L) solo de glucosa sin detectar xilosa, este resultado podría no ser del todo adverso, debido a que puede sugerir que para pretratar mayores cantidades de residuo es posible que se requiera una menor cantidad de solvente para obtener mejores resultados. Este efecto es el que influyó directamente en los resultados y viabilidad de la fermentación para obtener etanol.

Como conclusión global de esta investigación, se puede confirmar que el rastrojo de piña es un material lignocelulósico viable en el que se puede emplear los DES como pretratamiento químico sustentable en el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación. La recuperación del DES en todos los pretratamientos hechos fue posible hasta en un 80% del volumen total utilizado, este es uno de los factores que contribuyen a la sustentabilidad del proceso en general.

RECOMENDACIONES

El tipo de material lignocelulósico es un factor determinante en el pretratamiento, se recomienda para cada tipo de residuo, realizar pruebas aisladas de pretratamiento con DES y posteriormente plantear un diseño experimental completo para definir las condiciones específicas de operación en base a la variable de respuesta seleccionada.

El DES tiene una alta agresividad respecto a la remoción de lignina, llegando al grado de remover también parte de la celulosa disponible en el material lignocelulósico, para evitar este efecto no deseado, se recomienda iniciar la síntesis del DES con relaciones molares de 1:1 o 1:1.5 e ir evaluando el efecto del mismo sobre el residuo.

Derivado del empleo de los DES sobre cáscara, corana y corazón de la piña en comparación con su rastrojo, se puede argumentar que los DES podrían tener mejores resultados en materiales lignocelulósicos más “duros” como, por ejemplo, maderas o mazorcas de maíz; un residuo lignocelulósico “suave” podría implicar la remoción no deseada de celulosa disponible en el residuo.

Para el pretratamiento, se recomienda hacer escalamientos de 5 veces para hacer comparaciones y detectar a tiempo un cambio substancial en los resultados e ir ajustando las RSL del DES respecto al residuo lignocelulósico necesario para lograr pretratar mayor cantidad de residuo con menor volumen del DES y obtener mejores concentraciones de azúcares totales.

Antes de emplear el DES reciclado, se recomienda someterlo a centrifugación y posteriormente calentarlo a 100 °C durante 30 min para evaporar la humedad que haya podido adquirir durante su almacenamiento y así obtener la máxima eficiencia del DES reutilizado.

Es muy probable que con la centrifugación y la evaporación aplicada al DES reciclado, se pueda precipitar y recuperar lignina de alta pureza; se recomienda hacer una evaluación de la misma si fuera el caso, la lignina recuperada podría ser un subproducto de alto valor agregado.

Esta investigación deja abierta la posibilidad de explorar cuantos ciclos de pretratamiento se pueden llevar a cabo con el DES reciclado, comparar la eficiencia en cada ciclo de reutilización del mismo DES y de esta forma cuantificar el beneficio económico por la implementación de los DES. Una línea de investigación derivada del empleo de los DES es la alta probabilidad de extracción de lignina de alta pureza disuelta en el DES recuperado, la lignina también tiene varios campos de aplicación debido a que se emplea como compuesto plataforma o reactivo de partida para la síntesis de productos químicos con diversas aplicaciones como fármacos, colorantes, conservantes, polímeros, entre otros. Los compuestos aromáticos polihidroxilados catecoles, quinonas, alquilaril éteres, etc. son una de las clases más importantes de compuestos empleados como intermedios o compuestos finales en farmacología, síntesis orgánica, y también en la industria electrónica. Por todo esto, lograr extraer lignina de alta pureza puede ser un producto secundario de alto impacto en el proceso de obtención de etanol mediante el empleo de los DES sobre material lignocelulósico; sin dejar de mencionar que este beneficio adicional también contribuiría al beneficio económico del proceso en general.

ANEXOS

ANEXO A1

Diferentes sustancias HBA y HBD documentadas en la formación de los DES
(Francisco *et al.*, 2013).

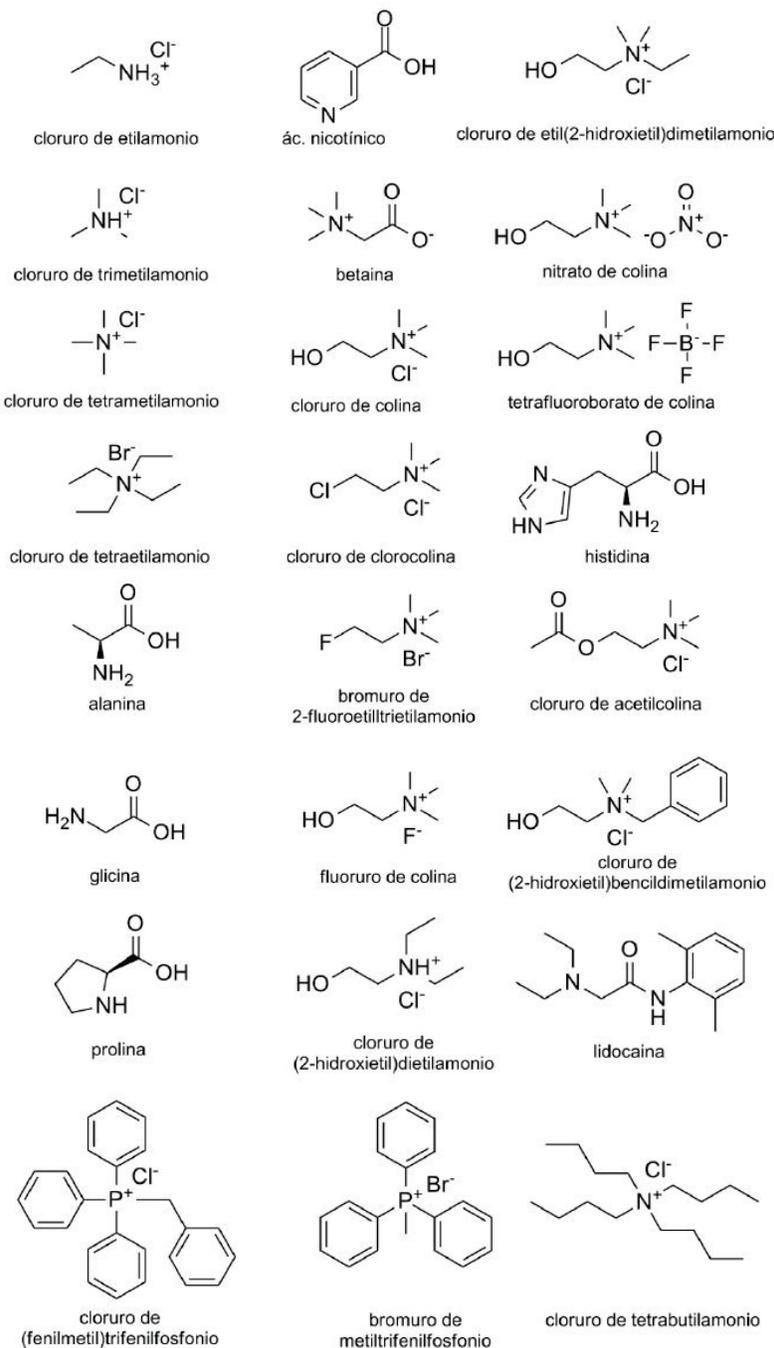


Figura A1 Aceptores de hidrógeno descritos para la síntesis de DES

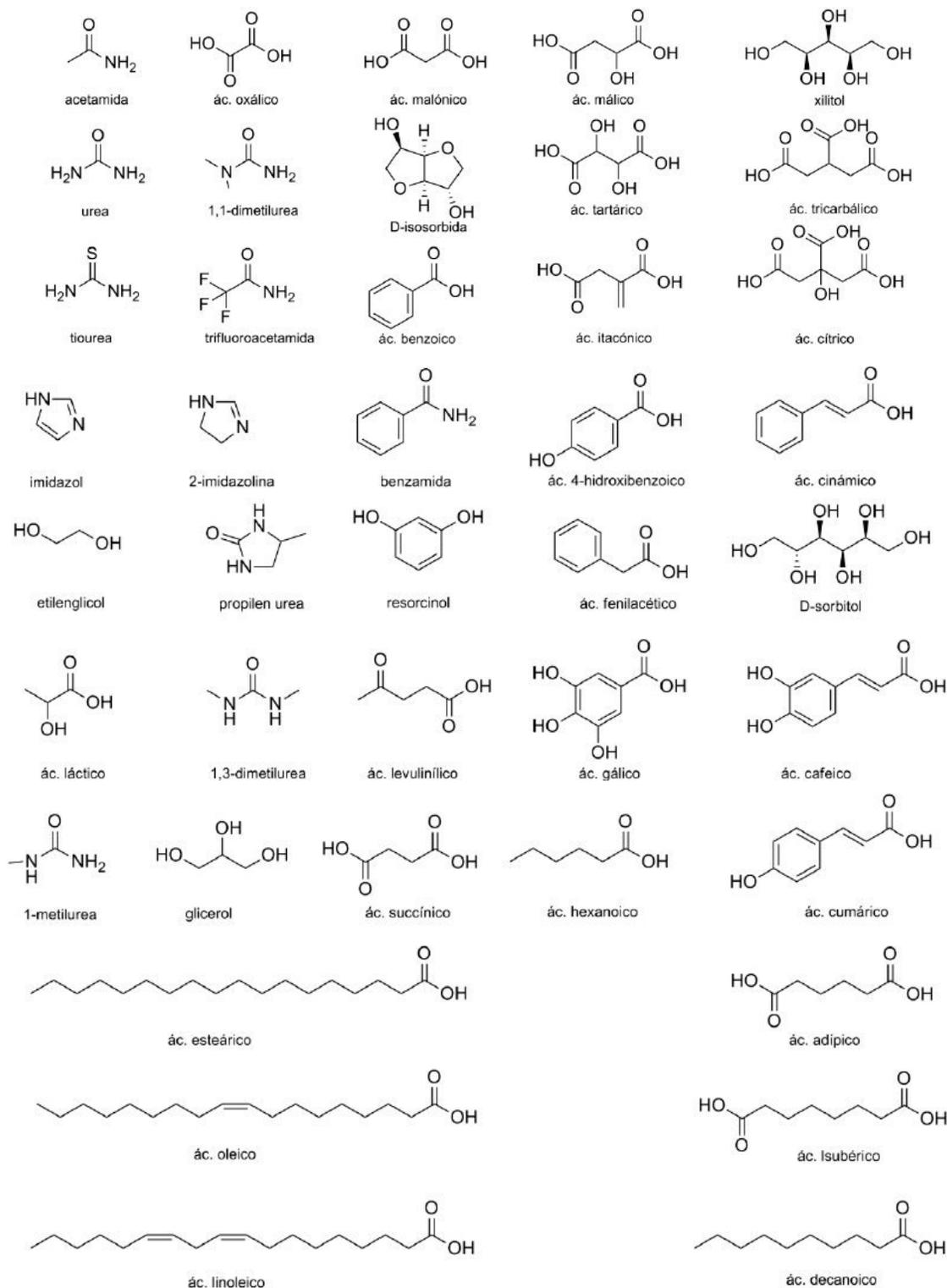


Figura A2 Donantes de hidrógeno descritos para la síntesis de DES

ANEXO B

TÉCNICA NREL

La técnica NREL referenciada en la sección 2.3 en esta investigación y descrita por Sluiter *et al.*, (2008) se siguió y se adaptó de la siguiente manera:

1. Seleccionar 9 crisoles y 9 crisoles gooch para hacer pruebas por triplicado.
2. Colocar los 18 crisoles en un horno durante 2 h a 120 °C, abrir el horno hasta que disminuya la temperatura a 100 °C
3. Poner los crisoles en un desecador y dejar enfriar 20 min
4. Pesar los crisoles en una balanza analítica y anotar el peso de cada crisol
5. Repetir el proceso dos o tres veces hasta que el peso de cada crisol sea constante por lo menos en tres puntos decimales
6. Pesar 9 papeles filtro del mismo diámetro del fondo de los crisoles gooch
7. Colocar los residuos de piña (cáscara, corazón, corona y rastrojo) en trozos pequeños en una charola de aluminio dentro del horno durante 24 h a 80 °C, abrir la estufa a esa temperatura, moler y seleccionar un tamaño de partícula entre 0.6 – 1.18 mm
8. Determinar la humedad de los residuos deshidratados en una termobalanza, la humedad debe ser menor al 10%
9. Preparar una solución de ácido sulfúrico al 72%
10. Pesar 0.3 g de cada residuo por triplicado y colocarlos en tubos de ensaye
11. Introducir los tubos de ensaye en un baño de agua caliente a 30 °C ± 3 °C
12. Agregar 3 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo de la muestra y mantenerlos dentro del baño de agua caliente durante 1 h
13. Mezclar con un agitador cada tubo cada 5 min sin sacar el tubo del baño de agua caliente
14. Al término de la hora, diluir la concentración del ácido sulfúrico del 72% al 4% agregando 84 mL de agua desionizada o destilada en un frasco de vidrio con tapa roscable

15. Introducir los frascos en autoclave durante 1 h a 121 °C, abrir autoclave hasta que esté totalmente despresurizada
16. Dejar enfriar los frascos hasta temperatura ambiente antes de abrirlos
17. Vaciar el contenido de los frascos (uno a la vez) hacia un matraz kitasato con la ayuda de una bomba de vacío, sobre el matraz kitasato se antepone una alargadera tipo Walter y sobre ella un crisol gooch con papel filtro en su interior
18. Recolectar el licor filtrado en un recipiente adecuado para determinar la lignina diluida en ácido, el licor puede ser almacenado hasta por dos semanas en congelación
19. Medir la absorbancia del licor entre 0.7 y 1 a una longitud de onda de 240 nm en un espectrofotómetro UV, también, usar otra muestra del licor para medir concentración de azúcares en un HPLC
20. Colocar cada crisol gooch dentro de otro crisol de porcelana. El sólido retenido en los crisoles gooch se introduce durante cuatro horas al horno a 120 °C, se deja enfriar en un desecador durante 20 min y posteriormente se toma el peso de cada par de crisoles
21. Introducir los crisoles al horno de mufla a 575 °C durante 4 h, el horno de mufla se abre hasta que la temperatura descienda a 100 °C
22. Tomar el peso de los crisoles que ahora contienen las cenizas de los sólidos y del papel filtro para poder obtener por diferencia de pesos el total de las cenizas.
23. Los datos obtenidos de la absorbancia y del HPLC, contemplando sus respectivas diluciones, son empleados en las ecuaciones en la sección 2.3

ANEXO C1

La Tabla C1, muestra el análisis de varianza, con el que se concluyó la influencia de cada factor mediante un análisis de valores p (probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula), un valor $p < 0.05$ (α , valor de significancia) rechaza la hipótesis nula (todos los factores tienen el mismo efecto sobre la variable de respuesta) y se acepta la hipótesis alternativa (no todos los factores tienen el mismo efecto sobre la variable de respuesta). Estadísticamente se comprobó que por sí solo el factor de la RSL (g/g) no tuvo un efecto significativo durante el pretratamiento al igual que el factor del tiempo (h). El número de moles de CH_2O_2 en el DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ si tuvo un efecto significativo, así como su propio término cuadrático. La interacción de los factores de RSL (g/g) y los moles de CH_2O_2 también resultaron estadísticamente significativos revelando que el efecto de un factor en la respuesta depende del resto de los factores en el término.

Tabla C1 ANOVA, regresión de superficie de respuesta para Azúcares Totales (g/L)

Fuente	Grados Libertad (GL)	Suma Cuadrados Ajustados	Media Cuadrados Ajustados	Valor F	Valor p
Modelo	9	2831.42	314.60	9.88	0.003
Lineal	3	1672.92	557.64	17.51	0.001
RSL (g/g)	1	85.85	85.85	2.70	0.145
Tiempo (h)	1	62.05	62.05	1.95	0.205
Ác. Fórmico (mol)	1	1525.02	1525.02	47.89	0.000
Cuadrado	3	914.91	304.97	9.58	0.007
RSL (g/g) ²	1	106.46	106.46	3.34	0.110
Tiempo (h) ²	1	23.39	23.39	0.73	0.420
Ác. Fórmico (mol) ²	1	838.53	838.53	26.33	0.001
Interacción de 2 factores	3	243.59	81.20	2.55	0.139
RSL (g/g)*Tiempo (h)	1	29.58	29.58	0.93	0.367
RSL (g/g)*Ác. Fórmico (mol)	1	188.45	188.45	5.92	0.045
Tiempo (h)*Ác. Fórmico (mol)	1	25.57	25.57	0.80	0.400
Error	7	222.92	31.85		
Falta de ajuste	5	161.14	32.23	1.04	0.556
Error puro	2	61.78	30.89		
Total	16	3054.34			

ANEXO C2

La Figura C1 muestra la gráfica de probabilidad normal de residuos del modelo obtenido en el diseño experimental para la optimización del pretratamiento del RP2, en la figura se puede apreciar que todos los residuos se encuentran cerca de la normalidad y distribuidos aleatoriamente, también, las diferencias entre los valores observados y los valores predichos por la recta de regresión aplican para el modelo con un ajuste del 92.70%, este valor soporta la confiabilidad de las correlaciones del modelo mostrado en la ecuación 3.1.

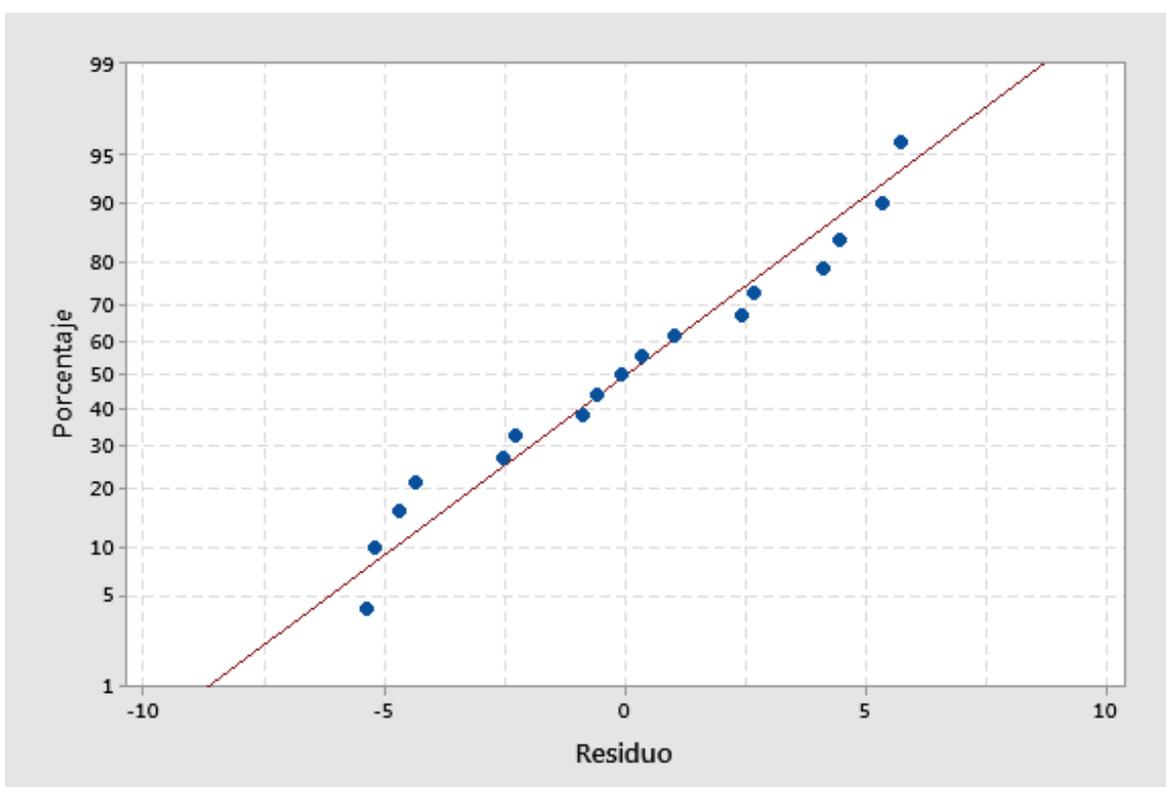


Figura C1 Gráfica de probabilidad normal en la optimización del pretratamiento del RP2. La respuesta es Azúcares Totales (g/L)

ANEXO C3

La Tabla C2, muestra el análisis de varianza, con el que se concluyó la influencia de cada factor mediante un análisis de valores p (probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula), un valor $p < 0.05$ (α , valor de significancia) rechaza la hipótesis nula (todos los factores tienen el mismo efecto sobre la variable de respuesta) y se acepta la hipótesis alternativa (no todos los factores tienen el mismo efecto sobre la variable de respuesta). Estadísticamente se comprobó que por sí solos los factores de carga de enzima y moles de ácido fórmico en la síntesis del DES no tuvieron un efecto significativo durante el proceso. Sin embargo, los términos cuadráticos de la carga de enzima y el número de moles de ácido fórmico en el DES $\text{ChCl}:\text{CH}_2\text{O}_2$ si tuvo un efecto significativo.

Tabla C2 ANOVA, regresión de superficie de respuesta para Azúcares Totales (g/L)

Fuente	GL	Suma Cuadrados Ajustados	Media Cuadrados Ajustados	Valor F	Valor p
Modelo	5	1814.91	362.98	4.46	0.063
Lineal	2	559.36	279.68	3.43	0.115
Ác. Fórmico (mol)	1	279.59	279.59	3.43	0.123
% Enzima	1	279.77	279.77	3.43	0.123
Cuadrado	2	1173.24	586.62	7.20	0.034
Ác. Fórmico (mol) ²	1	632.56	632.56	7.76	0.039
% Enzima ²	1	877.42	877.42	10.77	0.022
Interacción de 2 factores	1	82.31	82.31	1.01	0.361
Ác. Fórmico (mol)*% Enzima	1	82.31	82.31	1.01	0.361
Error	5	407.37	81.47		
Falta de ajuste	3	307.70	102.57	2.06	0.344
Error puro	2	99.67	49.83		
Total	10	2222.28			

ANEXO C4

La Figura C2 muestra la gráfica de probabilidad normal de residuos del modelo obtenido en el diseño experimental para la optimización de la hidrólisis enzimática del RP2 pretratado con DES, en la figura se puede apreciar que todos los residuos se encuentran cerca de la normalidad y distribuidos aleatoriamente, también, las diferencias entre los valores observados y los valores predichos por la recta de regresión aplican para el modelo con un ajuste del 81.67%, este valor soporta la confiabilidad de las correlaciones del modelo mostrado en la ecuación 3.2.

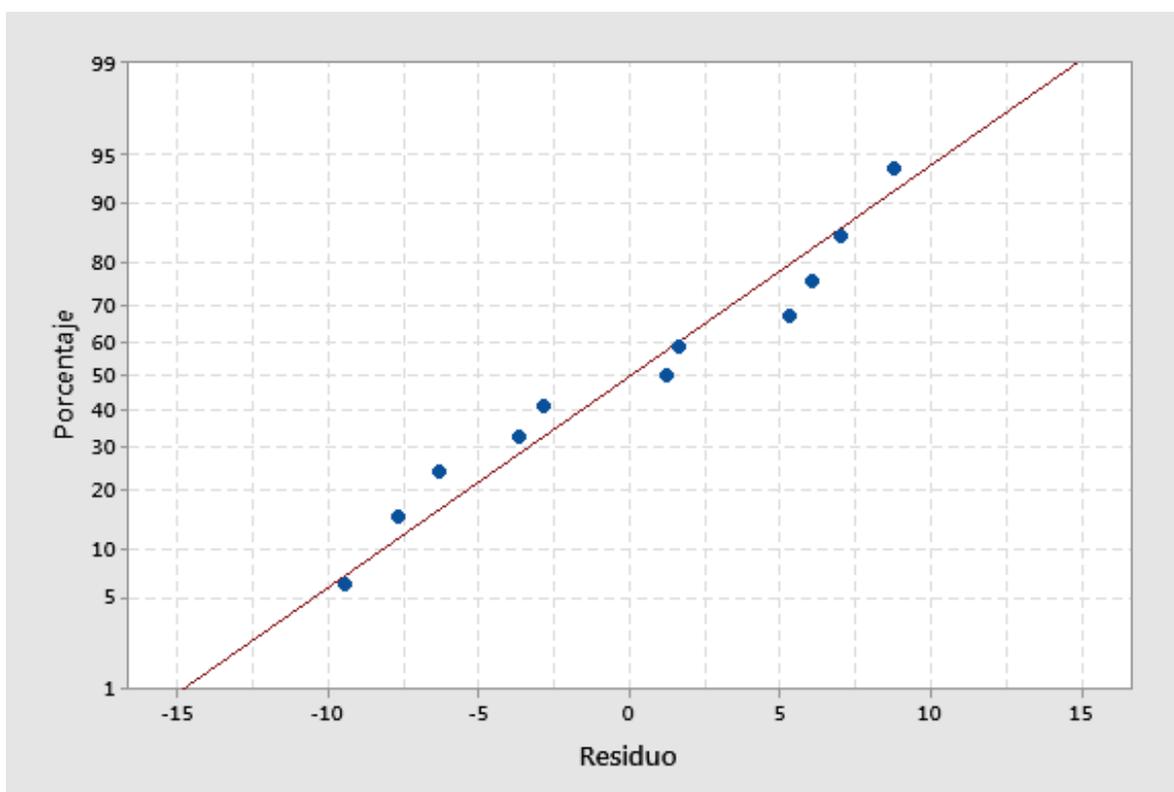


Figura C2 Gráfica de probabilidad normal en la optimización de la hidrólisis enzimática del RP2 pretratado con DES. La respuesta es Azúcares Totales (g/L)

ANEXO C5

Tabla C3 Resultados de la cinética de fermentación

Muestra horas	% Viabilidad			Células/mL			Biomasa (g/L)		
	EXTRACTO DE LEVADURA (g/L)								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	93.85	100	96.97	3.05E+06	3.10E+06	3.20E+06	0.521	0.522	0.525
2	98.71	99.33	96.63	7.65E+06	7.45E+06	8.60E+06	0.6585	0.6525	0.687
4	99.38	99.55	99.44	3.18E+07	3.31E+07	2.65E+07	1.383	1.4205	1.2225
6	96.35	99.16	100.00	6.60E+07	5.90E+07	4.15E+07	2.409	2.199	1.674
8	98.41	99.43	99.82	7.75E+07	8.73E+07	1.39E+08	2.754	3.0465	4.584
10	100.00	99.57	99.79	8.90E+07	1.16E+08	2.36E+08	3.099	3.894	7.494
12	100.00	99.19	100.00	8.48E+07	9.15E+07	8.93E+07	2.9715	3.174	3.1065
14	100.00	100.00	100.00	1.32E+08	1.22E+08	1.13E+08	4.389	4.0965	3.8265
16	99.35	99.44	99.44	1.14E+08	1.33E+08	2.68E+08	3.849	4.4115	8.4615
18	97.35	100.00	100.00	1.10E+08	1.09E+08	1.16E+08	3.7365	3.6915	3.894
20	100.00	100.00	100.00	1.20E+08	9.98E+07	1.94E+08	4.029	3.4215	6.234
22	100.00	100.00	100.00	9.53E+07	1.17E+08	1.31E+08	3.2865	3.939	4.344
24	100.00	100.00	100.00	8.70E+07	1.17E+08	1.31E+08	3.039	3.939	4.344

Tabla C4 Resultados de la cinética de fermentación

Muestra horas	Azúcares						Azúcares Totales (g/L)			Etanol (g/L)		
	Glucosa (g/L)			Xilosa (g/L)								
	EXTRACTO DE LEVADURA (g/L)											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	27.150	28.042	27.218	0.000	0.000	0.000	27.150	28.042	27.218	0.000	0.000	0.000
2	27.814	25.722	27.338	0.000	0.000	0.000	27.814	25.722	27.338	0.000	0.000	0.000
4	22.566	18.138	22.440	0.000	0.000	0.000	22.566	18.138	22.440	0.000	0.000	0.000
6	16.510	16.798	15.878	0.000	0.000	0.000	16.510	16.798	15.878	5.972	7.440	7.842
8	5.568	5.648	5.327	0.000	0.000	0.000	5.568	5.648	5.327	6.648	7.248	7.096
10	0.816	0.796	0.730	1.578	1.396	1.320	2.394	2.193	2.050	9.563	9.845	9.291
12	0.589	0.815	0.575	1.259	1.411	1.329	1.848	2.226	1.904	8.870	10.420	9.650
14	0.700	0.778	0.658	1.290	1.331	1.293	1.990	2.109	1.950	8.890	9.771	9.349
16	0.700	0.949	0.661	1.285	1.408	1.291	1.985	2.356	1.953	9.474	10.444	9.218
18	0.465	0.809	0.686	1.308	1.368	1.316	1.773	2.177	2.003	9.559	10.399	9.189
20	0.800	0.893	0.711	1.331	1.329	1.341	2.131	2.221	2.053	9.644	9.693	9.161
22	0.649	0.488	0.556	1.234	1.296	1.221	1.883	1.784	1.778	8.704	9.308	8.236
24	1.245	0.631	0.408	1.430	1.265	1.169	2.675	1.896	1.576	8.453	8.668	7.716
36	0.701	0.623	0.194	1.241	1.145	1.061	1.943	1.768	1.255	8.374	8.056	7.385

ANEXO C6

Tabla C5 Rendimientos, productividad, velocidades globales, específicas y eficiencia del estudio de las tres cinéticas de fermentación

$Y_{x/s}$ (g/g)			$Y_{p/s}$ (g/g)			Q (g/L*h)		
EXTRACTO DE LEVADURA (g/L)								
1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.097	0.103	0.102	0.351	0.404	0.381	0.739	0.868	0.804
r_x (g/L*h)			r_s (g/L*h)			r_p (g/L*h)		
EXTRACTO DE LEVADURA (g/L)								
1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.204	0.221	0.215	2.109	2.151	2.110	0.739	0.868	0.804
μ (h ⁻¹)			V_s (g/g*h)			V_p (g/g*h)		
EXTRACTO DE LEVADURA (g/L)								
1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.069	0.070	0.069	0.710	0.678	0.679	0.249	0.274	0.259
η (%)								
EXTRACTO DE LEVADURA (g/L)								
1			2			3		
68.602			78.988			74.600		

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott Andrew P., Capper Glen, Davies David L., Rasheed Raymond K. y Tambyrajah Vasuki, 2003. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *ChemComm* **1**(1):70-71, ISSN: 1364-548X.
DOI: <https://doi.org/10.1039/b210714g>
2. Abdul Khalil H. P. S., Siti Alwani M. y Mohd Omar A. K., 2006. Chemical composition, anatomy, lignin distribution, and cell wall structure of Malaysian plant waste fibers. *Bioresources* **1**(2):220-232, ISSN: 1930-2126.
3. Aditiya H.B., Mahlia T.M.I., Chong W.T., Nur Hadi, Sebayang A.H., 2016. Second-generation bioethanol production: a critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **66**(1):631-653, ISSN: 1364-0321.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
4. Alam Shamsul M. D., Arifuzzaman G. M. Khan, and Abdur Razzaque S. M., 2009. Estimation of Main Constituents of *Ananas comosus* (Pineapple) Leaf Fiber and Its Photo-Oxidative Degradation. *Journal of Natural Fibers* **6**(2):138-150, ISSN: 1544-0478, E-ISSN: 1544-046X.
DOI: <https://doi.org/10.1080/15440470902955369>
5. Álvarez Maciel Carlos, 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Revista Virtual Pro* **1**(359):63-89, ISSN: 1665-952X, Página Web:
<https://www.revistavirtualpro.com/biblioteca/biocombustibles-desarrollo-historico-tecnologico-mercados-actuales-y-comercio-internacional>
6. Antonio Cruz Rocío, Ana M. Mendoza Martínez, M. Yolanda Chávez Cinco, J. Luis Rivera Armenta, M. Javier Cruz Gómez, 2011. Aprovechamiento del bagazo de piña para obtener celulosa y bioetanol. *Afinidad Revista de Química Teórica y Aplicada* **68**(551):38-43, ISSN: 0001-9704.
7. Asim M., Abdan Khalina, Jawaid M., Nasir M., Dashtizadeh Zahra, Ishak M. R. and Hoque M. Enamul, 2015. A Review on Pineapple Leaves Fibre and Its Composites. *International Journal of Polymer Science* **2015**(1):1-16, ISSN: 1687-9422, E-ISSN: 1687-9430. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/950567>

8. Atwater Charles, 2001. Choline. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry **9**(1):99-102, ISBN: 9783527303854, E-ISBN: 9783527306732.
DOI: https://doi.org/10.1002/14356007.a07_039
9. Badiei Marzieh, Nilofar Asim, Jamilah M Jahim and Kamaruzzaman Sopian, 2014. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *Apacbee Procedia* **9**(1):170-174, ISSN: 2212-6708.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.030>
10. Ban-Koffi L. and Han Y. W., 1990. Alcohol production from pineapple waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **6**(1):281-284, ISSN: 0959-3993, E-ISSN: 1573-0972. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01201297>
11. Bertrand Emmanuel, Vandenberghe P. S. Luciana, Soccol Carlos Ricardo, Sigoillot Jean-Claude and Faulds Craig., 2016. First generation bioethanol. *Green Fuels Technology* **1**(1):175-212, ISBN: 978-3-319-30203-4, E-ISBN: 978-3-319-30205-8. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_8
12. Cherian B. M., Lopes L. A., Ferreira S. S., Thomas S., Pothan L. A., Kottaisamy M., 2010. Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam explosion. *Carbohydrate Polymers* **81**(3):720-725, ISSN: 0144-8617
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.046>
13. Choonut Aophat, Saejong Makorn, Sangkharak Kanokphorn, 2014. The Production of Ethanol and Hydrogen from Pineapple Peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. *Energy Procedia* **52**(1):242-249, ISSN: 1876-6102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.075>
14. Clarke Coby J., Wei-Chien Tu, Oliver Levers, Andreas Bröhl, and Jason P. Hallett, 2018. Green and sustainable solvents in chemical processes. *Chemical Reviews* **118**(2):747-800, ISSN: 0009-2665, E-ISSN: 1520-6890.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00571>
15. Cuervo Laura, Folch Jorge Luis, Quiroz Rosa Estela, 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.* **13**(3):11-25, ISSN: 0188-4786.
16. Daud Zawawi, Mohd Zainuri Mohd Hatta, Angzz Sari Mohd Kassim, Halizah Awang and Ashuvila Mohd Aripin, 2014. Exploring of agro waste (pineapple leaf,

- corn stalk, and napier grass) by chemical composition and morphological study. *BioResources* **9**(1):872-880, ISSN: 1930-2126.
17. Doran Pauline M., 1995. Principios de ingeniería de los bioprocesos, 1a edición. Edit. ACRIBIA, ISBN: 84-200-0853-2.
 18. Ertola Rodolfo, Yantorno Osvaldo y Mignone Carlos, 2006. Microbiología Industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento Asuntos Científicos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
 19. Fang Chuanji, Mette Hedegaard Thomsen, Christian Grundahl Frankaer, Grzegorz Przemyslaw Brudecki, Jens Ejbye Schmidt E Inas Muen Alnashef, 2017. Reviving pretreatment effectiveness of deep eutectic solvents (DESs) on lignocellulosic date palm residues by prior recalcitrance reduction. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **56**(12):3167-3174, ISSN: 0888-5885, E-ISSN: 1520-5045. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04733>
 20. FAOSTAT, 2018. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, página web: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/qc/visualize>
 21. Francisco María, Adriaan Van Den Bruinhorst and Maaïke C. Kroon, 2013. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents. *Angewandte Minireviews* **52**(11):3074-3085, ISSN: 1433-7851. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>
 22. Francisco María, Adriaan Van Den Bruinhorst and Maaïke C. Kroon, 2014. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMS): screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chemistry* **2012**(14): 2153-2157, ISSN: 1463-9262, E-ISSN: 1463-9270. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2GC35660K>
 23. Gunny Nagoor Ahmad Anas, Arbain Dachyar, Nashef Enas Muen, Jamal Parveen, 2015. Applicability evaluation of Deep Eutectic Solvents–Cellulase system for lignocellulose hydrolysis. *Bioresource Technology* **181**(1):297–302, ISSN: 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.057>
 24. Guo Zongwei, Zhang Qilin, You Tingting, Ji Zhe, Zhang Xun, Qin Yanlin, Xu Feng, 2019. Heteropoly acids enhanced neutral deep eutectic solvent

- pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of *Miscanthus x giganteus* under mild conditions. *Bioresource Technology* **293**(1):122036, ISSN: 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122036>
25. Hossain Nazia, Haji Zaini Juliana, Mahlia T.M.I., 2017. A review of bioethanol production from plant-based waste biomass by yeast fermentation. *International Journal of Technology* **8**(1):5-18, ISSN: 2086-9614.
DOI: <https://doi.org/10.14716/ijtech.v8i1.3948>
26. Hu Lihong, Pan Hui, Zhou Yonghong and Zhang Meng, 2011. Methods to improve lignin's reactivity as a phenol substitute and as replacement for other phenolic compounds: a brief review. *Bioresources* **6**(3):3515-3525, ISSN: 1930-2126.
27. Ingram L. O., H. C. Aldrich, A. C. C. Borges, T. B. Causey, Alfredo Martinez, Fernando Morales, Alif Saleh, S. A. Underwood, L. P. Yomano, S. W. York, Jesus Zaldivar, and Shengde Zhou, 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress* **15**(5):855-866, E-ISSN: 1520-6033.
DOI: <https://doi.org/10.1021/bp9901062>
28. Irías A. y Lutz G., 2014. Composición química de la biomasa residual de la planta de piña variedad MD2 proveniente de Guácimo, Limón. *Ciencia y Tecnología* **30**(2):27-34, ISSN: 0378-0524.
29. Jablonský Michael, Andrea Skulcová, Lucia Kamenská, Milan Vrska y Jozef Sima, 2015. Deep eutectic solvents: fraction of wheat straw. *Bioresources* **10**(4):8039-8047, ISSN: 1930-2126.
DOI: <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.8039-8047>
30. Jahid Mohammad, Gupta Akanksha and Sharma Durlubh Kumar, 2018. Production of Bioethanol from Fruit Wastes (Banana, Papaya, Pineapple and Mango Peels) Under Milder Conditions. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* **8**(3):1000327, ISSN: 2155-9821.
DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000327>
31. Jambo Siti Azmah, Rahmath Abdulla, Siti Hajar Mohd Azhar, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Pogaku Ravindra. 2016. A review on third generation

- bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **65**(1):756-769, ISSN: 1364-0321. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>
32. Jönsson Leif J., Carlos Martín, 2015. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* **199**(1):103-112, ISSN: 0960-8524.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
33. Kumar Adepu K., Bhumika S. Parikh y Mohanty Pravakar, 2015. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue. *Environmental Science and Pollution Research* **23**(10):9265-9275, ISSN: 0944-1344, E-ISSN: 1614-7499.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4>
34. Kumar Saini Jitendra, Reetu Saini, Lakshmi Tewari, 2015. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* **5**(4):337-353, ISSN:2190-572X, E-ISSN: 2190-5738.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
35. López Herrera M.; WingChing Jones R., Rojas Bourrillón A., 2009. Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas Comosus*). *Agronomía Costarricense* **33**(1):1-15, ISSN: 0377-9424.
36. López Herrera M.; WingChing Jones R., Rojas Bourrillón A., 2014. Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas Comosus*) para la alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana* **25**(2):383-392, ISSN: 2215-3608.
37. López Sarmiento Rogelio, 2010. Análisis de la cadena productiva de la piña (*Ananas comosus*) en la región del Papaloapan en el estado de Veracruz. Tesis para obtener el grado de licenciado en economía agrícola y agronegocios, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencias Socioeconómicas, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
38. Mansor Adila Maisyarah, Lim Jeng Shiun, Ani Farid Nasir, Hashim Haslenda, Ho Wai Shin, 2019. Characteristics of Cellulose, Hemicellulose and Lignin of

- MD2 Pineapple Biomass. CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS **72**(1):79-84, ISBN: 978-88-95608-69-3, ISSN: 2283-9216.
DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1972014>
39. Mokhtar M., Rahmat A. R., Hassan A., 2007. Characterization and treatments of pineapple leaf fibre thermoplastic composite for construction application. Universiti Teknologi Malaysia Institutional Repository, Chemical and Natural Resources Engineering research VOT N. 75147.
40. Montgomery Douglas C., 2013. Design and analysis of experiments, 8th edition, Edit. Wiley, ISBN: 978-1-118-14692-7.
41. Morales Martínez José Luis, 2019. Estudio de la producción de etanol mediante cultivo por lotes y continuo. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en ingeniería química, Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Orizaba, División de estudios de posgrado e investigación, Orizaba, Ver., México.
42. Morales Vite Xóchitl, 2013. Los disolventes en la química verde. Tesis para obtener el grado de ingeniero químico industrial, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
43. Mussatto S. I. y Teixeira J. A., 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. FORMATEX **1**(1):897-907, ISBN: 978-84-614-6195-0.
44. Niphadkar Shreyas, Praful Bagade y Shadab Ahmed, 2017. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. Biofuels **9**(2):229-238, ISSN: 1759-7269, E-ISSN: 1759-7277.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338>
45. Oiwoh O., Ayodele Bv., Amenaghawon Na., Okieimen Co., 2018. Optimization of bioethanol production from simultaneous saccharification and fermentation of pineapple peels using *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Sciences and Environmental Management **22**(1):54-59, ISSN: 1119-8362.
DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/jasem.v22i1.10>

46. Ovando Chacón S. L. y Waliszewski K. N., 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos, *Universidad y Ciencia* **21**(42):113-122, ISSN: 0186-2979.
47. Pérez De Los Ríos Antonia, 2007. Los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimática. Tesis para obtener el grado de doctora en ingeniería química. Universidad de Murcia, Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química. Murcia, España.
48. Pérez J., Muñoz Dorado J., T. de la Rubia, Martínez J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* **5**(2):53-63, ISSN: 1139-6709.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
49. Pornpunyapat Jutarut, Chotigeat Wilaiwan, Chetpattananondh Pakamas, 2014. Bioethanol production from pineapple peel juice using *Saccharomyces cerevisiae*. *Advanced Materials Research* **875-877**(1):242-245, ISSN:1662-8985. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.875-877.242>
50. Procentese Alessandra, Johnson Erin, Orr Valerie, Garruto Campanile Anna, Wood Jeffery A., Marzocchella Antonio, Rehmans Lars, 2015. Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. *Journal Bioresource Technology* **192**(1):31-36, ISSN: 0960-8524.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.053>
51. Procentese Alessandra, Francesca Raganati, Giuseppe Olivieri, Maria Elena Russo, Lars Rehmans, Antonio Marzocchella, 2017. Low-energy biomass pretreatment with deep eutectic solvents for bio-butanol production. *Bioresource Technology* **243**(1):464-473, ISSN: 0960-8524.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.143>
52. Pumphrey Brian y Julien Christian, 1996. An introduction to fermentation, fermentation basics.
53. Quesada Solís K., Alvarado Aguilar P., Sibaja Ballesteros R., Vega Baudrit J., 2005. Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas Comosus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **6**(2):157-179, E-ISSN: 0121-6651.

54. Refaat A. A., 2012. Biofuels from Waste Materials. *Comprehensive Renewable Energy* **5**(1):217-261, ISBN: 9780080878720, E-ISBN: 9780080878737.
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087872-0.00518-7>
55. SAGARPA, 2017. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Planeación agrícola nacional 2017-2030 **1**(1):1-16.
56. Sánchez Hernández Miguel Ángel, Ahuja Mendoza Saúl y Acevedo Gómez Ricardo, 2015. Producción de piña cayena lisa y MD2 (*Ananas comosus* L.) En condiciones de Loma Bonita, Oaxaca. *Ciencias de la Biología y Agronomía Handbook T-I*, Edit. ECORFAN **1**(1):100-110, ISBN: 978-607-8324-40-8.
57. Sánchez Pardo María Elena, Ramos Cassellis María Elena, Mora Escobedo Rosalva, Jiménez García Epifanio, 2014. Chemical characterisation of the industrial residues of the pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* **3**(2B):53-56, ISSN: 2325-7458, E-ISSN:2325-744X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/jacen.2014.32b009>
58. Satlewal Alok, Ruchi Agrawal, Samarthya Bhagia, Joshua Sangoro, Arthur J. Ragauskas, 2018. Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Recent developments, challenges and novel opportunities. *Biotechnology Advances* **36**(8):2032-2050, ISSN: 0734-9750.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.009>
59. SEDARPA-1 (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Rural y Pesca), 2018. Sector agrícola Atlas agroalimentario veracruzano **1**(1):20.
60. SEDARPA-2 (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Rural y Pesca), 2018. Cierre 2017, estadísticas agrícolas, página web:
<http://www.veracruz.gob.mx/agropecuario/cierre-2017-estadisticas-agricolas/>
61. Shackelford F. James, 2005. Introducción a la ciencia de materiales para ingenieros, 6ta edición. Edit. Pearson, ISBN: 978-84-205-4451-9.
62. Shinde V.A. and Patil R.B., 2016. Production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* using orange peels and banana peels. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **5**(8):280-284, ISSN: 2319-7692, E-ISSN: 2319-7706. DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.029>

63. SIAP-1 (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2018. Avance de siembras y cosechas, resumen nacional por estado, página web: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
64. SIAP-2 (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018 1(1):128-129.
65. Sierra, Angélica; Meléndez, Lidia; Ramírez Monroy, Armando; Arroyo, Maribel, 2014. La química verde y el desarrollo sustentable. Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo **5**(9):1-16, E-ISSN: 2007-7467.
66. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., and Crocker D., 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, laboratory analytical procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618.
67. Smith Emma L., Andrew P. Abbott, Y Karl S. Ryder, 2014. Deep eutectic solvents (DES) and their applications. Chemical Reviews **114**(21):11060-11082, ISSN: 0009-2665, E-ISSN: 1520-6890.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/cr300162p>
68. Soontornchaiboon Waesarat, Chunchart Orawan, Pawongrat Ratchapol, 2016. Ethanol production from pineapple waste by co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 and *Candida shehatae* KCCM 11422. Asia Pacific Journal of Science and Technology (APST) **21**(2):347-355, E-ISSN: 0859-3957.
DOI: <http://dx.doi.org/10.14456/kkurj.2016.48>
69. Sun Ye y Cheng Jiayang, 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Journal Bioresource Technology **83**(1):1-11, ISSN: 0960-8524. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00212-7)
70. Tang Xing, Zuo Miao, Li Zheng, Liu Huai, Xiong Caixia, Zeng Xianhai, Sun Yong, Hu Lei, Liu Shijie, Lei Tingzhou, and Lin Lu, 2017. Green processing of lignocellulosic biomass and its derivatives in deep eutectic solvents. Edit. Wiley online library, Chemistry and Sustainability CHEM-SUS-CHEM Energy and Materials **10**(13):2696-2706, E-ISSN: 1864-564X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201701012>
71. Teh Soek Sin, Loh Soh Kheang, and Mah Siau Hui, 2019. Development of choline-based deep eutectic solvents for efficient concentrating of

- hemicelluloses in oil palm empty fruit bunches. *Korean Journal Chemical Engineering* **36**(10):1619-1625, ISSN: 0256-1115, E-ISSN: 1975-7220.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11814-019-0348-1>
72. Tropea Alessia, Wilson David, La Torre Loredana G., Lo Curto Rosario B., Saugman Peter, Troy Davies Peter, Dugo Giacomo and Waldron Keith W., 2014. Bioethanol production from pineapple wastes. *Journal of Food Research* **3**(4):60-70, ISSN: 1927-0887, E-ISSN 1927-0895.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v3n4p60>
73. Van Maris Antonius J. A., Abbott Derek A., Bellissimi Eleonora, Van Den Brink Joost, Kuyper Marko, Luttik Marijke A. H., Wisselink H. Wouter, Scheffers W. Alexander, Van Dijken Johannes P., Pronk Jack T., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Journal Antonie Van Leeuwenhoek* **90**(4):391-418, ISSN: 0003-6072, E-ISSN: 1572-9699. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7>
74. Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods of Fietary, Neutral Detergent Fiber and Non-Starch Polusaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**(10):3583-3597, ISSN: 0022-0302.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
75. Vázquez H. J., Dacosta O, 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología* **8**(4):249-259, ISSN: 2594-0732.
76. Vidal Vides Christian, 2013. Disolventes eutécticos profundos (DES, Deep Eutectic Solvents): Nuevos disolventes biorenovables en catálisis homogénea mediada por metales de transición. Trabajo fin de máster en química y desarrollo sustentable, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Asturias, España.
77. Watkins Dereca, Md. Nuruddin, Mahesh Hosur, Alfred Tcherbi Narteh, Shaik Jeelani, 2015. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. *Journal of Materials Research and Technology* **4**(1):26-32, ISSN: 2238-7854. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.10.009>

78. Xing Wanru, Xu Guochao, Dong Jinjun, Han Ruizhi, Ni Ye, 2017. Novel dihydrogen-bonding deep eutectic solvents: pretreatment of rice straw for butanol fermentation featuring enzyme recycling and high solvent yield. *Chemical Engineering Journal* **333**(1):712-720, ISSN: 1385-8947. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.176>
79. Xu Guo-Chao, Ding Ji-Cai, Han Rui-Zhi, Dong Jin-Jun, Ni Ye, 2015. Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Journal Bioresource Technology* **203**(1):364-369, ISSN: 0960-8524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.002>
80. Yu Qiang, Zhang Aiping, Wang Wen, Chen Long, Bai Ruxue, Zhuang Xinshu, Wang Qiong, Wang Zhongming, Yuan Zhenhong, 2017. Deep eutectic solvents from hemicellulose-derived acids for the cellulosic ethanol refining of Akebia' herbal residues. *Bioresource Technology* **247**(1):705-710, ISSN: 0960-8524. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.159>
81. Zhang Cheng-Wu, Xia Shu-Qian, Ma Pei-Sheng, 2016. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents. *Journal Bioresource Technology* **219**(1):1-5, ISSN: 0960-8524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.026>
82. Zhang Heng, 2010. Enzymatic hydrolysis, bioethanol and biogas potential tests on cellulosic materials. Degree project, 45 ECTS, level E, for Master of Science in applied biotechnology, Uppsala University, Swedish.
83. Zhang Qinghua, Karine De Oliveira Vigier, Sébastien Royer and Francois Jérôme, 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**(21):7108-7146, ISSN: 0306-0012, E-ISSN: 1460-4744. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35178a>
84. Zulkefli Syarilaida, Emilia Abdulmalek, Mohd. Basyaruddin Abdul Rahman, 2017. Pretreatment of oil palm trunk in deep eutectic solvent and optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated oil palm trunk. *Renewable Energy* **107**(1):36-41, ISSN: 0960-1481. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.01.037>