

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES AL IMPLEMENTAR UN PRETRATAMIENTO DE OZONÓLISIS
COMBINADO CON EL MICROORGANISMO CELULOLÍTICO *Pseudomonas
Putida* PARA EL APROVECHAMIENTO DEL RASTROJO DE PIÑA**

PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA DE
INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

DANIELA RAMÍREZ VIALES

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

SAN JOSÉ, COSTA RICA

2020

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería Química como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química

Sustentante:



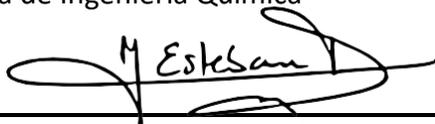
Daniela Ramírez Viales

Aprobado por:



Ing. Adolfo Ulate Brenes, Mag.
Profesor
Escuela de Ingeniería Química

Presidente del Tribunal



Ing. Esteban Durán Herrera, Ph.D.
Profesor catedrático
Escuela de Ingeniería Química

Director del Proyecto



Ing^a. Natalia Montero Rambla, Lic
Profesora
Escuela de Ingeniería Química

Lectora del proyecto



Lic. Juan Carlos Cambronero Heinrichs
Profesor Interino Licenciado
Facultad de Microbiología

Lector del proyecto

Ing^a. Camila Charpentier Alfaro
Profesora
Escuela de Ingeniería Química

Miembro Invitado

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José ,2020

Piensa en toda la belleza que aún hay alrededor y sé feliz.

-Ana Frank

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mí abuela Zule, por todo el amor y protección brindada a lo largo de mi vida, y a mi papá, por el apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi papá, por siempre apoyarme y motivarme a cumplir mis objetivos, por brindarme toda su sabiduría, paciencia y confianza. Y a mi familia, por siempre estar presente.

Agradezco al Ing. Esteban Durán, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su tutela y por el apoyo brindado durante el proceso. También, quiero externa mi agradecimiento a la Ing^a. Natalia Montero, por siempre escuchar mis dudas, preocupaciones y darme los mejores consejos. De igual forma, agradezco al Lic. Juan Carlos Cambronerero, por la paciencia, buenos consejos y brindarme todo el conocimiento necesario para desarrollar el proyecto.

Agradezco a mis amigos y colegas, por hacer más felices las estudiadas y los días en general. A tardes de café por todas las comidas deliciosas que tuvimos juntos a lo largo de la carrera y el cariño que nos tenemos. A Ronny, Foster, Jimena y Giancarlo por siempre estar cerca y motivarme a ser una mejor persona.

Agradezco al Dr. Carlos Rodríguez, por proporcionarme las instalaciones del Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) y la ayuda brindada. También, a los funcionarios de dicho centro de investigación como Annette, Michael, Gabriel y Didier por siempre evacuar mis dudas, por la paciencia y apoyo en las pruebas.

A Lic. Graciela Artavia, por abrirme las puertas del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) por todo el conocimiento, capacitación y análisis aportados en el proyecto. A Lizeth Rojas, laboratorista del centro, por toda la paciencia y buena actitud ante las adversidades. Por brindarme todo su apoyo y su conocimiento para obtener los mejores resultados.

Debo externar un especial agradecimiento a la Dr. Bárbara Miranda por el tiempo y ayuda brindada para realizar el análisis SEM de las muestras y a la Dr. Natalia Hernández por guiarme en los análisis de caracterización de lignina.

Finalmente, agradezco a Don Olman y Emilio por hacer de mis días en el laboratorio de la Escuela de Ingeniería Química momentos amenos e igualmente agradezco a Don Giovanni y a Luis por la capacitación y colaboración en el laboratorio de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

RESUMEN

Según la FAO, Costa Rica es el mayor proveedor de piña fresca a nivel mundial, por lo que en el país se ha dado una creciente demanda para la siembra de este producto no tradicional. Para el año 2018, CANAPEP reporta que el total de territorio ocupado para este propósito fue de 44 000 hectáreas y que por hectárea cultivada se llega a generar entre 97-250 tons de rastrojo (CANAPEP, 2018b; González, 2012). Este desecho al ser voluminoso y con alto contenido de humedad requiere de uso de herbicidas tóxicos para su deshidratación, que son dañinos para el suelo, y además permite la proliferación de la mosca de establo. Por ello, con el fin de velar por el cumplimiento del Decreto °N 26921-MAG -Reglamento de la Ley Protección Fitosanitaria artículo 88, se desea buscar alternativas para el aprovechamiento de este residuo, tanto para disminuir el impacto ambiental como para activar un nuevo sector económico. Debido a esto, el objetivo de este proyecto fue determinar la efectividad, en cuanto a producción de azúcares fermentables y deslignificación, de este material luego de utilizar un pretratamiento con ozonólisis y el microorganismo celulolítico *Psuedomonas putida* KT2440.

En la primera sección experimental, la hoja de rastrojo de piña proveniente de la Finca el Establo, se caracterizó y se encontró que contiene 85,2 % de humedad, 7,2 % de cenizas, 20,6 % de hemicelulosa, 28,7 % de celulosa, 10,07 % lignina insoluble y 1,90 % de lignina soluble.

Posteriormente, el material previamente seco y tamizado se pretrató con ozonólisis, en este proceso se estudió la influencia del tamaño de partícula, flujo de ozono, carga de sólido y pH mediante el análisis Taguchi L₉. De ello, se tuvo que el factor de mayor significancia para la variable respuesta de azúcares fermentables es la carga de sólido, de forma que al operar al 10 % m/v se logran concentraciones de hasta 1,7 g/ 100 mL, y se identificó la presencia de glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa en el medio líquido. Con respecto a la remoción de lignina insoluble en el sólido remanente, se determinó que los factores: carga de sólido, pH y tamaño de partícula poseen una influencia significativa, logrando una deslignificación de un 23 % al

operar con una carga de 5 %, el tamaño de partícula de 0,25 mm y a pH 3 y en el límite inferior porcentajes de hasta el 12 % en tan solo 30 minutos de exposición.

Seguidamente, se llevó a cabo un análisis preliminar mediante un Factorial 2^3 para determinar las condiciones del medio mínimo de cultivo que favorecen el crecimiento poblacional de la bacteria. Al utilizar el medio Luria-Bertani, pH 7 e inoculación de la cepa líquida se logró una velocidad de crecimiento específica de $0,3875 \text{ h}^{-1}$, que corresponde a la tasa más elevada, por lo tanto, se fijan dichas condiciones para llevar a cabo la hidrólisis.

Se realizó la hidrólisis de la biomasa con *P.putida* KT2440, en dicha parte experimental se procedió a variar la carga de biomasa que corresponde a la fuente de carbono de microorganismo. Mediante un análisis de varianza se determinó que existe diferencias significativas al operar con cargas de 15, 45 y 60 % m/v al 95 % de confianza, de forma que se concluye que la condición más favorable para la producción de azúcares y deslignificación se dan al utilizar una carga media de biomasa obteniendo valores de 1,16 g/100 mL y 14 % respectivamente. Además, en esta sección se identifica la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa, la existencia de algunos de estos azúcares se atribuye a la producción de glucosa isomerasa por parte de la bacteria.

Después, se llevó a cabo la ozonólisis del material a pH 3 y pH 11 con las condiciones que generaron mayores concentraciones de azúcares correspondientes a 10 % m/v de rastrojo, un flujo de ozono de 4,1 g O_3/h y un tamaño de partícula de 1.00 mm. Se determinó que bajo estos parámetros los resultados superan en un 48 % la media del diseño experimental Taguchi L_9 y se establece que los datos se ajustan al modelo $C_A = C_\infty \times (1 - e^{-k \times t})$, donde k posee un valor de $0,0316 \text{ min}^{-1}$ y la concentración máxima de azúcares sería próxima a 2,395 g/100 mL con un R^2 de 0,97 a pH 3 y a pH 11 se tiene un valor de k de $0,0372 \text{ min}^{-1}$ y una concentración máxima de azúcares de 2,561 g/100 mL con un R^2 de 0,99. Al realizar la hidrólisis de la biomasa ozonada a los diferentes pH con *P.putida* se determinó un incremento en la producción de glucosa en un 50 %. Sin embargo, no se tuvo presencia de las otras azúcares fermentables obtenidas al usar el rastrojo natural.

Finalmente, con el análisis por microscopía electrónica de barrido se corroboró que el pretratamiento a pH 3 logró desintegrar de forma más homogénea la estructura de la biomasa, y mejoró la actividad enzimática del microorganismo, cuantificando así una deslignificación entre procesos de un 33 % y un total de azúcares de 2,13 g/100 mL. Sin embargo, al operar a pH 11 se logra una mayor concentración de azúcares disueltas en el medio (al realizar ambos procesos) con un valor de 2,30 g/100 mL, pero se observa poca homogeneidad en cuanto a cambios morfológicos, que se confirmó al obtener una remoción de 15 % de lignina entre tratamientos.

Para futuras investigaciones se recomienda utilizar tamaños de partícula entre 1- 2 mm, variar la concentración de ozono, operar el proceso a pH 3 y pH 11 durante un mayor periodo de tiempo con el fin de obtener un perfil cinético tanto de producción de azúcares como de deslignificación del material para determinar el comportamiento del sustrato a través del tiempo. Además, cuantificar los monolignoles y ácidos orgánicos en disolución con el fin hacer balances de masa de consumo para cada compuesto. Y para la hidrólisis con microorganismos, se recomienda utilizar los complejos enzimáticos correspondientes celulasas, oxidorreductasas y xilanasas de forma directa.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN	vii
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2	3
ASPECTOS GENERALES DEL RASTROJO	3
2.1. Rastrojo de Piña	3
2.2. Biomosas lignocelulósicas	5
2.2.1. Celulosa	6
2.2.2. Hemicelulosa	6
2.2.3. Lignina	6
CAPÍTULO 3	9
TIPOS DE PRETRATAMIENTOS PARA LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	9
3.1. Pretratamiento de biomosas.....	9
3.2.1. Pretratamiento Biológico	10
3.2.2. Pretratamiento Físico	10
3.2.3. Pretratamiento Químico.....	10
3.3. Ozonólisis.....	11
3.3.1. Ozono	12
3.3.2. Generación de ozono.....	17
CAPÍTULO 4	19
MICROORGANISMOS CELULÍTICOS.....	19
4.1. Celulasas.....	20
4.2. Mecanismos de acción de las celulasas.....	22
4.3. Degradación microbiana de la lignina	23
4.4. Enzimas encargadas de la degradación de lignina	24
4.4.1. Lignina Peroxidasas (LiP).....	24
4.4.2. Lacasas.....	24

4.5. Pseudomonas	25
4.5.1. Pseudomonas putida KT 2440	25
4.6. Crecimiento poblacional bacteriano	26
4.6.1. Nutrientes:.....	29
4.6.2. Temperatura.....	30
4.6.3. Condiciones de pH	31
4.6.4. Condiciones osmóticas y disponibilidad de agua	31
4.7. Métodos de medición directa del crecimiento microbiano	31
4.7.1. Recuento en placa	32
4.7.2. Método del número más probable (NMP)	33
4.7.3. Recuento microscópico directo	33
CAPÍTULO 5	35
<i>TÉCNICAS PARA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES</i>	35
5.1. Hidrólisis ácida.....	35
5.2. Hidrólisis enzimática.....	35
CAPÍTULO 6	37
<i>METODOLOGÍA</i>	37
6.1. Metodología experimental.....	37
6.1.1. Acondicionamiento de la materia prima	37
6.1.2. Ozonación de rastrojo de piña.....	38
6.1.3. Crecimiento bacteriano en distintos medios de cultivo	39
6.1.4. Pretratamiento microbiológico con la cepa Pseudomona putida KT 2440	40
6.1.5. Cuantificación de azúcares fermentables.....	41
6.1.6. Cuantificación de lignina insoluble y soluble.....	42
6.1.6.1. Cuantificación de sólidos totales	42
6.1.6.2. Determinación de extractos	43
6.1.6.3. Determinación de lignina insoluble y cenizas	43
6.1.6.4. Determinación de lignina soluble en ácido.....	44
6.1.7. Caracterización de biomasa SEM.....	44
6.2 Reactivos y equipos	45
6.2.1. Diagrama experimental	47
CAPÍTULO 7	49
<i>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i>	49

7.1. Caracterización de biomasa	49
7.2. Obtención de azúcares fermentables en el pretratamiento de ozonación de rastrojo de piña	51
7.3. Deslignificación de rastrojo de piña con el pretratamiento de ozonólisis.	57
7.4. Curva de crecimiento bacteriano del microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i> KT2240	63
7.5. Concentración de azúcares fermentables obtenidas con microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	68
7.6. Delignificación del rastrojo de piña obtenido con microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	71
7.7. Validación de resultados y sinergia del pretratamiento de ozonólisis con el microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	75
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	89
APÉNDICES.....	99
A. DATOS EXPERIMENTALES.....	99
B. DATOS INTERMEDIOS.....	115
C. MUESTRA DE CÁLCULO	126
C.1. Cálculo de la concentración de azúcares fermentables	126
C.2. Cálculo de porcentaje de sólidos totales.....	126
C.3. Cálculo de porcentaje de extractos	127
C.4. Cálculo de Lignina insoluble en ácido.....	128
C.5. Cálculo de Lignina soluble en ácido.....	128
C.6. Cálculo de tasa de crecimiento bacteriano	129
C.7. Rendimiento de hidrólisis.....	130
ANEXOS	131

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Ventajas y desventajas del uso del pretratamiento de ozonólisis en biomasa lignocelulósica con respecto a otros	11
Cuadro 4.1. Temperaturas apropiadas para el crecimiento bacteriano	30
Cuadro 6.1. Arreglo ortogonal Taguchi L ₉	38
Cuadro 6.2. Variables y factores de estudio en el factorial 2 ³	39
Cuadro 6.3. Arreglo experimental del factorial 2 ³	40
Cuadro 6.4. Reactivos utilizados para el desarrollo de las secciones experimentales.	46
Cuadro 6.5. Equipo empleado durante el desarrollo experimental.....	46
Cuadro 7.1. Composición de la hoja de rastrojo de piña entera (%m/m).	49
Cuadro 7.2. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de azúcares fermentales.	53
Cuadro 7.3. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.	58
Cuadro 7.4. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina soluble.	61
Cuadro 7.5. Concentración total de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento con el microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i>	69
Cuadro 7.6. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.....	72
Cuadro 7.7. Resultados obtenidos en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.....	83
Cuadro 7.8. Tabulación de biomosas pretratadas por ozonólisis, parámetros de reacción, deslignificación y rendimiento de la hidrólisis enzimática realizados.	84
Cuadro A.1. Datos de masas utilizadas para la preparación de patrones de azúcares fermentables.	99
Cuadro A.2. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Glucosa en la columna de intercambio iónico.	99
Cuadro A.3. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Fructosa en la columna de intercambio iónico.	99
Cuadro A.4. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Xilosa en la columna de intercambio iónico.	99
Cuadro A.5. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Sacarosa en la columna de intercambio iónico.	100
Cuadro A.6. Datos de área reportada para las corridas experimentales del diseño estadístico Taguchi L ₉	100

Cuadro A.6. (continuación) Datos de área reportada para las corridas experimentales del diseño estadístico Taguchi L ₉	101
Cuadro A.7. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las hojas de rastrojo de piña.	101
Cuadro A.8. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las muestras del diseño experimental Taguchi L ₉	102
Cuadro A.9. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en hojas de rastrojo de piña.	102
Cuadro A.10. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en las muestras del diseño experimental Taguchi L ₉	103
Cuadro A.11. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en hojas de rastrojo de piña.	103
Cuadro A.12. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras del diseño experimental Taguchi L ₉	104
Cuadro A.13. Datos de masas para la determinación de la curva de calibración con el patrón de Lignina Kraft.	104
Cuadro A.14. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina soluble en hojas de rastrojo de piña.	105
Cuadro A.15. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina soluble en las muestras del diseño experimental Taguchi L ₉	105
Cuadro A.16. Datos de absorbancia para la determinación de la curva del crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2 ³	106
Cuadro A.17. Datos de absorbancia para la determinación de la curva del crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2 ³	107
Cuadro A.18. Datos de masas utilizadas para la preparación de patrones de azúcares fermentables.	108
Cuadro A.19. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Glucosa en la columna Phenomenex Luna-NH2.....	108
Cuadro A.20. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Fructosa en la Phenomenex Luna-NH2.....	108
Cuadro A.21. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Sacarosa en la columna Phenomenex Luna-NH2.....	108
Cuadro A.22. Datos de área reportada para las corridas experimentales del diseño estadístico ANOVA.	108
Cuadro A.23. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las muestras del diseño experimental ANOVA.	109
Cuadro A.24. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en las muestras del diseño experimental ANOVA.	109

Cuadro A.25. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras del diseño experimental ANOVA.	109
Cuadro A.25. (<i>continuación</i>) Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras del diseño experimental ANOVA.	110
Cuadro A.26. Datos de absorbancias para determinar el porcentaje de lignina soluble en las muestras del diseño experimental ANOVA.	110
Cuadro A.27. Datos de área para la determinación de la curva de calibración de los patrones de azúcares en la columna de intercambio iónico para la validación de resultados.	110
Cuadro A.28. Datos de área reportada para la validación de resultados de resultados del pretratamiento de ozonólisis.	111
Cuadro A.29. Datos de área para la determinación de la curva de calibración de los patrones de azúcares en la columna Phenomenex Luna-NH2 para la validación de resultados con el microorganismo celulolítico.	111
Cuadro A.30. Datos de área reportada en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 0.25 mm al microorganismo celulolítico.	111
Cuadro A.31. Datos de áreas reportadas en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 1 mm al microorganismo celulolítico.	112
Cuadro A.32. Datos de áreas reportadas al exponer el rastrojo de piña previamente ozonado a diferentes pH al microorganismo celulolíticos.	112
Cuadro A.33. Recuento bacteriano.	112
Cuadro A.34. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	113
Cuadro A.35. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	113
Cuadro A.36. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	113
Cuadro A.37. Datos de absorbancias para determinar el porcentaje de lignina soluble en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	114
Cuadro A.38. Datos de pH final de las corridas experimentales con el pretratamiento de ozonólisis según diseño estadístico L9.	114
Cuadro A.39. Datos de pH final de las corridas experimentales con el microorganismo <i>Pseudomonas putida</i> según diseño estadístico ANOVA.	114
Cuadro A.40. Datos de pH final de las corridas de validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	114
Cuadro B.1. Datos de concentración asociados al volumen de inyección de los patrones de azúcares fermentables.	115

Cuadro B.2. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables.	115
Cuadro B.3. Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis.	115
Cuadro B.3. (continuación) Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis.	116
Cuadro B.4. Concentración total de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis.	117
Cuadro B.5. Porcentaje de sólidos totales en hojas de rastrojo de piña.	117
Cuadro B.6. Porcentaje de sólidos totales obtenido en las muestras del diseño experimental L9.	117
Cuadro B.7. Porcentaje de extractos en hojas de rastrojo de piña.	117
Cuadro B.8. Porcentaje de extractos obtenido en las muestras del diseño experimental L9.	118
Cuadro B.9. Porcentaje de lignina en hojas de rastrojo de piña.	118
Cuadro B.10. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras del diseño experimental L9.	118
Cuadro B.11. Logaritmo de las absorbancias de la curva de crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2 ³ para la determinación de la velocidad de crecimiento específica.	119
Cuadro B.12. Logaritmo de las absorbancias de la curva de crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2 ³ para la determinación de la velocidad de crecimiento específica.	120
Cuadro B.13. Datos de velocidad de crecimiento específica.	121
Cuadro B.14. Datos de concentración asociados al volumen de inyección de los patrones de azúcares fermentables.	121
Cuadro B.15. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables.	121
Cuadro B.16. Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento con el microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i>	121
Cuadro B.17. Concentración total de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento con el microorganismo celulolítico <i>Pseudomonas putida</i>	122
Cuadro B.18. Porcentaje de sólidos totales obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.	122
Cuadro B.19. Porcentaje de extractos obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.	122
Cuadro B.20. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.	122
Cuadro B.21. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables en la columna de intercambio iónico para la validación de resultados.	122
Cuadro B.22. Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis para las corridas de validación.	123

Cuadro B.23. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables en la columna Phenomenex Luna-NH2.	123
Cuadro B.24. Concentración de azúcares fermentables liberados en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 0.25 mm al microorganismo celulolítico.	123
Cuadro B.25. Concentración de azúcares fermentables liberados en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 1 mm al microorganismo celulolítico.	124
Cuadro B.26. Concentración de azúcares fermentables liberados al exponer el rastrojo de piña previamente ozonado a diferentes pH al microorganismo celulolíticos.	124
Cuadro B.27. Concentración total de azúcares fermentables liberado en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	124
Cuadro B.28. Porcentaje de sólidos totales obtenido en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	125
Cuadro B.29. Porcentaje de extractos obtenido en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	125
Cuadro B.30. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Planta de piña y sus partes.....	3
Figura 2.2. Monolignoles	7
Figura 3.1. Reacción del ozono con estructuras aromáticas.....	13
Figura 3.2. Reacción del ozono con el monómero de lignina en medio acuoso	14
Figura 3.3. Reacción del ozono con el monómero de lignina en medio acuoso	15
Figura 3.4. Mecanismo de Criegee.....	16
Figura 3.5. Mecanismo de acción del radical hidroxilo en los carbohidratos	17
Figura 3.6. Mecanismo de acción del ozono con aldehídos y carbonos anoméricos	17
Figura 4.1. Representación de la hidrólisis de celulosa enzimática	21
Figura 4.2.A. Mecanismos de hidrólisis enzimática	22
Figura 4.2.B. Mecanismos de hidrólisis enzimática	23
Figura 4.3. Curva de crecimiento bacteriano a) fase de latencia b) fase exponencial c) fases estacionaria d) fase de muerte	27
Figura 4.4. Relación entre la velocidad de crecimiento bacteriano específica con la concentración de sustrato (Hu, 2018)	29
Figura 4.4. Recuento en placa y diluciones seriadas	32
Figura 6.1. Diagrama de secuencia experimental.	37
Figura 6.2. Hoja de rastreo de piña seca a diferentes tamaños de partícula.	38
Figura 6.3. Cromatógrafo líquido de alta resolución, CITA.	42
Figura 6.4. Equipos soxhlet y rotavapor utilizados en la determinación de extractos.	43
Figura 6.5. Cobertor iónico de alto vacío.	45
Figura 6.6. Microscopio electrónico de barrido, CIEMic.	45
Figura 6.7. Diagrama experimental.....	47
Figura 7.1. Comportamiento de las medias con los factores en estudio para la determinación de azúcares fermentables con el pretratamiento de ozonólisis.	52
Figura 7.2. Contribución de cada uno de los factores utilizados en el Taguchi L ₉ para la determinación de azúcares fermentables con el pretratamiento de ozonólisis.	53
Figura 7.3. Comportamiento de las medias con los factores en estudio para la determinación de lignina insoluble en ácido con el pretratamiento de ozonólisis.....	57
Figura 7.4. Contribución de cada uno de los factores utilizados en el Taguchi L ₉ para la determinación de lignina insoluble.	58

Figura 7.5. Comportamiento de las medias con los factores en estudio para la determinación de lignina soluble en ácido con el pretratamiento de ozonólisis.....	61
Figura 7.6. Contribución de cada uno de los factores utilizados en el Taguchi L9 para la determinación de lignina soluble.....	62
Figura 7.7. Curva de crecimiento bacteriano obtenida a pH7, con inoculación líquida y el medio Luria Bertani.	64
Figura 7.8. Determinación de la constante de velocidad de crecimiento específica a pH7, con inoculación líquida y el medio Luria Bertani.....	64
Figura 7.9. Gráfico de residuos para probar supuestos de normalidad, varianza constante e independencia obtenidos con Minitab® Student.	65
Figura 7.10.a) Gráfica de efectos estandarizados b) Diagrama de Pareto de los efectos obtenidos por el modelo en Minitab® Student.	66
Figura 7.11.a) Gráfica de efectos principales b) Gráfica de interacciones obtenidas en Minitab® Student.	67
.....	68
Figura 7.12. Gráfica de cubo obtenido en Minitab® Student.	68
Figura 7.13. Gráfico de residuos para probar supuestos de normalidad, varianza constante e independencia obtenidos con Minitab® Student.	69
Figura 7.14. a) Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey b) Gráfica de la desviación estándar de intervalos para los azúcares fermentables obtenidos con Minitab® Student.	70
Figura 7.15. Posibles mecanismos para la formación de descomposición de lignina (Ahmad <i>et al.</i> , 2010).	72
Figura 7.16. Gráfico de residuos para probar supuestos de normalidad, varianza constante e independencia obtenidos con Minitab® Student.	73
Figura 7.17. a) Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey b) Gráfica de la desviación estándar de intervalos para lignina insoluble obtenidos con Minitab® Student.....	74
Figura 7.18. a) Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey b) Gráfica de la desviación estándar de intervalos para lignina soluble obtenidos con Minitab® Student.	75
Figura 7.19. Concentración de azúcares fermentables obtenidas a pH 3 respecto al tiempo en el proceso de ozonólisis.	76
Figura 7.20. Concentración de azúcares fermentables obtenidas a pH 11 respecto al tiempo en el proceso de ozonólisis.	76
Figura 7.21. Concentración de azúcares fermentables, glucosa y crecimiento bacteriano con respecto al tiempo al utilizar hojas de rastrojo de piña sin pretratar.	78
Figura 7.22. Concentración de glucosa y crecimiento bacteriano obtenido al utilizar la biomasa ozonada a pH 3.	79

Figura 7.23. Concentración de glucosa y crecimiento bacteriano obtenido al utilizar la biomasa ozonada a pH 11.	80
Figura 7.24. Cambios morfológicos de la hoja de rastrojo a 350X. (a) Sin pretratar. (b) Ozonólisis a pH 3. (c) Ozonólisis a pH 11.(d) Ozonólisis a pH 3- <i>P.putida</i> . (e) Ozonólisis a pH 11- <i>P.putida</i>	82
Anexo 1. Curva de calibración para determinación de azúcares fermentables en la columna de intercambio iónico.....	131
Anexo 2. Curva de calibración para determinación de azúcares fermentables en la columna Phenomenex Luna-NH2.	131
Anexo 3. Identificación de los azúcares fermentables presentes en las muestras de ozonólisis.	132
Anexo 4. Identificación de los azúcares fermentables presentes en las muestras con el microorganismo celulolítico.	132
Anexo 5. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 1-A del análisis estadístico Taguchi L 9.	133
Anexo 6. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 1-B del análisis estadístico Taguchi L 9.	133
Anexo 7. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 2-A del análisis estadístico Taguchi L 9.	134
Anexo 8. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 2-B del análisis estadístico Taguchi L 9.	134
Anexo 9. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 3-A del análisis estadístico Taguchi L 9.	135
Anexo 10. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 3-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	135
Anexo 11. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 4-A del análisis estadístico Taguchi L 9. .	136
Anexo 12. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 4-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	136
Anexo 13. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 5-A del análisis estadístico Taguchi L 9. .	137
Anexo 14. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 5-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	137
Anexo 15. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 6-A del análisis estadístico Taguchi L 9. .	138
Anexo 16. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 6-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	138
Anexo 17. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 7-A del análisis estadístico Taguchi L 9. .	139
Anexo 18. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 7-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	139
Anexo 19. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 8-A del análisis estadístico Taguchi L 9. .	140
Anexo 20. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 8-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	140
Anexo 21. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 9-A del análisis estadístico Taguchi L 9. .	141
Anexo 22. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 9-B del análisis estadístico Taguchi L 9. .	141
Anexo 23. Área de los azúcares fermentables producto del pretratamiento con <i>P.putida</i> con una carga de sólido del 15 % m/v de rastrojo para las réplicas A,B y C respectivamente.	142
Anexo 24. Área de los azúcares fermentables producto del pretratamiento con <i>P.putida</i> con una carga de sólido del 45 % m/v de rastrojo para las réplicas A,B y C respectivamente.	143

Anexo 25. Área de los azúcares fermentables producto del pretratamiento con <i>P.putida</i> con una carga de sólido del 45 % m/v de rastrojo para las réplicas A,B y C respectivamente.	144
Anexo 26. Curva de calibración para la determinación de la absortividad con el patrón de lignina Kraft.	145
Anexo 27. Barrido hecho a las muestras del análisis NREL.	145
Anexo 28. Valores de la relación S/N para cada uno de los factores utilizados con el pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de azúcares fermentales.	146
Anexo 29. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de azúcares fermentales.	146
Anexo 30. Valores de la relación S/N para cada uno de los factores utilizados con el pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoñable.	147
Anexo 31. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.	147
Anexo 32. Valores de la relación S/N para cada uno de los factores utilizados con el pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.	148
Anexo 33. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.	148
Anexo 34. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el análisis del factorial de las velocidades de crecimiento bacteriano.	149
Anexo 35. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el ANOVA de los azúcares fermentables obtenidos con el microorganismo.	150
Anexo 36. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el ANOVA de lignina soluble obtenidos con el microorganismo.....	151
Anexo 37. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el ANOVA de lignina insoluble obtenidos con el microorganismo.....	152
Anexo 38. Cambios morfológicos de la hoja de rastrojo. (a) Sin pretratar. (b) Ozonólisis a pH 3. (c) Ozonólisis a pH 11.(d) Ozonólisis a pH 3- <i>P.putida</i> . (e) Ozonólisis a pH 11- <i>P.putida</i>	153
Anexo 39. Prueba Anderson-Darling para la variable de azúcares fermentables.....	153
Anexo 40. Prueba Anderson-Darling para la variable de lignina insoluble.....	154
Anexo 41. Prueba Anderson-Darling para la variable de lignina soluble.	154
Anexo 42. Ajuste al modelo de la concentración de azúcares al realizar la ozonólisis a pH 3.....	155
Anexo 43. Ajuste al modelo de la concentración de azúcares al realizar la ozonólisis a pH 11.....	156

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El agotamiento de combustibles fósiles es una realidad inminente, según la Agencia Internacional de Energía (EIA) en el año 2019 estimó que el tiempo de consunción de la reserva mundial es de aproximadamente 48 años (IEA, 2019; Shafiee & Topal, 2009). Debido a esto, muchos autores coinciden en que existe una necesidad creciente por el desarrollo de procesos renovables, económicos y energéticamente eficientes para la producción de biocombustibles y productos químicos. Se ha comprobado que la biomasa lignocelulósica posee las características necesarias para ser la materia prima de futuros combustibles renovables, ya que constituye un sustrato sustancial para la producción de bioetanol que no compite como fuente alimentaria ni sustento animal, posee un alto contenido de azúcar, tiene elevada disponibilidad y bajo precio (Binod & Pandey, 2015). Sin embargo, debido a la composición del material se debe recurrir a la deslignificación para el aprovechamiento de la biomasa. Esto con el fin de alterar la estructura de lignina por lo que la hemicelulosa y celulosa queden expuestas, lo que aumenta la velocidad de reacción de los procesos posteriores y que se dé un incremento de la liberación de azúcares.

En este estudio se desarrollará un proceso de pretratamiento de biomasa proveniente del rastrojo de piña. En la industria de la biorrefinería efectuar esta operación representa un 20 % del costo total de producción; sin embargo, es indispensable para la obtención de biocombustibles o productos químicos. Por ello actualmente, se estudian pretratamientos alternativos con el fin de determinar aquellos que disminuyan costos operacionales, producción de subproductos y aumente el rendimiento de azúcares (Travaini, Judit, Ana, & Bolado, 2016). También, se estudiará la hidrólisis del material haciendo uso de un microorganismo celulolítico, que al ser capaz de producir distintos complejos enzimáticos como lo son las celulasas y oxirreductasas permitirá evidenciar si existe sinergia entre los procesos en cuanto a la producción de azúcares y exposición del área superficial del material.

Según la FAO, Costa Rica es el mayor proveedor de piña fresca a nivel mundial, generando ingresos en el año 2019 de hasta \$989.56 millones por exportación, por lo que en el país se ha dado una creciente demanda por la siembra del producto no tradicional (CANAPEP, 2018c; Maglianesi, 2013). Sin embargo, la industrialización de este genera desechos de hasta un 65% de la plantación que incluye la corona (parte superior del fruto), el corazón, las cáscaras y el rastrojo, el cual corresponde al material vegetal de la planta que se elimina después del ciclo comercial (Quesada, Alvarado, Sibaja, & Vega, 2005). Además, la

Cámara Nacional de Productos y Exportaciones de Piña reporta para el año 2018, el terreno ocupado para la siembra fue de alrededor de 44 000 hectáreas de piña, y se tiene que por hectárea de piña cultivada, se genera entre 97-250 tons de rastrojo (CANAPEP, 2018b; González, 2012).

Para la degradación de desechos de piña se utilizan herbicidas tóxicos que lo deshidraten, debido al gran volumen y que su degradación es lenta si no se tratan. Dicloro de dimetil-4-4'-bipiridil (Paraquat) es el plaguicida que comúnmente se emplea, para disminuir la biomasa y luego incinerar. Sin embargo, este plaguicida tiene una vida media larga de 27.5 días y termina por acumularse en suelo e incluso filtrándose a aguas (Janaki & Chinnusamy, 2016; Quesada et al., 2005). Además, los residuos de piña promueven la polifерación de la mosca (*Stomoxys calcitrans*) la cual genera estrés al ganado y a su vez afecta la productividad animal (Córdoba & Molina, 2014). Dado a lo expuesto con anterioridad, y con el fin de velar por el cumplimiento del Decreto °N 26921-MAG -Reglamento de la Ley Protección Fitosanitaria artículo 88, se deben buscar alternativas para el aprovechamiento de este residuo, tanto para disminuir el impacto ambiental como para activar un nuevo sector económico. En este caso, se propone utilizar el rastrojo para la producción de azúcares fermentables mediante el pretratamiento, este producto puede ser aprovechado para producción de biocombustibles, una alternativa para la sustitución de los combustibles fósiles que se caracteriza por producir menor cantidad de emisiones.

El objetivo del proyecto fue implementar un pretratamiento de ozonólisis, con el fin de cuantificar los azúcares fermentables obtenidos y la lignina removida de la biomasa de piña. La ozonólisis corresponde a un pretratamiento químico oxidativo, que ha demostrado ser eficiente especialmente en la degradación del polímero de lignina, y caracterizado por poseer efectos mínimos sobre la hemicelulosa y celulosa de la biomasa, además se ha comprobado que mejora hasta en un 25% el rendimiento de producción de glucosa con respecto a otros pretratamientos (Behera, Arora, Nandhagopal, & Kumar, 2014; Travaini *et al.*, 2016). Por ello, se procede a comparar la obtención de azúcares fermentables mediante la implementación de ozonólisis simple con el rendimiento de utilizar este método aplicando el uso del microorganismo celulítico *Pseudomonas putida* KT 2440, que según Mulakhudair, Hanot & Zimmerman (2017), proporciona una sinergia en el proceso, en donde el ozono como agente oxidativo ataca los dobles enlaces carbono- carbono de la lignina mientras que el microorganismo hidroliza las partes celulíticas expuestas de la biomasa.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS GENERALES DEL RASTROJO

2.1. Rastrojo de Piña

La piña es un fruto monocotiledóneo, herbáceo y perenne que pertenece a la familia bromeliáceas, específicamente al género *Ananas*, especie *comosus*. Este caracteriza por la adaptabilidad en condiciones áridas. Sin embargo, para velar por la calidad del producto es recomendable sembrar en zonas donde se tienen temperaturas entre los 23 - 30 °C. La planta crece alrededor de un metro de altura, posee un tallo rodeado con aproximadamente 35 hojas, las cuales son largas, gruesas y con espinas en la punta. El fruto se forma sobre un pendúnculo que tiene unos 100 -150 mm de largo, en el ápice del tallo y que está compuesto por las flores de color lavanda y brácteas adheridas a un eje central, que se unen y se encargan de la formación del fruto de la piña (M. Montoya, 2012; Zainuddin, Shamsudin, Mokhtar, & Ismail, 2014). En la Figura 2.1, se presenta un diagrama de las partes que constituyen la planta de piña.

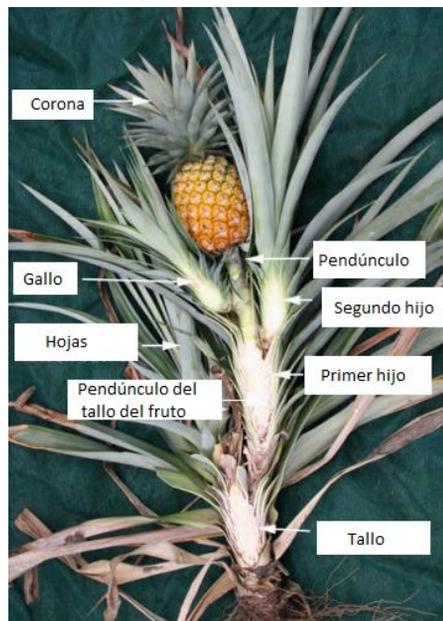


Figura 2.1. Planta de piña y sus partes (Kole, 2011).

Las hojas, la corona, la raíz y tallo de la planta, se conocen como rastrojo, y se caracterizan por ser no maderable. Lo constituye el parénquima, tejido fundamental para cumplir las funciones de fotosíntesis y almacenamiento de sustancias como el agua, hidratos de carbono, proteínas y grasas. Además, es fibroso y abrasivo debido al alto contenido de silicio y por los cordones de fibra que le otorgan resistencia a la torsión (Quesada *et al.*, 2005; Zainuddin *et al.*, 2014).

Actualmente Costa Rica es el principal proveedor de piña a nivel mundial según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). Las principales variedades que se cultivan en el país corresponden a: *Cayena lisa*, *Champaka* y MD-2. La Promotora de Comercio Exterior (PROCOMER) reporta que para el 2018 el impacto de la producción de piña en el Producto Interno Bruto del país fue de un 2 % (CANAPEP, 2018a; Maglianesi, 2013; PROCOMER, 2012). La Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP) para el 2008, estableció que el terreno ocupado para la siembra de piña fue de alrededor de 44 000 hectáreas. La producción de piña en Costa Rica se concentra en la Zona Norte, el Caribe y el Pacífico, donde el área sembrada del producto corresponde al 47%, 31 % y 22 % respectivamente (CANAPEP, 2018a; Hernández & Prado, 2018). Paralelo al crecimiento anual de 7% en exportaciones de piña que se da en la actualidad se ha recurrido al aumento en el área cultivada, y esto produce un incremento en subproductos provenientes del cultivo entre ellos el rastrojo. Se estima que por hectárea cultivada quedan entre 97 y 250 toneladas de material verde que no tiene un uso establecido (González, 2012; López, Wing, & Rojas, 2014).

El ciclo comercial de la piña es de 27 meses, el cual se divide en dos cosechas: la primera a los 15 meses y la segunda 12 meses después, una vez transcurrido el ciclo se debe eliminar el rastrojo para la preparación del suelo. Aproximadamente 1,5 millones de toneladas métricas de rastrojo se transforman en desecho anualmente y debido a su secado lento, se debe recurrir al uso de herbicidas para acelerar el proceso. Posteriormente se deben cortar y quemar, el herbicida más utilizado corresponden al dicloruro de dimetil-4,4-bipiridilo (Paraquat), que se caracteriza por ser altamente tóxico, de forma que contamina el suelo, amenaza con su uso futuro y puede llegar a contaminar las aguas de los ríos aledaños, debido

a la profundidad de los drenajes (Alpizar & Villegas, 2013; Quesada *et al.*, 2005).

Otro efecto sobre el ambiente del rastrojo de piña corresponde a la proliferación de la mosca de establos (*Stomoxys calcitrans*). La mosca ataca al ganado, succionando su sangre y ocasionando fuertes dolores, lesiones en la piel, altos niveles de estrés, debilitamiento y pérdidas de peso que bajan los rendimientos de producción de leche y de la carne, hasta puede llegar a causar la muerte (Córdoba & Molina, 2014).

Debido a la problemática que acarrear el rastrojo y su alto volumen de producción, se deben buscar alternativas para el aprovechamiento de este residuo, tanto para disminuir el impacto ambiental como para activar un nuevo sector económico. Según Irías (2014), en Costa Rica por lo general, el rastrojo no es aprovechado debido a que sus propiedades no son conocidas por las empresas. Sin embargo, en la actualidad se busca velar por el cumplimiento del Decreto °N 26921-MAG -Reglamento de la Ley Protección Fitosanitaria artículo 88, por lo cual el tratamiento adecuado del rastrojo es de carácter obligatorio para el ente generador (Alpizar & Villegas, 2013; Irías A, 2014).

2.2. Biomásas lignocelulósicas

El rastrojo de piña es una biomasa lignocelulósica, de modo que se define como el recurso natural que puede usarse para la producción de biocombustibles, de bioenergía, biomateriales y bioquímicos, por su alto contenido en carbohidratos. Este tipo de material representa la mayor parte de los residuos agrícolas (como es este caso), residuos de madera, residuos provenientes de municipios y de empresas (Behera *et al.*, 2014; Binod & Pandey, 2015). Debido al alto contenido de lignina en la morfología de la biomasa, la liberación de azúcares fermentables es un obstáculo para la industrialización del recurso. Sin embargo, esta estructura polimérica se encarga de la protección de la planta contra microbios y ataques enzimáticos dicha propiedad se denomina resistencia (Rajendran & Taherzadeh, 2014).

De forma estándar, la biomasa lignocelulósica, posee aproximadamente: de 40-50% de celulosa, 20-10 % de hemicelulosa y 15-5% de lignina. A continuación, se definen los constituyentes de la biomasa (Anwar, Gulfraz, & Irshad, 2014):

2.2.1. Celulosa

La celulosa es un componente estructural principal de las paredes de las células vegetales, que es responsable de la resistencia mecánica. Es un polímero altamente estable que consiste en glucosa, en su mayoría 1,4-D-glucopiranososa, unida con cadenas lineales entre sí por puentes de hidrógeno. Se caracteriza por ser rígida, insoluble y altamente resistente a los solventes orgánicos. Naturalmente las moléculas de celulosa existen como paquetes de microfibrillas, regiones cristalinas y amorfas (Anwar *et al.*, 2014).

2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa corresponde al segundo polímero más abundante en la biomasa y se diferencia de la celulosa por ser un polímero ramificado heterogéneo de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares acetilados. La estructura amorfa del compuesto se encarga de proporcionar integridad estructural a la célula. Además, su bajo peso molecular y diversidad en ramificaciones laterales cortas permite que los polímeros se hidrolicen con mayor facilidad (Agbor, Cicek, Sparling, Berlin, & Levin, 2011; Anwar *et al.*, 2014).

2.2.3. Lignina

La lignina es por lo general, la fracción más compleja y pequeña de la biomasa lignocelulósica, se encuentra presente en la pared celular primaria y se encarga del soporte estructural, impermeabilidad, resistencia contra microbios y al estrés oxidativo. Está constituida por un polímero heterogéneo de cadena larga con unidades fenilpropanoides (3 carbonos unidos a un anillo de 6 carbonos) correspondientes a *p*-hidroxifenil, guaiacil y siringil organizadas de forma aleatoria y altamente ramificables. Dichas unidades fenólicas están unidas por enlaces éter, usualmente se les denominan monolignoles, y son los precursores de la polimerización oxidativa del alcohol coniferílico, alcohol cumarílico (guaiacil) y el alcohol sinapílico respectivamente (Bajpai, 2016).

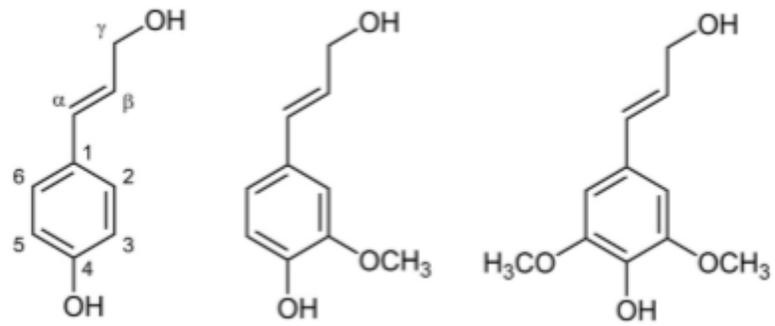


Figura 2.2. Monolignoles (Vasco, Ge, & Li, 2016)

CAPÍTULO 3

TIPOS DE PRETRATAMIENTOS PARA LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

3.1. Pretratamiento de biomásas

El pretratamiento es el proceso utilizado para liberar celulosa y hemicelulosa del sello de lignina y su estructura cristalina de forma que hace que los polisacáridos sean accesibles para la etapa posterior de hidrólisis. La resistencia de las paredes de las células vegetales a la desconstrucción se conoce como la propiedad de recalcitrancia de la biomasa. Los principales factores que contribuyen a la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica son el área superficial, la protección de la celulosa por la lignina, el carácter heterogéneo de las partículas de biomasa y el revestimiento de celulosa (Amarasekara, 2013). El método de pretratamiento históricamente empleado para biomasa lignocelulósica corresponde a la hidrólisis ácida diluida; sin embargo, este da como resultado una cantidad considerable de formación de inhibidores y descomposición de polisacárido. Como consecuencia, se han desarrollado varios métodos de pretratamientos (Raspolti & Antonetti, 2012).

Un pretratamiento eficaz debe cumplir los siguientes requisitos (Amarasekara, 2013; Raspolti & Antonetti, 2012):

1. Superar la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica
2. Producción de sólidos altamente digestibles que mejoren el rendimiento de azúcar durante la hidrólisis.
3. Evitar la degradación del azúcar, especialmente la pentosa derivado de la hemicelulosa.
4. Minimizar la formación de inhibidores tóxicos.
5. Permitir la recuperación y explotación de lignina para dar coproductos valiosos.
6. Ser rentables, involucrar reactores de tamaño razonable, bajo desperdicio y bajos requerimientos energéticos.

Los pretratamientos se clasifican en las siguientes categorías:

3.2.1. Pretratamiento Biológico

El pretratamiento biológico de la biomasa lignocelulósica utiliza el potencial de microorganismos (hongos y bacterias) para reducir la recalcitrancia de la materia prima y mejorar la digestibilidad mediante enzimas hidrolíticas. Este tipo de tratamiento se puede efectuar al cultivar el microorganismo directamente en la materia prima o utilizando los extractos de la enzima. Entre las ventajas del uso de este pretratamiento es el bajo requerimiento de energía, sin embargo, debido a la lentitud del proceso no se considera viable a nivel industrial (Agbor *et al.*, 2011; Rajendran & Taherzadeh, 2014; Vasco *et al.*, 2016).

3.2.2. Pretratamiento Físico

El objetivo general de esta categoría de pretratamiento es reducir el tamaño de partícula del material lignocelulósico con el propósito de mejorar la digestibilidad, aumentando la superficie específica disponible, también reduce el grado de polimerización (DP) y cristalinidad de la celulosa. La molienda y la irradiación son tratamientos físicos ampliamente utilizados para la biomasa lignocelulósica. Otros métodos físicos corresponden a: extracción, pirólisis y vapor de alta presión (Agbor *et al.*, 2011; Rajendran & Taherzadeh, 2014).

3.2.3. Pretratamiento Químico

Este corresponde al pretratamiento más utilizado para mejorar la biodegradabilidad de la celulosa mediante la eliminación de lignina, para este tipo de tratamiento se emplean diferentes agentes químicos como ácidos, álcalis, agentes oxidantes y ozono. Por lo tanto, dependiendo del tipo de compuesto que se utilice se tienen diferencias en los componentes estructurales del material lignocelulósico. En estudios previos se ha reportado que los pretratamientos con ozonólisis, peróxido y oxidación húmeda son más efectivos para la eliminación de lignina, mientras que los tratamientos con ácidos diluidos tanto orgánicos como inorgánicos son más eficientes en la solubilización de la hemicelulosa (Behera *et al.*, 2014; Tabil, Adapa, & Kashaninejad, 2016).

3.3. Ozonólisis

La ozonólisis corresponde a un tipo de pretratamiento químico, específicamente de carácter oxidativo, en donde la biomasa se trata con ozono. Este se encarga de degradar la lignina debido al ataque electrofílico hacia las estructuras de los anillos aromáticos y olefínicas, mientras que la hemicelulosa y la celulosa no se ven afectadas por el proceso. El ozono se puede utilizar para perturbar muchos de los materiales lignocelulósicos, tales como la paja, bagazo, pino, maní, paja de algodón y polvo de álamo (Travaini *et al.*, 2016). En el Cuadro 3.1, se presentan las ventajas y desventajas de utilizar este tipo de pretratamiento en biomásas.

Cuadro 3.1. Ventajas y desventajas del uso del pretratamiento de ozonólisis en biomasa lignocelulósica con respecto a otros (Travaini *et al.*, 2016)

Ventajas	Desventajas
1. Baja generación de compuestos inhibidores, especialmente de furfural y HMF (hidroximetilfurfural).	1 Alta reactividad, inflamabilidad, corrosión lo hace un proceso peligroso.
2. Selectividad a la degradación de lignina con efectos mínimos a la celulosa y hemicelulosa.	2. Es un proceso exotérmico por lo que puede requerir un sistema de enfriamiento.
3. Operación a temperatura ambiental y presión nominal.	3. Requiere materiales de construcción especial, capaz de resistir las condiciones de oxidación tales como: acero inoxidable austenítico, vidrio, cerámicas, teflón, hypalon y concreto.
4. Generación in-situ del ozono y su utilización directa (evita problemas de suministro y almacenamiento)	4. Costos elevados de consumo eléctrico.
5. Reduce la contaminación ambiental.	
6. No se requieren aditivos químicos durante todo el proceso de pretratamiento.	

Los parámetros de diseño para efectuar una ozonólisis corresponden al tamaño de partícula, la concentración del flujo de ozono, contenido de humedad de la biomasa y el pH del medio. El gas O_3 es pasado a través de un recipiente de reacción que contiene el sustrato,

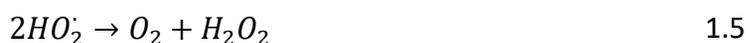
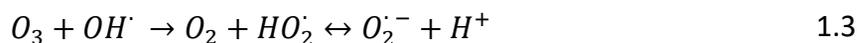
este puede ser un reactor semibatch, un reactor de lecho fijo (PFR) o en un reactor de lecho empacado (PBR) (Rajendran & Taherzadeh, 2014; Travaini *et al.*, 2016).

3.3.1. Ozono

El ozono corresponde a un agente oxidante fuerte considerado amigable con el ambiente, es 14 veces más soluble en agua que el oxígeno, pero altamente inestable. La producción del ozono debe ser *in-situ* y se puede generar a partir de aire seco u oxígeno. Su molécula triatómica no lineal contiene un ángulo obtuso y dos enlaces oxígeno de igual longitud (O_3), además dicha estructura presenta resonancia debido a que los átomos de oxígeno finales poseen solo seis electrones, lo que define la naturaleza electrofílica del compuesto. El potencial de oxidación del ozono es de + 2,07 V, y se considera el oxidante fuerte de mayor disponibilidad capaz de reaccionar tanto con sustancias orgánicas e inorgánicas (Coca, González-Benito, & García-Cubero, 2016; Marangon, Travaini, Colodette, Morales, & Bolado, 2015; Travaini *et al.*, 2016) .

La reacción de oxidación por presencia de ozono se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos: reacción directa con el ozono molecular y reacción indirecta mediada por las especies radicales que se forman cuando el ozono se descompone en el agua. El ozono molecular predomina en disoluciones inferiores a pH 7. En un medio alcalino, la descomposición del ozono resulta en la formación de radicales hidroxilos ($\bullet OH$) que corresponde a un agente oxidante con un potencial de + 2.80 V. La velocidad de formación de radicales también aumenta al elevar la temperatura del medio y con la presencia de metales (Barrera-Martínez *et al.*, 2016; Chiang, Liang, Chang, & Chao, 2006; Coca *et al.*, 2016) .

Las reacciones moleculares de O_3 son extremadamente selectivas y se limitan a atacar a compuestos aromáticos y alifáticos insaturados, de forma contraria los radicales hidroxilos poseen poca selectividad y pueden atacar moléculas orgánicas e inorgánicas a tasas de reacción de difusión limitada. A continuación, se presenta las reacciones de descomposición del ozono en medio acuoso (Kabdasli & Arslan-Alaton, 2010):



La degradación de lignina por la adición de ozono, se da debido a la selectividad con los enlaces dobles carbono-carbono y a los anillos aromáticos con alta densidad eléctrica. La reacción del ozono con estos últimos ocurre por un ataque electrofílico, seguido de la pérdida de oxígeno que resulta en la hidroxilación del anillo aromático. La formación del grupo hidroxilo aumenta la reactividad hacia reacciones de sustitución electrofílica seguido por una 1,3-cicloadiición del ozono con la estructura aromática que se conoce como el mecanismo de Criegee. En la Figura 3.1, se presentan el mecanismo de hidroxilación (Marangon *et al.*, 2015).

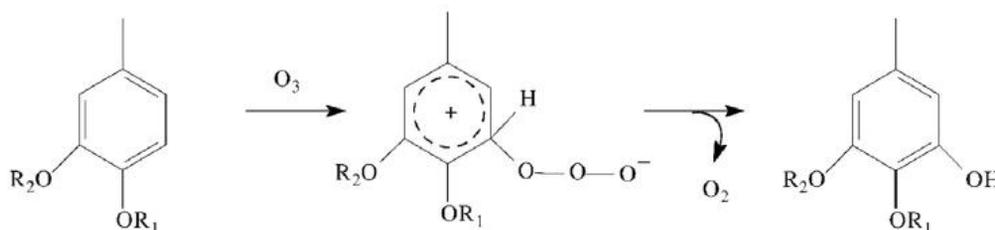


Figura 3.1. Reacción del ozono con estructuras aromáticas (Marangon *et al.*, 2015).

Actualmente, el mecanismo entre el ozono y la lignina en medio acuoso no se encuentra completamente desarrollado; sin embargo, en estudios anteriores se ha llegado a proponer una serie de rutas de ataque por medio de la detección de las especies por espectrometría de masas. En el mecanismo de acción, presente en la Figura 3.2, establece que la reacción se lleva a cabo por transferencia de cargas. La ruta A implica la transferencia de electrones completa, lo que da como resultado la formación de un radical catiónico aromático, que puede llegar a polimerizarse, y un radical ozonuro el cual se protona y produce un radical

hidroxilo y oxígeno (Figueirêdo, Deuss, Venderbosch, & Heeres, 2019; Marangon *et al.*, 2015).

El mecanismo B, ocurre por el ataque electrofílico del ozono sobre el carbono sustituido en el anillo lo que produce la hibridación de la molécula que reaccionan a través de diferentes rutas como se observa en la Figura 3.2. En la ruta C, el sustituyente hidroxilo se puede desprotonar a través de una escisión homolítica formando productos como catecoles o quinonas, aldehídos y el radical superóxido. La ruta D se da por una escisión heterolítica produciendo la apertura del anillo, formando productos como el ácido mucónico, maleico, fumárico y peróxido de hidrógeno. Finalmente, el mecanismo E propone una 1,3-cicloadición por parte del ozono al enlace insaturado del compuesto aromático ocasionando la apertura del mismo. En condiciones ácidas, se ha determinado que las rutas C y D ocurren simultáneamente y la E puede llegar a predominar por la presencia de H^+ (Figueirêdo *et al.*, 2019; Marangon *et al.*, 2015).

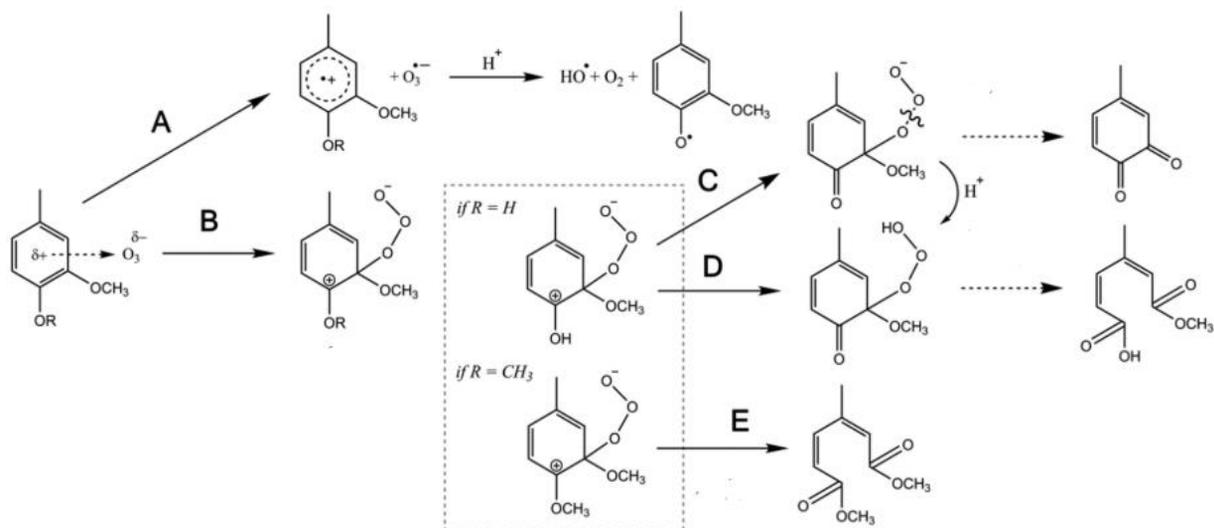


Figura 3.2. Reacción del ozono con el monómero de lignina en medio acuoso (Figueirêdo *et al.*, 2019).

Las quinonas y catecoles productos de la ruta C, al ser estructuras con grupos funcionales con alta carga electrónica dan lugar a la apertura del ciclo aromático por otra 1,3-cicloadición del ozono a los dobles enlaces olefínicos del ciclo aromático. Los principales productos de estas reacciones consecutivas corresponden a ácidos orgánicos como el ácido

fórmico, acético, oxálico, fumárico, malónico, succínico y los radicales de las reacciones indirectas como el hidroxilo, superóxido y el peróxido de hidrógeno (Figueirêdo *et al.*, 2019; Souza-Correia, Ridenti, Oliveira, Araújo, & Amorim, 2013).

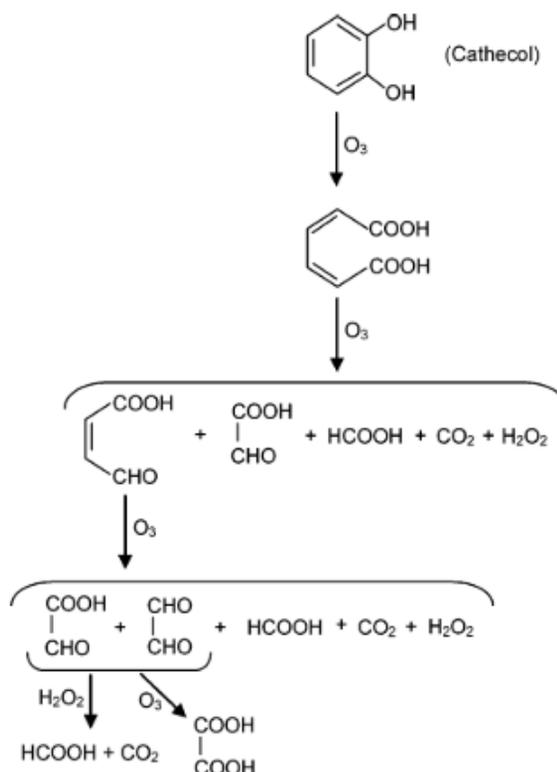


Figura 3.3. Reacción del ozono con el monómero de lignina en medio acuoso (Souza-Correia *et al.*, 2013).

La oxidación de los enlaces dobles alifáticos por medio del mecanismo de Criegee se presenta en la Figura 3.4, en donde se aprecia la 1,3-cicloadición que da como resultado un ozonoide inicial. Posteriormente, se lleva a cabo la descomposición del primer ozonoide por la cicloversión 1,3-dipolar produciendo isómeros de carbonilo simple y un óxido de carbonilo que debido a la poca estabilidad se recombinan formando un ozonoide final, que reacciona con los iones en disolución formando los productos de la ozonólisis (Marangon *et al.*, 2015; Souza-Correia *et al.*, 2013).

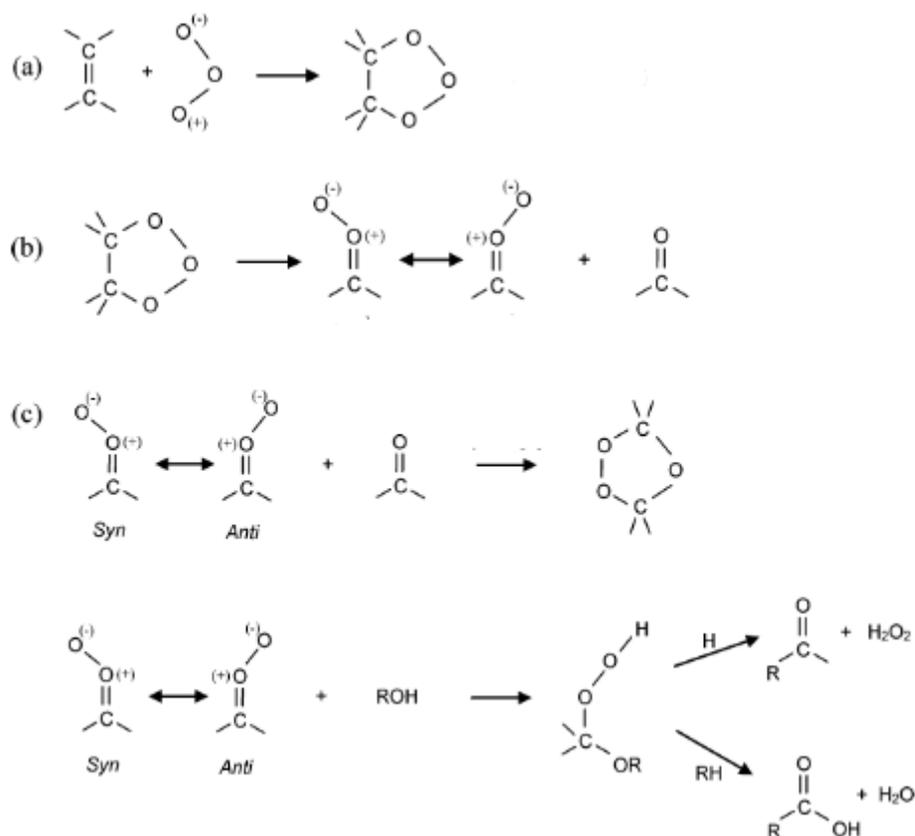


Figura 3.4. Mecanismo de Criegee (Souza-Correia *et al.*, 2013).

El radical hidroxilo, como se observa en los mecanismos anteriores, es un producto secundario de la reacción del ozono con la lignina. Además, se tiene que, al operar en pH básicos los iones hidroxilo promueven la descomposición del oxidante hacia la formación del radical. Estos productos secundarios reaccionan con los carbohidratos y dan como resultado la escisión de los enlaces glucosídicos. El ataque de los radicales hidroxilos inicia con la abstracción del hidrógeno seguida de una oxigenación del radical que conduce a la introducción de grupos carbonilo a la molécula como se observa en la Figura 3.5, y da paso a la producción de azúcares y ácidos orgánicos por el ataque del ozono mediante una 1,1-cicloadición, observar Figura 3.6 (Marangon *et al.*, 2015).

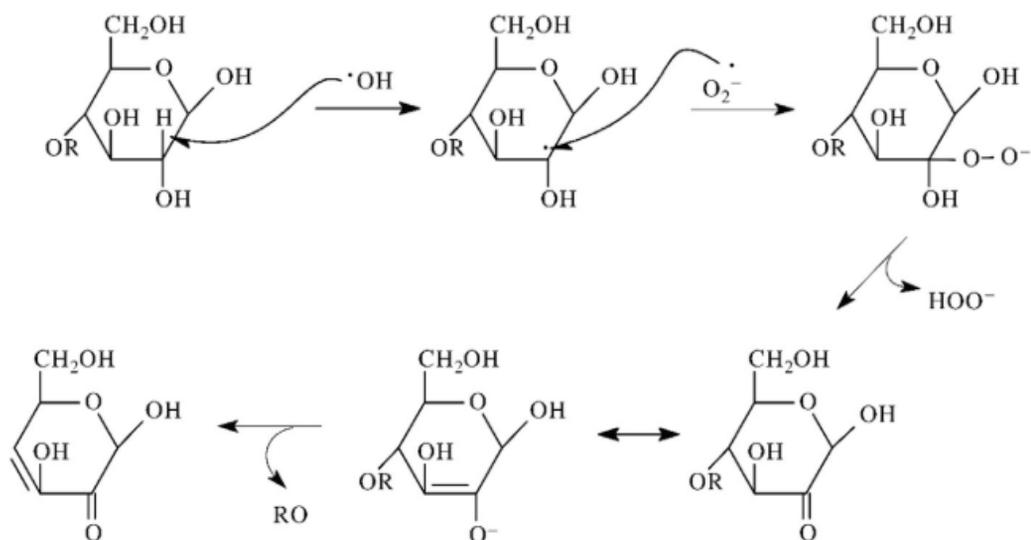


Figura 3.5. Mecanismo de acción del radical hidroxilo en los carbohidratos (Marangon *et al.*, 2015)

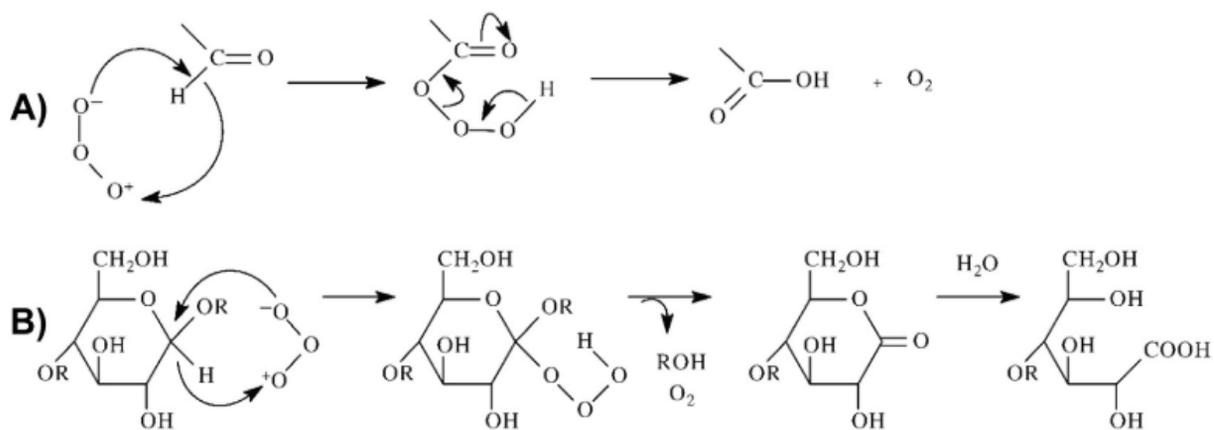
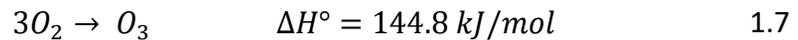


Figura 3.6. Mecanismo de acción del ozono con aldehídos y carbonos anoméricos (Marangon *et al.*, 2015)

3.3.2. Generación de ozono

Como se menciona anteriormente, la molécula de ozono al ser altamente inestable debe generarse *in situ*. Los principales métodos de producción se llevan a cabo a partir de fuentes de energía que permitan disociar las moléculas de oxígeno como lo es la descarga eléctrica de alto voltaje, conocido como descarga de corona, y la exposición fotoquímica en

donde las corrientes de gas se exponen a luz ultravioleta entre los 140-190 nm. La producción del ozono rige bajo la siguiente reacción endotérmica (Coca et al., 2016; Tap & Rice, 2012):



La descarga de corona corresponde a la técnica de producción más rentable de ozono en la actualidad. En este proceso se hace pasar la corriente de gas, ya sea aire u oxígeno puro, a través de un campo eléctrico de alta energía entre dos electrodos, donde uno de ellos tiene la función de tierra y el otro es el medio dieléctrico (portador de corriente de alto voltaje). Cuando las moléculas pasan por el panel, los electrones con una energía superior excitan los enlaces de unión del gas produciendo la ruptura del elemento en radicales de oxígeno atómico que reaccionan con el oxígeno intacto, de la siguiente forma (Tap & Rice, 2012):



El campo eléctrico que se genere en la cámara depende directamente de la frecuencia de operación que puede ser; baja (50-100 Hz), media (100-1000 Hz) y alta (>1000 Hz), del voltaje que se aplique y el material del electrodo. Usualmente estos componentes están elaborados por materiales con una constante dieléctrica alta como la cerámica y vidrio. Se estima que, en un generador, entre un 85% y 95% de la energía eléctrica suministrada produce calor, lo que es perjudicial ya que un aumento en la temperatura del sistema produce la descomposición del ozono en oxígeno. Por ello, los ozonizadores de corona cuentan con sistemas de enfriamiento, de forma que los electrodos se encuentran dentro de un disipador térmico que puede ser de aire, agua o freón (Coca et al., 2016; Tap & Rice, 2012).

CAPÍTULO 4

MICROORGANISMOS CELULÍTICOS

Los microorganismos celulolíticos corresponden a organismos especializados en la degradación de la pared celular de las plantas por hidrólisis de la celulosa mediada por complejos enzimáticos. Comúnmente se lleva a cabo por: bacterias, hongos, protozoos y enzimas microbianas (Wilson, 2011). En general, existen dos rutas de degradación microbiana de celulosa vegetal: en la primera se produce un conjunto de enzimas extracelulares que trabajan sinérgicamente para degradar la pared celular de la planta y en la segunda, las enzimas degradativas se organizan en complejos enzimáticos adheridos a la superficie celular, de forma que las enzimas de membrana se ubican en la interfaz entre la célula y el sustrato insoluble (Avellaneda, Guevara, & Torres, 2014; Golan, 2011).

En estudios previos se ha demostrado que las bacterias aerobias y los hongos se unen débilmente o no se unen del todo a la celulosa y producen celulasas en el ambiente extracelular. Por otro lado, las bacterias y hongos anaerobios muestran una alta tendencia a adherirse al polisacárido, produciendo celulasas incluidas en complejos enzimáticos llamados celulosomas. Además, este se divide en tres componentes proteicos modulares correspondientes a: proteínas de la superficie celular, de armazón y enzimáticas (Matte *et al.*, 2009; Mazzoli, 2012).

La degradación total de la celulosa implica interacción de diferentes enzimas, principalmente tres tipos: las endoglucanasas, las exoglucanasas y las β -glucosidasas. Estas actúan simultáneamente para convertir la celulosa en β -glucosa. En donde las endoglucanasas y exoglucanasas se encargan de producir celobiosa como producto principal. Después, la celobiosa es hidrolizada por las β -glucosidasas a glucosa (Avellaneda *et al.*, 2014; Golan, 2011; Gupta, 2016).

4.1. Celulasas

Las celulasas pertenecen a una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos β -1,4 dentro de la cadena que comprende el polímero de celulosa. Las enzimas celulíticas son inducibles, ya que pueden ser sintetizados por microorganismos durante su crecimiento en materiales celulósicos. Existen al menos once familias de celulasas que se clasifican según las similitudes de su secuencia de aminoácidos y los estudios estructurales de las diferentes familias muestran que las celulasas tienen ocho pliegues proteicos diferentes (Golan, 2011; Gutiérrez, Moreno, & Montoya, 2015; Wilson, 2011, 2016).

Todas las enzimas que degradan sustratos insolubles contienen un dominio de unión adherido por un enlace peptídico al dominio catalítico (dc) y este es el responsable de la hidrólisis per se. Al dominio o módulo de unión de celulosa se le denomina CBM (por su nombre en inglés carbohydrate binding module), tiene el papel de: unir la enzima a la celulosa para que el dc pase menos tiempo lejos del sustrato y logre mover la cadena del polisacárido a un sitio activo antes de que la enzima se difunda de la base. También, se encarga del reconocimiento de polisacáridos y, por último, tiene una función disruptiva de la unión de la celulosa y polisacáridos (Wilson, 2011, 2016).

Es importante recalcar que las celulasas tienen una cinética de reacción no lineal en los sustratos, debido a la heterogeneidad de los polímeros, por ello existen una gran variedad de modelos cinéticos para predecir su comportamiento. En general, el complejo de enzimas celulítica que descompone la celulosa en β -glucosa involucra las siguientes enzimas (Golan, 2011; Gupta et al., 2013; Wilson, 2011):

- Las endoglucanasas: se caracterizan por hidrolizar enlaces glicosídicos internos al azar y en regiones solubles o amorfas de la celulosa, o sea donde la estructura carece de enlaces de hidrógeno y es más desordenada. Lo que produce nuevos extremos, susceptibles a ser hidrolizados por exoglucanasas, cortando hebras largas de celulosa. Esto causa una disminución rápida de la longitud del polímero y un aumento gradual de la concentración de azúcares reductores.

- Las exoglucanasas: estas hidrolizan la cadena de celulosa y los oligosacáridos con alto grado de polimerización (DP) a partir de los extremos reductores de la cadena. Como producto final liberan unidades sucesivas de glucosa, glucohidrolasas, o celobiosa, y celobiohidrolasas.
- Las celobiohidrolasas: se encargan de hidrolizar las cadenas de celulosa mediante la eliminación de 2 unidades de los extremos no reductor y reductor. Esta acción da como resultado una liberación rápida de azúcares, pero produce pocos cambios en la longitud del polímero.
- Las β -glucosidasas: convierten los productos oligosacáridos de la acción de las enzimas anteriores descritas en glucosas.

Todos los componentes anteriores actúan de manera secuencial para facilitar la descomposición de la celulosa (Golan, 2011), esto se puede observar de forma detallada en la Figura 4.1.

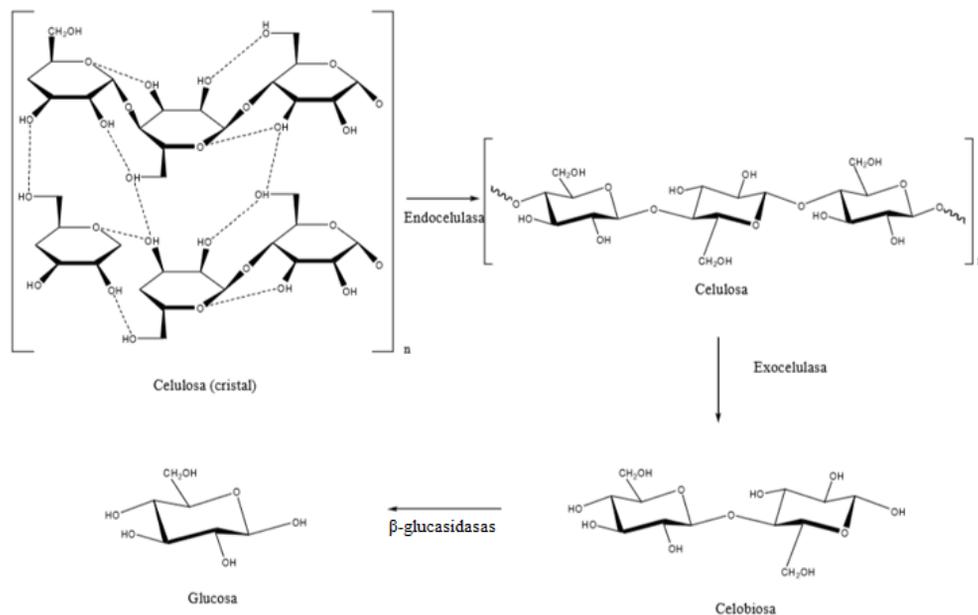


Figura 4.1. Representación de la hidrólisis de celulosa enzimática (Corredor, 2008).

4.2. Mecanismos de acción de las celulasas

La hidrólisis por glicosil hidrolasas se puede llevar a cabo por medio de dos mecanismos, de conversión o de inversión de la configuración del carbono anomérico. Ambos mecanismos requieren dos cadenas laterales de carboxilo, una que esté protonada (ácido catalítico) y la otra que no lo está (base catalítica, nucleófilo). La disposición de los aminoácidos en el sitio catalítico determina el tipo de mecanismo en el cual se llevará a cabo la hidrólisis. Si los aminoácidos se poseen una distancia de $\approx 5,5 \text{ \AA}$ se da el de conservación, mas si están a una proximidad de $\approx 10 \text{ \AA}$ sucede el mecanismo de inversión. En el mecanismo de inversión (ver Figura 4.2.A), la base catalítica activa una molécula de agua mediante la eliminación de un protón y la molécula de agua ataca el enlace β -1,4 por detrás, lo que provoca la inversión de la posición única, mientras que el ácido catalítico dona un protón al producto de escisión. En el mecanismo de conservación, la base catalítica ataca al enlace β -1,4 formando un intermedio covalente que está invertido. El ahora desprotonado carboxilato ácido actúa como base y se une a la molécula de agua nucleofílica liberando el producto final (Gutiérrez *et al.*, 2015; Wilson, 2011)

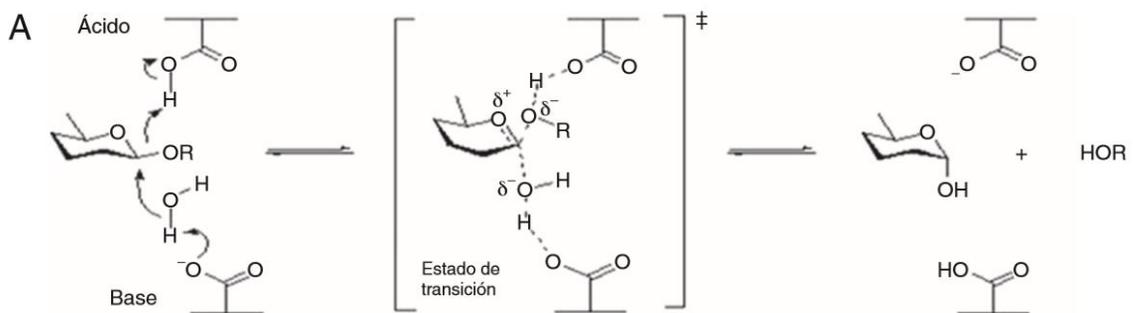


Figura 4.2.A. Mecanismos de hidrólisis enzimática (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015).

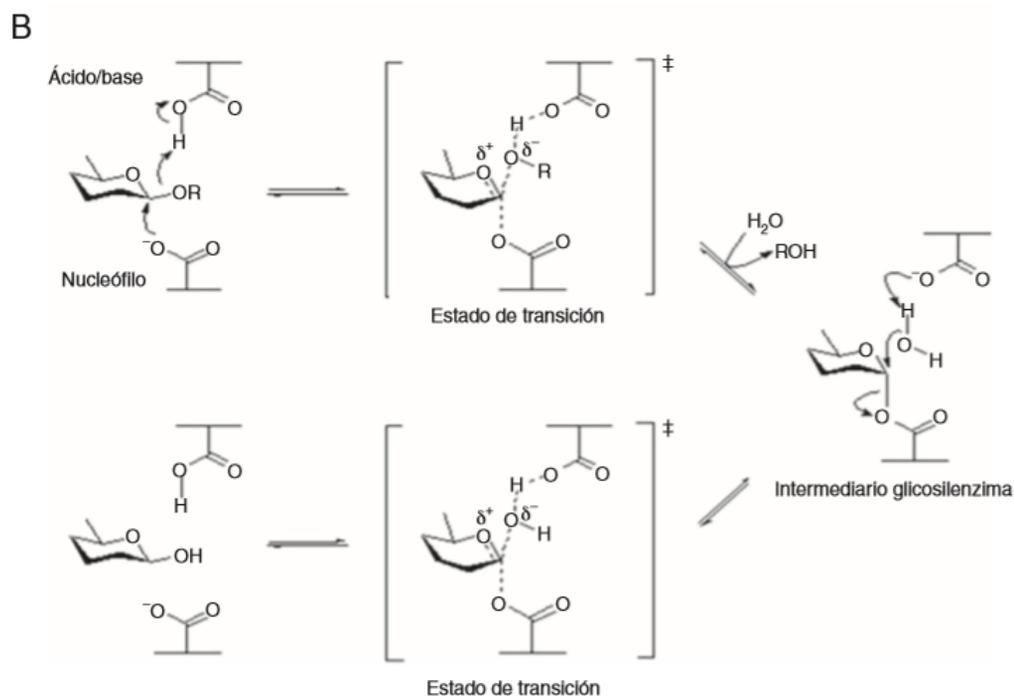


Figura 4.2.B. Mecanismos de hidrólisis enzimática (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015).

4.3. Degradación microbiana de la lignina

La lignina corresponde a un polímero aromático con diferentes unidades fenilpropanoides unidas por gran variedad de enlaces carbono-carbono, lo que forma una red tridimensional compleja que cumple la función de proteger la celulosa del ataque de patógenos o saprófitos. En el último paso de la biosíntesis de este compuesto se evidencia que las peroxidasas vegetales y algunas lacasas oxidan el monolignol (monómeros de lignina) a radicales fenoxi, lo que resulta en diversas estructuras diméricas fenólicas que se estabilizan por el acoplamiento de enlaces éter entre la posición fenólica y al ser estos enlaces de carácter no fenólico permite que las enzimas puedan oxidar la estructura nuevamente (Ruiz & Martínez, 2009; Xu & Wang, 2014).

La naturaleza aromática no fenólica de las unidades de lignina, permite la oxidación del compuesto por oxidorreductasas, como lo son las peroxidasas. Estas poseen dos

características que le permiten deslignificar biomásas correspondientes a: un potencial redox alto que permite la oxidación de anillos aromáticos no fenólicos y la capacidad de generar un oxidante de proteínas (peróxido de hidrógeno) mediante transferencia de electrones al cofactor del hemo, formando un radical libre de triptófano catalítico en la superficie de la proteína, donde puede interactuar con el polímero de lignina voluminosa (Ruiz & Martínez, 2009).

4.4 Enzimas encargadas de la degradación de lignina

Como se presenta en la sección anterior, la degradación de la lignina se ve directamente relacionada con la producción de las enzimas correspondientes a la lignina peroxidasa y lacasas. La primera se encarga de oxidar el anillo aromático y la segunda se encarga de degradar sustratos específicos (Kuhad & Singh, 2013).

4.4.1. Lignina Peroxidasas (LiP)

Es una glicoproteína, extracelular, que depende del peróxido de hidrógeno como cofactor. Tiene un potencial redox alto y actúa en pH bajo. Típicamente, muestra poca especificidad hacia sustratos y degrada los compuestos que tienen relación con la lignina. El LiP oxida el anillo aromático metoxilado o anillos no fenólicos, de forma que elimina un electrón y genera radicales catiónicos que son atacados enzimáticamente (Kuhad & Singh, 2013).

4.4.2. Lacasas

Es una oxidasa extracelular N-glicosilada que contiene cuatro átomos de cobre en el sitio activo que se distribuyen entre diferentes sitios de unión. Las lacasas catalizan la oxidación de una variedad de donantes de hidrógeno aromático con la reducción de oxígeno molecular a agua, además oxidan los ácidos fenólicos y metoxifenólicos mediante la eliminación de un electrón y un protón de los grupos hidroxilo o de grupos amino aromáticos, también descarboxilan y atacan los grupos metoxi (Kuhad & Singh, 2013).

4.5. Pseudomonas

Corresponde a un género de bacterias Gram-negativas, aerobias facultativas, quimiorganotrófa de la familia *Pseudomonadaceae*; las especies se presentan como organismos de vida libre en el suelo y los hábitats acuáticos y como patógenos en el hombre, animales y plantas. Las células son bacilos rectos o ligeramente curvados, con dimensiones entre 0.5-1.0 x 1.5-5.0 μm , la mayoría de las cepas son móviles con uno o varios flagelos. Típicamente, los organismos son nutritional y metabólicamente muy versátiles, unas logran crecer en sales inorgánicas con una fuente de carbono orgánico, mientras que otras pueden reproducirse como quimioautótrofas. La cepa se desarrolla en un rango de temperaturas entre 28 -30 °C y pH no menores a 4.5 (Singleton & Sainsbury, 2006).

Las *Pseudomonas* se clasifican como bacterias de la subclase gama de las proteobacterias, este tipo de organismo participa en las actividades metabólicas del medio ambiente, incluido el ciclo de elementos y la degradación de contaminantes biogénicos y cenobíticos, por lo que posee potencial en aplicaciones biotecnológicas como biocatálisis, biorremediación, agente de protección de plantas (Nelson et al., 2002).

4.5.1. *Pseudomonas putida* KT 2440

La cepa KT 2440, es la *Pseudomonas* saprofítica mejor caracterizada, es el primer Gram-negativo del suelo certificado como una cepa de seguridad no patógena. El genoma KT2240 revela que esta posee vías metabólicas para la transformación de una alta variedad de compuestos aromáticos derivados de la lignina, por lo que es apropiada para la descomposición de la molécula (Nelson et al., 2002). En la investigación de Ahmad et al., (2010), se concluye que este microorganismo degrada la lignina por la presencia de lacasas extracelulares, debido a que se dio el consumo de esta en ausencia de peróxido hidrógeno, cosustrato necesario para la activación de las peroxidasas extracelulares.

P.putida es altamente resistente a las tensiones endógenas y exógenas, lo que la hace tolerante a productos químicos industriales como el etanol, tolueno y subproductos de la hidrólisis de biomásas. Se caracterizan por su capacidad de crecer a partir de pocos

carbohidratos, como por ejemplo algunas hexosas (glucosa y fructosa) y también por ser incapaz de metabolizar disacáridos o azúcares de 5 carbonos productivamente. Este microorganismo se ha modificado con el fin de que también consuma la xilosa derivada de la hemicelulosa como fuente de crecimiento, mediante la implementación de la ruta de la isomerasa y xiloxinasa que convierte la D-xilosa en D-xilosa-5-fosfato (Dvořák & de Lorenzo, 2018).

Además, según la investigación realizado por Mulakhudair *et al.*(2017), dicha bacteria al poseer diversidad de complejos enzimáticos es apropiada para realizar hidrólisis de biomasas, reportando resultados en producción de glucosa entre 0.26 mg/mL - 1.1 mg/mL después de exponer el material al pretratamiento de ozonólisis, duplicando la producción de azúcar presente al utilizar únicamente ese pretratamiento. También, se evidencian tanto cambios en la morfología del material como en los grupos funcionales ligados al compuesto de lignina presentes en el sustrato producto de la hidrólisis con la cepa.

4.6. Crecimiento poblacional bacteriano

El crecimiento bacteriano se define como el incremento ordenado de los constituyentes químicos de una célula, el cual involucra un cambio en su tamaño para su posterior división. El incremento poblacional es el resultado del aumento del número de células, las cuales se pueden cuantificar individualmente, al contabilizar la cantidad de células o indirectamente con una medición de masa que implica la inclusión de dos mediciones importantes correspondientes a la densidad óptica y turbidez óptica (Varela & Grotiuz, 2006).

El cálculo de células totales se puede realizar con un recuento microscópico en una cámara de volumen definido; sin embargo, en este se toman en cuenta tanto las células viables como no viables. Por ello, para solo cuantificar las viables, es necesario hacer un cultivo en medio sólido para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un volumen conocido de la muestra (Varela & Grotiuz, 2006).

En un sistema cerrado, el crecimiento poblacional bacteriano se limita por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de agentes inhibidores. Al realizar un conteo de células en función del tiempo se tiene un crecimiento característico, el cual se observa en la Figura 4.3, mas este comportamiento puede variar según las características propias del microorganismo, del estado metabólico y del medio de cultivo(Varela & Grotiuz, 2006).

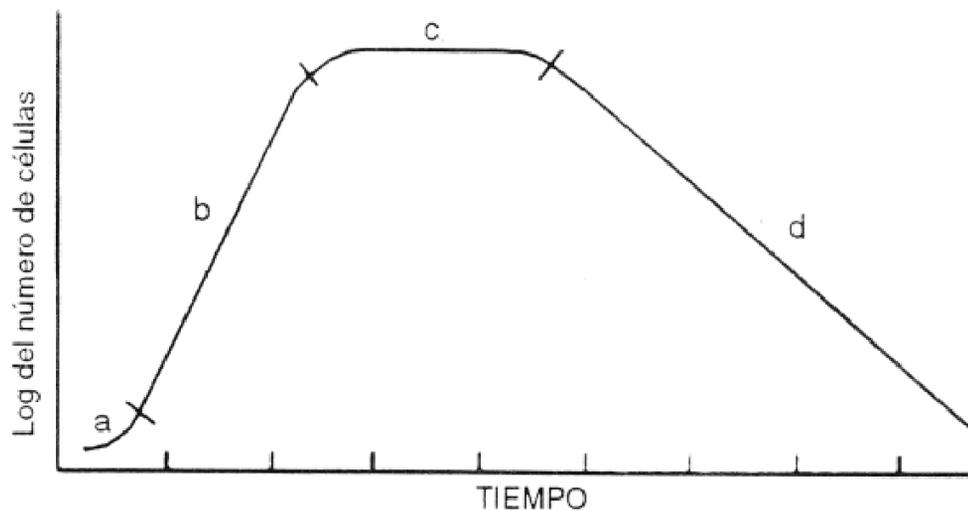


Figura 4.3. Curva de crecimiento bacteriano a) fase de latencia b) fase exponencial c) fases estacionaria d) fase de muerte (Varela & Grotiuz, 2006)

Las cuatro zonas características del crecimiento bacteriano corresponden a (Feiner, 2006):

- 1) Fase de latencia: en este periodo la bacteria tiene que ajustarse a las nuevas condiciones de entorno, como la disponibilidad de nutrientes, agua, pH y la temperatura. El número de células permanece constante, sin embargo, hay un aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica.
- 2) Fase exponencial: al adaptarse al entorno las bacterias comienzan a reproducirse de forma acelerada, produciendo una tendencia exponencial de división.
- 3) Fase estacionaria: durante este periodo se da el agotamiento de los nutrientes y se generan subproductos tóxicos que eventualmente llevan a la muerte de las células. Sin

embargo, estas se siguen reproduciendo, por ello la cantidad de células permanece constante y esto produce un punto de equilibrio.

- 4) Mortalidad o fase letal: en esta fase la acumulación de subproductos tóxicos, agotamiento de energía y los cambios en el pH en el cultivo inhiben el crecimiento de los microorganismos y produce la muerte de las células existentes llevando al cultivo a una fase de extinción.

La tasa de crecimiento bacteriano, usualmente, sigue un modelo empírico llamado cinética de *Monod*, el cual relaciona el cambio en la concentración de sustrato a un crecimiento bacteriano específico por medio de la siguiente expresión matemática (Baushke & Hashsham, 2007):

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (4.6.1)$$

Donde,

μ : velocidad de crecimiento específico, s^{-1}

μ_{max} : velocidad de reacción específica de crecimiento máximo, s^{-1}

S : concentración de sustrato, g/dm^3

K_s : constante de Monod, g/dm^3

El modelo de Monod relaciona el crecimiento microbiano con la cantidad de sustrato disponible en un sistema no estacionario. Por lo que la cinética se comporta de dos formas: la primera corresponde a una reacción de orden uno, donde la concentración de células es directamente dependiente a la concentración de sustrato (fase exponencial) seguido de una cinética de orden cero que indica un crecimiento constante independiente de la cantidad de sustrato disponible. Como se evidencia en modelo matemático el segundo término de la expresión tiende a uno cuando se trabaja con S muy altas lo que permite aproximar el crecimiento bacteriano a μ_{max} (Baushke & Hashsham, 2007; Fogler, 2008; Hu, 2018).

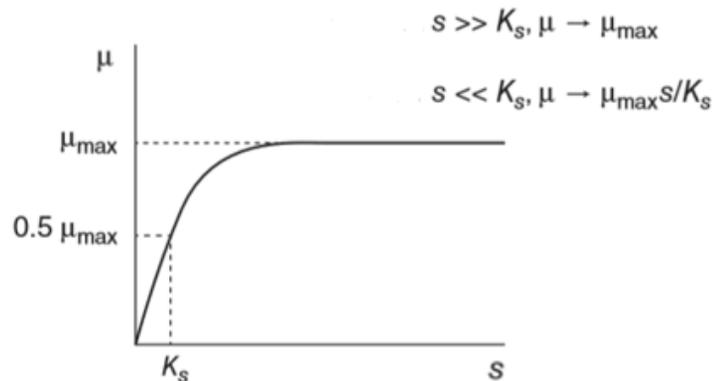


Figura 4.4. Relación entre la velocidad de crecimiento bacteriano específica con la concentración de sustrato (Hu, 2018)

La expresión más empleada para determinar el crecimiento bacteriano en fase exponencial es la ecuación simplificada de *Monod*, esta rige bajo la suposición de que la velocidad de crecimiento celular es proporcional al número de células vivas en cualquier momento, dado que el aumento poblacional es resultado de la división de una célula viva en dos. Se representa bajo la siguiente ecuación (Berk, 2009; Fogler, 2008):

$$r_g = \frac{dC_c}{dt} = \mu C_c \quad (4.6.2)$$

Donde,

r_g : velocidad de crecimiento de la célula, $\text{g/dm}^3 \text{ s}$
 C_c : concentración de células, g/dm^3
 dt : diferencial de tiempo, s

El medio, tanto físico como químico, en que se encuentre el microorganismo es determinante para la reproducibilidad de las células. Entre los factores de crecimiento poblacional de las bacterias se encuentran (Kar, 2008; Varela & Grotiuz, 2006):

4.6.1. Nutrientes:

A pesar de que la célula microbiana está constituida aproximadamente de un 70 % en peso de agua, requiere componentes sólidos y gaseosos para su desarrollo. Sus principales componentes gaseosos corresponden al oxígeno e hidrógeno. Además, está constituida por

cuatro elementos principales: carbón, nitrógeno, azufre y fósforo, los cuales terminan por representar el 95 % del peso celular. Se ha comprobado que el carbón representa parte integral de todas las células; el nitrógeno está relacionado a las proteínas, coenzimas y ácidos nucleicos (ADN,ARN). Además, el azufre es componente vital de las proteínas y coenzimas; mientras que el fósforo es el componente esencial de los ácidos nucleicos. Los micronutrientes, a pesar de estar en cantidades muy pequeñas, son importantes para la nutrición de la bacteria, entre estos se destacan: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} y Mo^{4+} (Kar, 2008).

4.6.2. Temperatura

Es uno de las variables más influyentes en la proliferación y mantenimiento de la vitalidad de las células. Las bacterias poseen una temperatura mínima bajo la cual no pueden proliferar, un rango de temperatura óptima dónde su crecimiento es más rápido y temperatura máxima, por encima de estas no logran multiplicarse. De acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos se pueden clasificar en: Psicrófilos y Psicrotrófo que requieren de bajas temperas para su crecimiento, mesófilos, poseen afinidad a las temperaturas moderadas y los termófilos, que son aquellas que necesitan altas temperaturas para crecer. A continuación, en el Cuadro 4.1, se presentan las temperaturas a las cuales se pueden desarrollar adecuadamente cada clasificación (Negroni, 2009).

Cuadro 4.1. Temperaturas apropiadas para el crecimiento bacteriano (Feiner, 2006).

Tipo	Temperatura mínima / (°C)	Temperatura adecuada / (°C)	Temperatura máxima / (°C)
Psicrófilos	-12	5-15	20
Psicrotrófico	-8	20-25	35
Mesófilos	5	30-45	50
Termófilos	35	45-60	70
Extremófilos	70	85-90	100
Termófilos			

4.6.3. Condiciones de pH

El pH es un factor esencial para el metabolismo y crecimiento bacteriano, la mayoría de las bacterias tienen un crecimiento óptimo en medio de pH neutro o ligeramente alcalino, entre 6,5 y 7,5, a este tipo se le conoce como neutrófilos. Sin embargo, algunas bacterias tienen capacidad de genética de producir ácidos a partir de carbohidratos, a estas se les conoce como acidogénicas. También, existen los microorganismos que se logran desarrollar en presencia de un alto grado de acidez llamadas acidófilas, las bacterias acidúricas, que tienen la capacidad de seguir creciendo aunque el pH descienda y las alcalófilas los cuales se reproducen en medio alcalino (Montoya, 2008).

4.6.4. Condiciones osmóticas y disponibilidad de agua

El agua corresponde a un requerimiento esencial y un factor importante para el crecimiento microbiano, la disponibilidad de esta no depende únicamente del contenido en el medio, ya que si hay altas concentraciones de sales y azúcares estas absorben el agua disminuyendo así su disposición, por ello es importante controlar la cantidad que se provee en el medio de cultivo. Generalmente los microorganismos se encuentran en ambientes con menor cantidad de solutos en su interior, por lo tanto, el agua entra a la célula por osmosis; si el medio se encuentra a mayor concentración el agua tendrá a salir de la célula, con el fin de llegar el equilibrio. Existen tres tipos de microorganismos según el medio en el que se desarrollan: halófilos, crecen en altas concentraciones salinas; osmófilos, que se desarrollan en altas concentraciones de azúcares y los xerófilos, microorganismos que crecen en ambientes muy secos (Montoya, 2008; Varela & Grotiuz, 2006).

4.7. Métodos de medición directa del crecimiento microbiano

Para la medición directa del crecimiento microbiano se utilizan métodos que determinan el número de células, dicha magnitud se registra como el número de células que hay por unidad de volumen o masa. Para llevar a cabo dicho recuento, el procedimiento se efectúa mediante una serie de diluciones. A continuación, se presentan algunas de las técnicas que se llevan a cabo:

4.7.1. Recuento en placa

Este corresponde al procedimiento más utilizado para la medición de las poblaciones, la ventaja de utilizar este es que cuantifica el número de células viables, mas requiere mucho tiempo para que las colonias sean visibles. La técnica que basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una única colonia por ello suele reportarse como unidades formadoras de colonias (UFC). Para realizar un buen recuento se requiere un número limitado de colonias, por ello para asegurar que los recuentos sean apropiados, el inóculo original se diluye varias veces proceso que se denomina como dilución seriada, tal como se observa en la Figura 4.4. (Tortora, Funke, & Case, 2007).

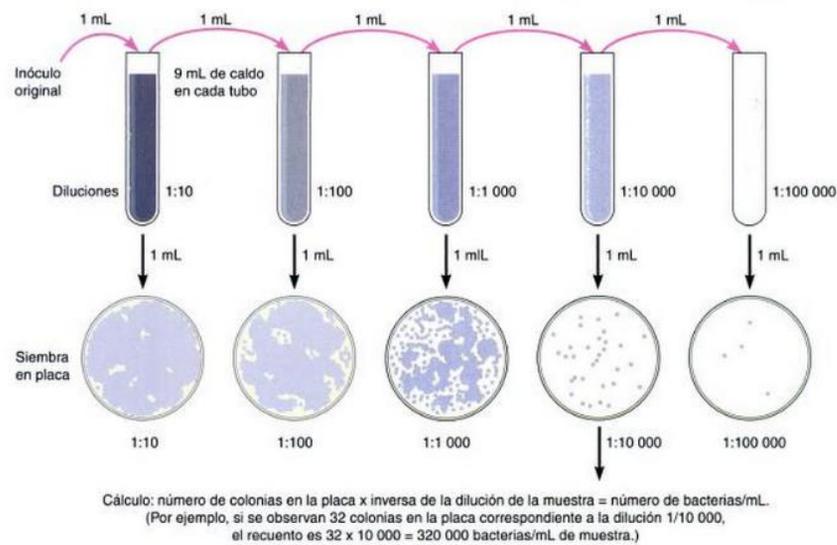


Figura 4.4. Recuento en placa y diluciones seriadas (Tortora *et al.*, 2007).

El recuento de placa se realiza ya sea con el método de placa vertical o el de diseminación en placa. Para la primera de las técnicas, se inocula 1,0 mL o 0,1 mL de diluciones de la suspensión bacteriana en una placa Petri. El medio nutritivo, en el que el agar se mantiene líquido en un baño de agua próximo a los 50 °C, se vierte sobre la muestra y se mezcla en el medio con agitación suave de la placa, en el momento en el que el agar se solidifica la placa se incuba. Para el método de diseminación, sobre el agar vertido y solidificado se coloca 0,1 mL del inóculo, que se extiende de forma uniforme con una varilla de vidrio esterilizada, la ventaja al

realizar esta técnica es que permite el crecimiento de todas las colonias sobre la superficie del medio (Tortora *et al.*, 2007).

4.7.2. Método del número más probable (NMP)

En esta técnica se efectúa bajo el principio de tubos múltiples, se basa en la suposición de que las bacterias pueden separar unas de otras mediante agitación, obteniendo como resultado una distribución homogénea en la muestra. Se inoculan volúmenes decrecientes de la muestra en un medio de cultivo apropiado por medio de diluciones sucesivas hasta que se dé al menos un resultado negativo, de forma que la combinación de los resultados positivos y negativos permite cuantificar la densidad de bacterias por medio de cálculos probabilísticos. Normalmente, se utilizan factores de dilución de 10, inoculando múltiplos y submúltiplos de 1 mL. Este método es útil cuando los microorganismos no se desarrollan en medio sólidos (Roldán & Ramírez, 2008; Tortora *et al.*, 2007).

4.7.3. Recuento microscópico directo

Para llevar a cabo este procedimiento se requiere un volumen definido de una suspensión bacteriana dentro de un área limitada en un portaobjetos, se agrega colorante para observar mejor las bacterias y la muestra se observa con la lente del objetivo de inmersión, lo que permite calcular el número promedio de bacterias en un campo (Tortora *et al.*, 2007).

CAPÍTULO 5

TÉCNICAS PARA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES

Para la producción de azúcares fermentables a partir del material lignocelulósico se tienen dos posibles vías correspondientes a: hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática (Córdoba, 2011).

5.1. Hidrólisis ácida

En este proceso se requiere del uso de ácido diluido o concentrado, estos se encargan de romper los polímeros de celulosa y hemicelulosa de la biomasa para formar moléculas de azúcar que se pueden fermentar a etanol. La ventaja de esta técnica radica en que el ácido puede penetrar la lignina sin pretratamiento, pero la glucosa también se degrada bajo estas condiciones ácidas. Este proceso emplea generalmente ácido sulfúrico y ácido clorhídrico en concentraciones de 1-10 % en un rango de temperaturas entre 100-150 °C. Los monosacáridos bajo este proceso se descomponen en subproductos como lo son el furfural, producto de deshidratación de pentosas, hidroximetilfurfural (HMF), producto de deshidratación de hexosas, ácido acético, que se forma durante la descomposición inicial de hemicelulosas. Los diversos productos de descomposición, sobretodo los grupos acetilo, inhibe la fermentación posterior lo que reduce los rendimientos de etanol (Lenihan *et al.*, 2010).

5.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso en el cual las enzimas mejoran la escisión del enlace en las moléculas con la adición de agua, este se lleva a cabo con enzimas llamadas celulasas, para la producción de estas enzimas se utilizan tanto bacterias como hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Los grupos principales de las enzimas corresponden a: endogluconasa, exogluconasa o celobiohidrolasa y β -glucosidasa. Este tipo de hidrólisis se caracteriza por requerir medios menos fuertes con respecto a la hidrólisis ácida, debido a que esta se realiza bajo condiciones medias tanto de pH como de temperatura (Córdoba, 2011; Mussatto & Teixeira, 2010).

CAPÍTULO 6

METODOLOGÍA

6.1. Metodología experimental

A continuación, se procede a detallar la metodología utilizada a lo largo del proyecto tanto en la parte experimental como las técnicas de cuantificación de las variables en estudio de cada etapa. En la Figura 6.1, se presenta el diagrama con la secuencia metodológica empleada.

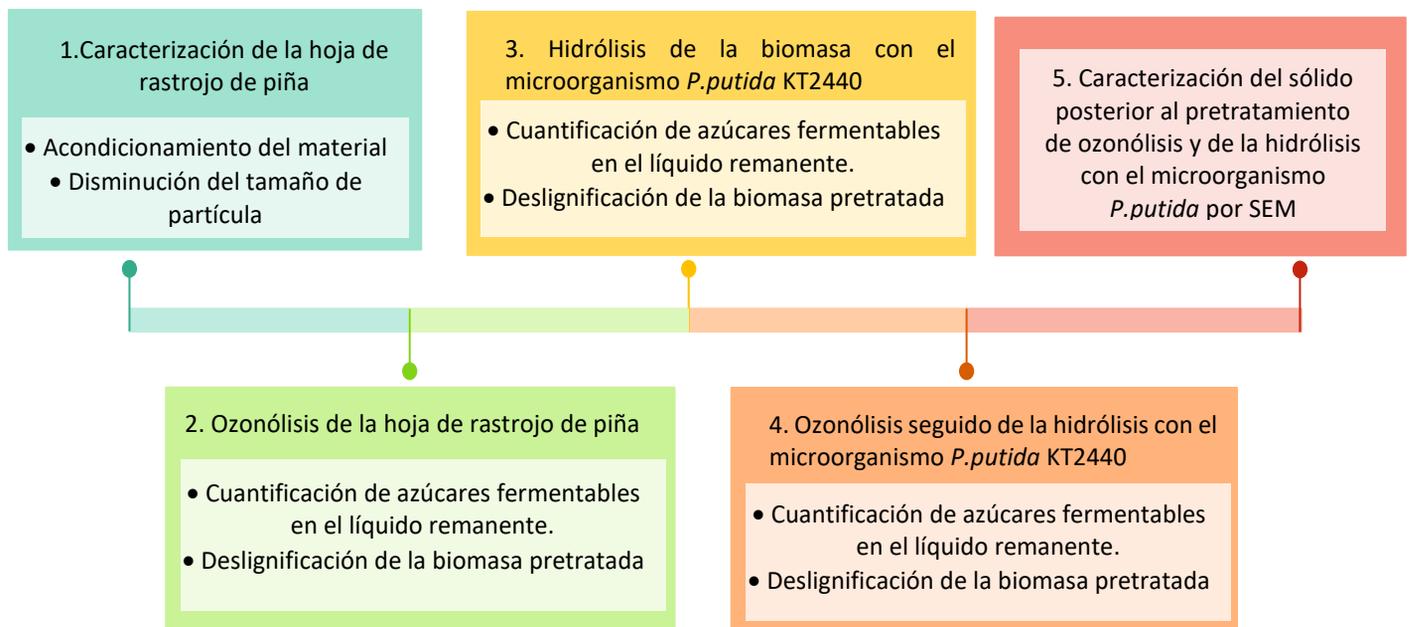


Figura 6.1. Diagrama de secuencia experimental.

6.1.1. Acondicionamiento de la materia prima

La materia prima de este proyecto corresponde a la hoja de rastrojo de piña de la variedad MD2. Esta fue proporcionada y recolectada de la Finca el Establo ubicada en Guatuso, que se encarga del cultivar la piña de forma orgánica y sin uso de desecantes.

El material se secó en una estufa a 40 °C hasta obtener una humedad aproximada de 7%. Posteriormente, con ayuda de un molino de cuchillas se llevó la muestra a tres tamaños de partícula correspondientes a 0,25 mm, 0,5 mm y 1,0 mm.



Figura 6.2. Hoja de rastrojo de piña seca a diferentes tamaños de partícula.

6.1.2. Ozonación de rastrojo de piña

Para determinar la efectividad del pretratamiento de ozonólisis en el rastrojo de piña, se llevó a cabo el diseño experimental Taguchi L_9 con repetición. Este análisis estadístico permitió determinar el efecto de cuatro factores a tres niveles diferentes en el proceso de ozonólisis. En el Cuadro 6.1, se presenta el arreglo con las condiciones de estudio.

Cuadro 6.1. Arreglo ortogonal Taguchi L_9 .

Número de Corrida	Tamaño de partícula/ (mm)	Carga de sólido/ (%m/v)	Flujo de ozono / (g O ₃ /h)	pH
1	0,25	1	3,7	3
2	0,25	5	4,1	7
3	0,25	10	5,0	11
4	0,5	1	4,1	11
5	0,5	5	5,0	3
6	0,5	10	3,7	7
7	1,0	1	5	7
8	1,0	5	3,7	11
9	1,0	10	4,1	3

Para la ozonólisis se realizó el montaje presente en la Figura 6.7. Se trabajó en un sistema semi-continuo. Por lo tanto, se fijó un volumen de operación de 900 mL de agua ultrapura obtenida del CITA, el tiempo de exposición se estableció en 30 min y la velocidad de agitación en 250 rpm. El pH se adecuó con disoluciones de NaOH y HCl al 1 M, según el valor

deseado y, finalmente, se cuantificó el valor con un pHmetro. Posteriormente, se realizó la carga de biomasa con diferente tamaño de partícula y se procedió a variar el flujo de oxígeno con ayuda de las válvulas reguladoras de forma que el rotámetro del generador de ozono indicará el valor necesario. La recolección de la muestra, tanto líquida como sólida, se dio inmediatamente después del plazo de exposición del material al ozono. El sólido se procedió a lavar con agua ultrapura y a la muestra líquida se le agregaron 2 mL de una disolución de KI al 2% para detener la reacción al inhibir el efecto del ozono residual. Finalmente, se cuantificó la concentración de azúcares en el medio líquido por cromatografía y se realizó el procedimiento NREL para determinar el porcentaje de lignina en la biomasa.

6.1.3. Crecimiento bacteriano en distintos medios de cultivo

Se realizó un diseño factorial 2^3 con el objetivo de encontrar el medio de cultivo mínimo, pH y el medio de inoculación de la cepa, que permitiera la mayor tasa de crecimiento bacteriano de *Pseudomona putida* KT2440. Los factores en estudio se encuentran el Cuadro 6.2. y el arreglo experimental en el Cuadro 6.3.

Cuadro 6.2. Variables y factores de estudio en el factorial 2^3 .

Factores	Nivel	
	Bajo	Alto
pH	6	7
Método de Inoculación	Colonia disuelta en solución salina	Líquido
Medio de Cultivo	Abdul-Kadhim & Jarallah (AKJ)	Luria-Bertani (LB)

Como se observa en el Cuadro 6.2, el primer medio de cultivo mínimo corresponde al Abdul-Kadhim & Jarallah, este fue preparado acorde a la investigación Mulakhudair *et al.* (2017) con una composición de 0.5% de extracto de levadura, 0.02% de sulfato de magnesio y 0.02% de fosfato de amonio dibásico. El medio Luria-Bertani se utilizó con una composición de 0.5% de extracto de levadura, 1% de triptona, 1% de cloruro de sodio. Se hizo uso de este medio ya que en investigaciones previas esta bacteria ha demostrado tener buenas tasas de crecimiento celular y alta actividad enzimática (Obeng *et al.*, 2018). Es importante recalcar

que los medios de cultivo fueron provistos por la Escuela de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Cuadro 6.3. Arreglo experimental del factorial 2³.

Número de Corrida	pH	Método de inoculación	Medio de Cultivo
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Dicho estudio, se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos. Se adicionó a cada pocillo 200 μ L de medio de cultivo y se inoculó 50 μ L de la cepa. Se procedió a cuantificar el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro, cada 30 min durante 14 horas para cada pozo, además este se adecuó a 25 °C. Posteriormente, con los datos recolectados se realizaron las curvas características de crecimiento bacteriano. De forma que, con la zona exponencial y el modelo de *Monod* simplificado, se procedió a calcular la velocidad de crecimiento específico que corresponde a la variable de respuesta del estudio preliminar.

6.1.4. Pretratamiento microbiológico con la cepa *Pseudomonas putida* KT 2440

Por medio de un análisis de varianza (ANOVA) se procedió a estudiar el efecto de la carga de biomasa en un 15%, 45% y 60 % (m/v) expuesta al pretratamiento con el microorganismo celulolítico, con el fin de determinar cuál porcentaje de sólido beneficia la producción de azúcares y disminuye la cantidad de lignina en la biomasa.

Del estudio preliminar, se fijaron las condiciones que reportaron la mayor tasa de crecimiento bacteriano correspondientes al medio de cultivo Luria-Bertani a pH 7 y un medio de inoculación líquido de la bacteria. Se trabajó en erlenmeyers de 125 mL con un volumen de control de medio de cultivo de 50 mL y un tamaño de partícula del rastrojo de 0.25 mm

previamente autoclavado. Los erlenmeyers se incubaron en un shaker a una temperatura de 25 °C, a 200 rpm durante tres días.

6.1.5. Cuantificación de azúcares fermentables

El análisis de azúcares fermentables se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución, en las instalaciones del CITA. Las muestras provenientes de la ozonación se inyectaron a una columna de intercambio iónico RCM-Monosaccharide Supelcogel Ca²⁺ (7,8 ID x 300mm) marca Phenomenex REZEX, que cuenta con un soporte de estireno-divinilbenceno sulfonado con un 8% de ion calcio. La fase móvil corresponde a agua ultrapura a un flujo de 0,4 mL/min y el volumen de inyección de las muestras fue de 3 µL. La temperatura de operación de la columna fue de 80 °C y del detector de índice de refracción de 45 °C que corresponden a las condiciones idóneas de operación.

La cuantificación de las azúcares, se determinó a partir de curvas de calibración que relacionan el área con la concentración de disoluciones patrón del azúcar asociado a cada tiempo de retención. En las muestras de ozonólisis se identificó sacarosa, glucosa, xilosa y fructosa que poseen un tiempo de retención de 13 min, 16 min, 18 min y 20 min respectivamente. Las rectas utilizadas se presentan en el Anexo 1 y en el Anexo 3 se encuentra una superposición de los patrones sobre una de las muestras analizadas.

Las muestras provenientes del pretratamiento con el microorganismo celulolítico se inyectaron a una columna a la columna Phenomenex Luna-NH₂ (4,6 IDx 250mm) marca LUNA, que cuenta con un soporte sólido de sílice ultrapura. La fase móvil corresponde a acetonitrilo/agua en proporción 80:20 a un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección de las muestras fue de 5 µL. La temperatura de operación de la columna fue de 35 °C y del detector de índice de refracción de 35 °C. En estas muestras se identificaron las azúcares correspondientes a fructosa, glucosa y sacarosa que se asocian a los tiempos de retención de 5 min, 6 min y 8 min respectivamente. De igual forma, en el Anexo 2, se presentan las rectas de calibración de los patrones y en el Anexo 4 la superposición de la muestra.



Figura 6.3. Cromatógrafo líquido de alta resolución, CITA.

6.1.6. Cuantificación de lignina insoluble y soluble

Para la determinación de lignina, primeramente, se tuvo que adecuar el material según los requerimientos metodológicos NREL. A continuación, se detalla cada etapa realizada.

6.1.6.1. Cuantificación de sólidos totales

Para la determinación de sólidos totales se acondicionaron previamente las cápsulas de porcelana durante 3 h a 45 °C en un horno de secado, seguidamente se recolectó la masa de cada una, para ello, se dejó enfriar la cristalería en un desecador. Posteriormente, se les colocó aproximadamente 4 g de muestra previamente seca del rastrojo, se volvió a medir la masa y se expuso el contenido, durante 24 h, a la misma temperatura en un secador. Finalmente, se midió la masa de la muestra seca hasta que su variación fuese inferior al 0.001 g. Es importante mencionar que la metodología NREL requiere que el contenido de humedad de biomasa sea menor al 10% para que no se altere la concentración efectiva de las disoluciones utilizadas, y así se evite sesgo tanto en la etapa de extracción como por una hidrólisis incompleta. La ecuación utilizada para el cálculo corresponde a la C.2.

6.1.6.2. Determinación de extractos

Para la determinación de extractos, se procedió a pesar aproximadamente 3 g de muestra, a las cuales se les realizaron dos extracciones consecutivas de 8 h cada una, en equipos soxhlet. Para ello, primeramente, se secó el balón a una temperatura de 105°C y se pesó. La primera extracción, se hizo con 150 mL agua MiliQ y la segunda con 150 mL de etanol al 95 %. Posteriormente, los solventes se unen en el balón y se proceden a remover con ayuda de un rotavapor. En donde el baño de agua se usó a 40 °C y se varió el vacío entre 350 mbar – 70 mbar para lograr remover ambos solventes. Finalmente, el balón se colocó en la estufa a 40 °C durante 24 h y se procedió a pesar. El cálculo del porcentaje de extractos se realizó con la ecuación C.4.



Figura 6.4. Equipos soxhlet y rotavapor utilizados en la determinación de extractos.

6.1.6.3. Determinación de lignina insoluble y cenizas

Se procedió a secar las muestras libres de extractos hasta que reportaran una humedad inferior al 10 %. Se tomaron 300 mg de estas en tubos de ensayo de presión y se les añadió 3,0 mL de ácido sulfúrico al 72%. Seguidamente, se llevó a cabo la primera hidrólisis a 30 °C durante 1 hora. Posteriormente, se diluyeron las mezclas con 84 mL de agua destilada y se llevaron a la autoclave a 121 °C por 1 hora. El hidrolizado se procedió a filtrar al vacío en crisoles de porcelana de porosidad media que se encontraban previamente calcinados a 575 °C y pesados.

El sólido residual recolectado en los crisoles se procedió a secar en la estufa a una temperatura de 105 °C por 6 horas hasta lograr que la masa de lignina se mantuviera constante. Finalmente, las muestras se calcinaron en la estufa a 575 °C durante 4,5 horas para determinar las cenizas insolubles en ácido y proceder con el cálculo de lignina insoluble mediante la ecuación C.5.

6.1.6.4. Determinación de lignina soluble en ácido

Al líquido filtrado se le realizó un barrido con el espectrofotómetro UV en longitudes de onda entre 205-350 nm, asociados a la cantidad de lignina soluble según lo que reporta el método para diferentes biomásas. Con el barrido realizado se determinó que los puntos que tenían una mayor absorbancia correspondían a 270 nm, 280 nm y 290 nm. Seguidamente, con patrón de lignina Kraft se procedió a realizar la curva de calibración para determinar la absorbancia a las longitudes de onda establecidas. En el Anexo 26, se presenta las pendientes obtenidas. Finalmente, se midieron las absorbancias de las muestras de forma que el dato se encontrará en el rango de absorbancia permitido entre 0,7 -1,0, para ello la alícuota tomada se diluyó con una solución al 4% de ácido sulfúrico.

6.1.7. Caracterización de biomasa SEM

Para la determinación cualitativa del cambio morfológico de la biomasa después de la exposición a los pretratamientos, se tomaron imágenes a diferentes magnificaciones con un microscopio electrónico de barrido (SEM). Para ello, al tratarse de una muestra no conductora se procedió a fijar la biomasa a la base con cinta metálica y se realizó un recubrimiento por bombardeo iónico en fase gaseosa de oro de 80 nm de espesor con el cobertor iónico de alto vacío.



Figura 6.5. Cobertor iónico de alto vacío.

Finalmente, la biomasa con la deposición de oro que otorga el carácter conductor necesario para la emisión de electrones se ingresa al microscopio electrónico de barrido, en donde se bombardea de electrones secundarios con una aceleración de voltaje de 15,0 kV.



Figura 6.6. Microscopio electrónico de barrido, CIEMic.

6.2 Reactivos y equipos

Los reactivos que se emplearon en el desarrollo experimental se presentan el Cuadro 6.4, en donde se presenta el fabricante y pureza de los mismos.

Cuadro 6.4. Reactivos utilizados para el desarrollo de las secciones experimentales.

Reactivo	Fabricante	Pureza /(%)
Hidróxido de Sodio	Labquimar	97
Yoduro de potasio	Sigma Aldrich	99
Oxígeno	Praxair	100
Ácido sulfúrico	Sigma Aldrich	96
Fructosa	Sigma Aldrich	99
Glucosa	Sigma Aldrich	99.5
Xilosa	Sigma Aldrich	99
Sacarosa	Sigma Aldrich	99
Etanol	Laboratorios Quimar	99
Ácido clorhídrico	Gamma	33

En el Cuadro 6.5, se presentan los equipos empleados tanto para el desarrollo experimental como caracterización de la materia prima, cuantificación de los azúcares fermentables y de crecimiento microbiológico.

Cuadro 6.5. Equipo empleado durante el desarrollo experimental.

Equipo	Fabricante	Placa UCR	Ámbito
Balanza analítica	H&C Weighing System	315896	(0-210) g
Estufa	Lindberg/Blue	144089	(25-600) °C
Secador de alimentos	Parallex	285952	(0-70) °C
Balanza de humedad	Sartorius	377151	(0-150) °C
Molino centrifugo	Retsch	378881	(6000-18000) rpm
Generador de ozono	Triogen	382272	(0-12) g O ₃ /h
Medidor de ozono	Teledyne	383813	-
Plantilla de agitación	Corning	356821	(0-500) °C
pHmetro	Sartorius	225539	(1-14)
Reactor	-	-	(0-3) L
Agitador	Applikon Biotechnology		(0-500) rpm
Indicador de ozono ambiental	Ozone Solutions	-	(0-0.14) ppm
Cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC	Agilent Technologies	379707	-
Espectrofotómetro	Thermo	381685	(200-750)
Microscopio Electrónico de Barrido	HITACHI S-3700 n	332831	40-120 kV
Cobertor iónico	Quorum	369225	0-80 mA

6.2.1. Diagrama experimental

El ozono que se utilizó en el proyecto se produjo con el generador de ozono marca Triogen, modelo Lab2b, a partir de oxígeno puro grado industrial. El equipo se operó en el rango de alimentación indicado por el fabricante de 2-5 L O₂/min y con una potencia de 115 V-1 HP-60 Hz.

Se hizo uso de un reactor de borosilicato equipado con un aspersor modelo M10, a través del cual se da el ingreso de ozono al sistema. Además, cuenta con: un agitador, tres mamparas, un ducto de toma de muestras y una salida de ozono, que se conectó el medidor de ozono residual y a su vez este pasa al destructor de ozono que contiene carbón activado para evitar la propagación de ozono al ambiente. En la Figura 6.7, se presenta el diagrama experimental que se utilizó para llevar a cabo la ozonólisis del rastrojo de piña.

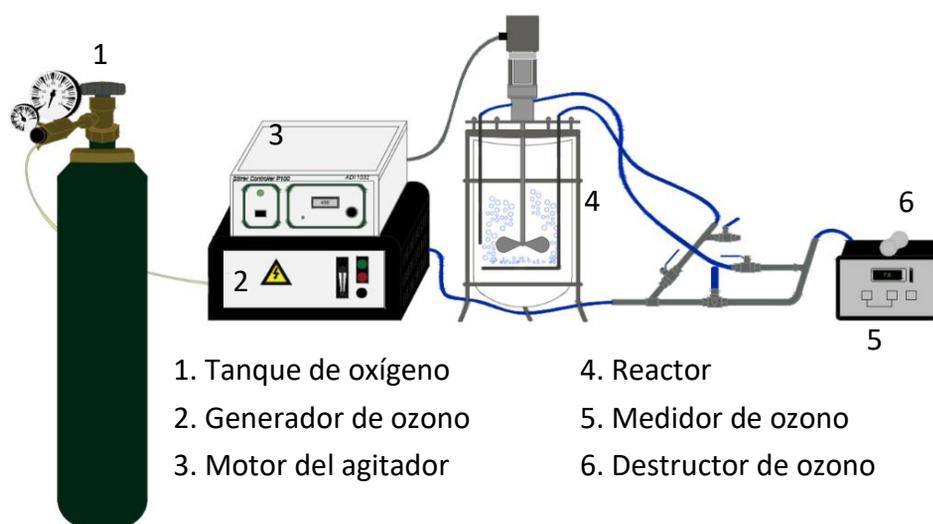


Figura 6.7. Diagrama experimental.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Caracterización de biomasa

En la primera etapa experimental se realizó la caracterización de la hoja de rastrojo de piña con el objetivo de cuantificar los componentes principales previo a la exposición del material a los pretratamientos, en el Cuadro 7.1 se presenta los resultados.

Cuadro 7.1. Composición de la hoja de rastrojo de piña entera (%m/m).

Fracción	Método Van Soest/ AOAC 942.05	Método NREL
Humedad	85,2 ± 0,10	-
Cenizas	7,43 ± 0,26	-
Hemicelulosa	20,6 ± 1,3	-
Celulosa	28,7 ± 1,3	-
Extractos liposolubles	-	18,82 ± 0,20
Lignina Insoluble	1,6 ± 1,2	10,07 ± 0,11
Lignina Soluble	-	1,90 ± 0,02

El pretratamiento que se estudió a lo largo de esta investigación, se caracteriza por ser altamente reactivo hacia el ataque de los compuestos lignocelulósicos. Por ello, una de las variables de mayor interés en esta sección corresponde a los porcentajes de lignina en biomasa, debido a que por medio de su cuantificación y comparación se logró determinar la efectividad de los procesos para la remoción y desorganización del material estructural en cada una de las corridas.

Es de importancia recalcar que por el método Van Soest se estimó un valor de lignina insoluble en la hoja de rastrojo de 1,6 % m/m y con la metodología NREL se obtuvieron valores de 10,07 % lignina insoluble y 1,90 % para lignina soluble. La diferencia entre los porcentajes reportados se le atribuye a que la metodología Van Soest opera bajo la suposición que las paredes celulares se dividen en compuestos digeribles (proteínas, azúcares, pectina, etc) y no digeribles (hemicelulosa, celulosa y lignina). Por lo tanto, el material es expuesto a digestiones consecutivas y, según Velásquez *et al.* (2019) y Segura *et al.* (2007), aseguran que debido a la

naturaleza de la sustancia que se utiliza en la digestión con detergente ácido se ha determinado que la lignina llega a solubilizarse significativamente, lo que incrementa la degradación del compuesto en la digestión consecutiva con ácido fuerte entre un 50 % -80 %, razón a la cual se le atribuye que el dato reportado estuviera por debajo del rango porcentual esperado (Chaves, Waghorn, & Tavendale, 2002). Debido a lo expuesto anteriormente se decide utilizar los valores obtenidos por la metodología NREL. Ya que esta técnica de caracterización, en el proceso de extracción hace uso de agua/etanol, sustancias que únicamente se encargan de la remoción de taninos, clorofilas, gomas polares, almidones, saponinas, minerales hidrosolubles y fertilizantes. Además, son compuestos que poseen poca afinidad hacia el ataque de la lignina (Irías A, 2014; A Sluiter, Ruiz, Scarlata, Sluiter, & Templeton, 2008; Amie Sluiter *et al.*, 2013).

Por otro lado, es de importancia mencionar que en esta investigación se utilizó únicamente la hoja del rastrojo de piña. Ya que la sección foliar de la biomasa según Vargas *et al.* (2019) y Hernández & Prado (2018), representa aproximadamente un 84 % de la planta, se recolecta con una menor cantidad de suciedad, es la sección más fácil de limpiar y posee la mayor disponibilidad de material orgánico en la biomasa, por ende cuenta con más sustrato para la obtención de azúcares reductores. Además, se reporta que las hojas poseen un contenido medio de minerales como K, Cu, Fe, Mg y Zn (Vargas *et al.*, 2019). La hoja del rastrojo de piña se empleó como el sustrato principal en base seca, debido a que se tiene facilidad de manejo del material para homogenizar el tamaño de partícula, se garantiza la preservación de la biomasa y la inocuidad del sustrato.

Como se observa en el Cuadro 7.1, la biomasa posee un alto porcentaje de humedad que se le atribuye a su composición orgánica con elevada disposición de grupos hidroxilo que confiere al material un alto grado de higroscopicidad. El contenido de ceniza está por debajo del 10 %, lo cual es beneficioso porque al existir baja cantidad de material inorgánico en la biomasa, como los minerales expuestos anteriormente y oligoelementos, se evita la reducción

de la efectividad de los tratamientos por el efecto de amortiguación por parte de estos (Amador, 2009; Amie Sluiter *et al.*, 2013).

Finalmente, se reporta un porcentaje de celulosa próximo al 29 % que al ser un polisacárido compuesto por monómeros de glucosa permite la producción de dicha azúcar fermentable en los diferentes tratamientos de interés. Además, la biomasa contiene un 20 % de hemicelulosa que al estar compuestos por diferentes polisacáridos como xilanos, mananos, xiloglucanos y galactanos garantiza la producción de diferentes azúcares fermentables como la xilosa, glucosa, fructosa, manosa, entre otros (Amador, 2009; Zhou, Broadbelt, & Vinu, 2016).

7.2. Obtención de azúcares fermentables en el pretratamiento de ozonación de rastrojo de piña

Como se ha expuesto anteriormente el ozono en medio líquido es un agente oxidante que presenta alta reactividad hacia el ataque de la lignina, mas al tener un potencial de oxidación elevado, no presenta interacción exclusiva con este compuesto. Según Travaini *et al.*(2016), también existe reacción entre el ozono y los carbohidratos en la biomasa pero a una tasa 10^6 veces más lenta que entre el ozono y la lignina. También, la velocidad y la ruta de reacción se ven influenciadas por las condiciones de operación del medio. En la Figura 7.1, se presenta el comportamiento de los factores en estudio en el análisis Taguchi L_9 sobre la variable de respuesta de azúcares fermentables liberada en la disolución, valores que se encuentran tabulados en el Cuadro B.3. Además, en el Anexo 27 se presenta la relación de señal de ruido (S/N), la cual se opera bajo la suposición de “el más grande es mejor” porque se quiere obtener la mayor cantidad de azúcares en el proceso.

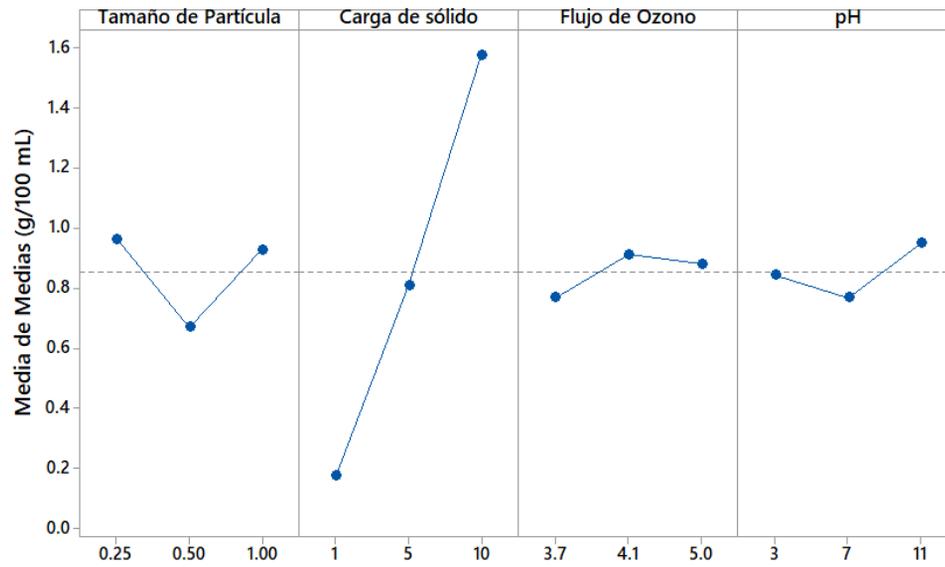


Figura 7.1. Comportamiento de las medias con los factores en estudio para la determinación de azúcares fermentables con el pretratamiento de ozonólisis.

En la Figura 7.1 se evidencia que la variable en estudio de mayor significancia corresponde a la carga de rastrojo de piña, este factor presenta un comportamiento ascendente de forma que al operar con el valor de 10% m/v se obtiene una concentración de azúcares por arriba de la media de 0,82 g/100 mL. Esto se le atribuye a que existe mayor disponibilidad de sustrato en el medio acuoso que interacciona con los radicales disueltos como es el hidroxilo, superóxido y el peróxido de hidrógeno. Estos reaccionan directamente tanto con los carbohidratos de la biomasa según el mecanismo presente Figura 3.5, como con el ozono por medio de una 1,1-cicloadición del carbón anomérico (ver Figura 3.6) dando resultado una mayor formación de azúcares (Olkkonen *et al.*, 2000; Travaini *et al.*, 2016).

Por otro lado, como se observa en la Figura 7.1 y en el Anexo 28, el comportamiento de los otros tres factores se encuentra muy cercano a la media de los datos, por ello para determinar la significancia de los variables se realizó un ANOVA. Del análisis estadístico como se ve Figura 7.2, se logra evidenciar que los factores en estudio no contribuyen significativamente sobre la variable de respuesta debido a que el p-value es superior a 0,05 como se reporta en el Cuadro 7.2.

Cuadro 7.2. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de azúcares fermentables.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Varianza	Radio de Varianza	p-Value
T. Partícula	2,00	0,11	0,06	3,28	0,0848
C.Sólido	2,00	5,60	2,80	167,28	0,0000
Flujo Ozono	2,00	0,07	0,04	2,14	0,1731
pH	2,00	0,07	0,03	1,97	0,1958
Error	9,00	0,15	0,0167		
Total	17,00	6,00			

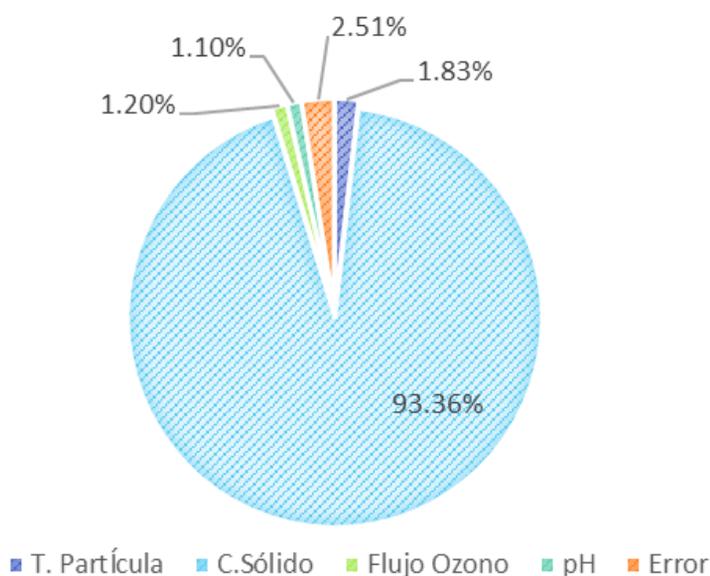


Figura 7.2. Contribución de cada uno de los factores utilizados en el Taguchi L₉ para la determinación de azúcares fermentables con el pretratamiento de ozonólisis.

La no significancia del tamaño de partícula en esta sección se le atribuye a que la materia prima se operó dentro de un intervalo muy cercano entre 0,25 mm -1,0 mm, además Travaini *et al.*(2016) expresa que la forma en la que este factor afecta la ozonólisis depende mucho del tipo de biomasa en estudio, por su composición, y la humedad que contenga. Sin embargo, es un parámetro importante debido a que el pretratamiento se rige bajo una reacción superficial, por lo tanto, es de esperar que, a mayor área disponible en la biomasa, el ozono y sus radicales se difundan con mayor facilidad, comportamiento que se observa con

el menor tamaño de partícula en los resultados de esta investigación. Por otro lado, en investigaciones previas como García-Cubero *et al.* (2009) y Vidal & Molinier (1988) también han concluido que para las biomasas de paja de trigo y aserrín de álamo respectivamente, este factor no influye significativamente en la producción de azúcares.

Por otro lado, la deficiencia en azúcares a menor tamaño de partícula se justifica por el fenómeno de aglomeración, que tiende a aumentar conforme lo hace el área superficial. Este fenómeno es producto del choque entre las partículas o aglomeración inducida por el líquido, produciendo así la formación de puentes entre el material, ocasionando una disminución del área superficial disponible para el ataque del ozono. Como es el caso del tamaño de partícula de 0,5 mm, en donde se puede observar una disminución en la producción de azúcar, fenómeno que también pudo afectar el rendimiento con el tamaño de partícula más pequeño en menor proporción. Esto puede suceder debido a que, al ser un tamaño mediano, al aglomerarse produce más fácilmente la sedimentación del material por ser más pesado, lo que propicia la formación de aglomerados más densos (Marangon *et al.*, 2015).

En contraste, se tiene que al operar con un tamaño de partícula de 1.0 mm se obtienen rendimientos por arriba de la media, que representa un resultado importante porque implica la disminución en costos operativos, al consumir menos energía eléctrica para la reducción del material. Por otro lado, es de importancia considerar para futuras investigaciones que Travaini *et al.* (2016) reporta pérdidas de ozono cuando se trabaja con partículas mayores de 2,0 mm, resultado que concede a una disminución en la cinética de reacción causada por la faltante de área superficial expuesta.

El flujo de ozono fue otro de los factores con poca significancia, esto se pudo deber a que el rango de trabajo también fue cercano, mas este se vio limitado por los parámetros operacionales del equipo para la entrada de oxígeno. Sin embargo, se puede observar, que cuando el flujo fue medio se logró una mayor cuantificación de azúcares y esto se debe a que el ozono tiene un tiempo de residencia adecuado, lo cual proporciona mayor transferencia de

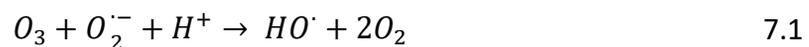
masa, incrementando así la concentración de ozono disuelto en el medio líquido y la cantidad de radicales en disolución. Por otro lado, se tiene que al aumentar el flujo se reduce el tiempo de residencia, y según Marangon *et al.* (2015) aumenta significativamente el consumo de ozono lo que hace que el proceso sea más costoso. Además, se tiene que al ingresar una corriente tan alta el ozono empieza a escapar producto de la barrera de transferencia de masa entre la fase sólida/líquida -gaseosa lo cual no es favorable para el proceso.

Para terminar, se tiene que el factor de pH tuvo una tendencia similar en los resultados, siendo así no significativo. Mas como se ha expuesto a lo largo de la investigación, es un factor determinante en la ruta de acción que tenga el ozono y la formación de radicales en disolución acuosa por su descomposición. En las ecuaciones 1.1 a 1.6 se presenta el mecanismo de degradación del ozono, en donde se evidencia que la presencia de iones hidroxilo desplaza las reacciones hacia la formación de radicales y por ende, se favorece la interacción de estos con los carbohidratos de la biomasa. Además, según Marangon *et al.* (2015) y Chiang *et al.* (2006), la descomposición del ozono ha llegado a ser notable con pH superiores a 4 y tiene un comportamiento ascendente al operar con disoluciones de mayor alcalinidad, por lo tanto, es de esperar que a mayor pH se obtenga un mayor desprendimiento de azúcares como se dio en esta investigación (García-Cubero *et al.*, 2009; Travaini *et al.*, 2016).

Como se observa en el Cuadro A.38, independiente del pH inicial de operación, al finalizar el proceso de ozonólisis esta variable se encontraba entre 4-5, factor que se le atribuye a los subproductos de la reacción del ozono con la lignina y sus radicales, que corresponden a ácidos orgánicos de bajo peso molecular como ácido fórmico y acético, los cuales son responsables de la caída del pH desde 6,5 a 2 según datos teóricos. Por otro lado, Travaini *et al.*, (2013) afirma que: “como ventaja se tiene que no se han encontrado compuestos inhibidores en el medio, como el furfural y HMF, que son productos de la degradación de azúcares. Por lo tanto, este licor no interferiría con una hidrólisis o fermentación posterior” (García-Cubero *et al.*, 2009; Kaur, Oberoi, Bhargav, Sharma-Shivappa,

& Dhaliwal, 2012; Travaini, Otero, Coca, Da-Silva, & Bolado, 2013). Es importante recalcar que esta disminución del pH afecta la ruta de reacción del ozono de forma in-situ y sobretodo limita la determinación de azúcares que se pueda llegar a obtener con los pH básicos en estudio, lo cual puede ser la razón de que la obtención de azúcares se encuentre cercana entre sí.

Asimismo, se tiene que al operar a pH 3 se logró una buena obtención de azúcares y esto se pudo dar debido a que, a menor medida, se da la formación de radicales (superóxido, hidroxilo y el peróxido de hidrógeno) producto del mecanismo entre el ozono-lignina y el mecanismo de Criegee. Además, Ragnar *et al.* (1999) establece que el superóxido en medios ácidos tiende a reaccionar con el ozono y dar como resultado la formación de más radicales hidroxilo, como se observa en la ecuación 7.1, aumentando así la disponibilidad de este. También, se pudo atribuir al hecho de que el radical superóxido tiene la capacidad de difundir en la fibra del material y producto de la interacción con el ozono forma radicales hidroxilos dentro del sustrato que consumen la hemicelulosa y parte de la celulosa disponible en el momento de su formación (Coca *et al.*, 2016).



Finalmente, al tomar en cuenta los rendimientos según el valor de significancia que aportan los factores en esta sección y al considerar los costos del proceso se propuso operar a una carga de biomasa de 10 %, a un flujo de ozono de 4,1 g O₃/h, un pH de 11 y con a un tamaño de partícula de 1,00 mm. También, es importante mencionar que las azúcares fermentables que se cuantificaron correspondieron a: glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa. Dichas azúcares son producto de la solubilización de la hemicelulosa del material, específicamente del complejo lignina-hemicelulosa, ya que este al ser un heteropolisácarido sus monómeros principales tienden a ser glucosa y xilosa. De igual forma, la solubilización parcial de la celulosa contribuye en la producción de glucosa. Además, esta azúcar tiende a liberarse en forma de isómeros, convirtiendo así una parte en fructosa, y la sacarosa es

producto de la interacción entre la glucosa y fructosa en disolución (Agbor *et al.*, 2011; Coca *et al.*, 2016; Marangon *et al.*, 2015; Travaini *et al.*, 2013).

7.3. Deslignificación de rastrojo de piña con el pretratamiento de ozonólisis.

Seguidamente, con el fin de evidenciar la eficacia del tratamiento para la remoción de lignina, se cuantifica este parámetro bajo la metodología NREL (National Renewable Energy Laboratory) para cada una de las corridas del Taguchi L₉. En la Figura 7.3, se presenta la tabla de respuesta de los efectos sobre la media de los datos obtenidos, estos valores se encuentran tabulados en el Cuadro B.10. Además, en el Anexo 30 se presenta la relación de señal de ruido (S/N), la cual se opera bajo la suposición de “el más pequeño es mejor” porque se quiere obtener la menor cantidad de lignina insoluble presente en el material.

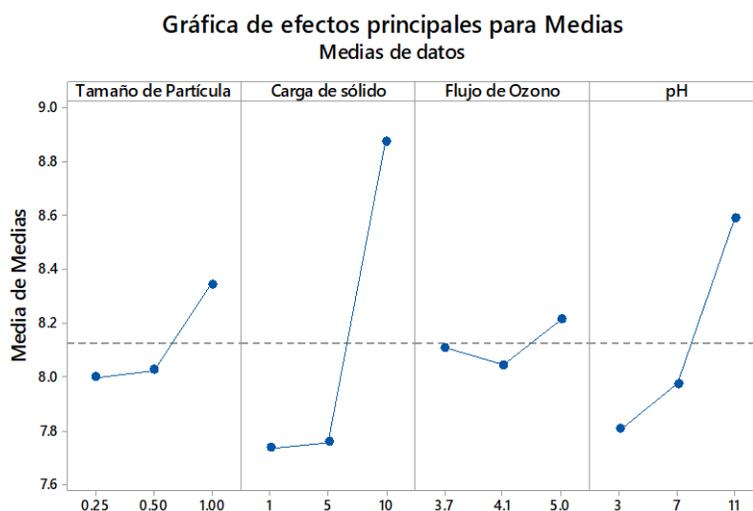


Figura 7.3. Comportamiento de las medias con los factores en estudio para la determinación de lignina insoluble en ácido con el pretratamiento de ozonólisis.

De la figura anterior, se puede observar que, bajo la variable de respuesta de lignina insoluble, los factores de la carga de sólido y pH tienen diferencias significativas sobre la media y mediante el ANOVA que se presenta el Cuadro 7.3, se confirma que son estadísticamente significativas puesto a que el p-value se encuentra por debajo de 0.05.

Cuadro 7.3. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Varianza	Radio de Varianza	p-Value
T. Partícula	2,00	0,45	0,22	6,63	0,0170
C.Sólido	2,00	5,08	2,54	74,99	0,0000
Flujo Ozono	2,00	0,09	0,04	1,29	0,3219
pH	2,00	2,05	1,02	30,24	0,0001
Error	9,00	0,30	0,03		
Total	17,00	7,97			

Además, en la Figura 7.4, se tiene que son los factores que contribuyen más sobre la remoción de lignina. Por otra parte, el tamaño de partícula solo tuvo un 5% de influencia, mas según el análisis también es un factor significativo y se obtuvo que el flujo de ozono no corresponde una variable significativa en esta sección.

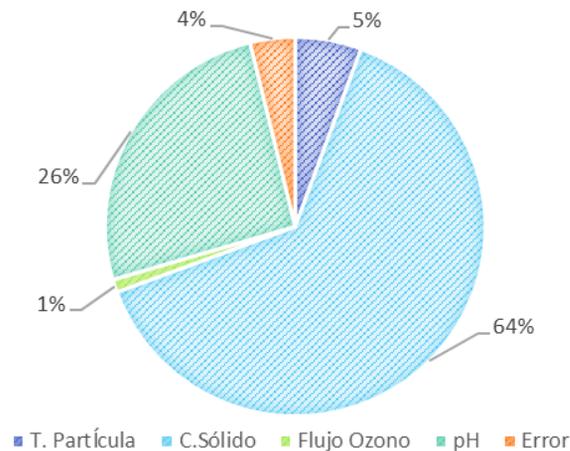


Figura 7.4. Contribución de cada uno de los factores utilizados en el Taguchi L₉ para la determinación de lignina insoluble.

De forma análoga a la sección anterior la carga de sólido juega un papel importante. En este caso, el proceso se ve favorecido al trabajar con los menores porcentajes de biomasa, obteniendo así tendencias de remoción de lignina insoluble de aproximadamente un 23%. Esto se le atribuye al hecho de que existe menor cantidad de sustrato en el reactor permitiendo que el ozono disuelto reaccione de forma homogénea con las diferentes secciones de área superficial del material. De forma contraria se tiene que, al trabajar con la

carga más alta, se logró solamente una deslignificación del 12 %, resultado que se pudo dar debido a que existe una deficiencia en la concentración de ozono disuelto para atacar toda la biomasa disponible en el medio. Según García-Cubero *et al.*(2009) y Travaini *et al.* (2013), para lograr una remoción entre el 30 % -50 % de lignina se estima que por gramo de material seco se debe proporcionar entre 0,09 g – 0,2 g de ozono, sin embargo, es un valor que es muy susceptible a cambios según la composición de la biomasa y pH del medio. Bajo el supuesto anterior, se tiene que la cantidad de ozono disponible por gramo para la carga de sólido del 10 % es solo de 0,027 g al considerar un flujo promedio, por lo cual es insuficiente para reaccionar con todas las secciones del material.

Igualmente, se tiene que el pH contribuye significativamente a la deslignificación del material y se tiene que al operar a medios ácidos se logra una mayor remoción. Como se ha mencionado, la ruta de acción del ozono en medio ácido ocurre de forma más directa sobre los componentes electrofílicos de la biomasa y no se favorece la formación de sus especies radicales por su descomposición, razón por la cual en esta sección fue más efectivo operar a pH 3 y contraproducente conforme aumentaba la basicidad de la disolución, comportamiento que se asemeja a los resultados obtenidos por García-Cubero *et al.*(2009). Sin embargo, se ha comprobado que operar en medios alcalinos no es del todo desfavorable en cuanto a deslignificación, ya que los radicales reaccionan con los carbohidratos del material logrando así la separación de la lignina por la ruptura del enlace entre compuestos (García-Cubero *et al.*, 2009; Travaini *et al.*, 2016).

Finalmente, se tiene el factor de tamaño de partícula es significativo con un p-value de 0.0170, pero contribuye solo un 5 % sobre la variable de respuesta, esto se le atribuye a la misma razón explicada con anterioridad sobre la cercanía del intervalo de operación. Sin embargo, se determina que al trabajar con las partículas pequeñas se obtienen mejores resultados en cuanto a la remoción de lignina, esto se debe a que existe mayor área superficial, por lo tanto, se facilita la transferencia de masa entre el ozono disuelto y la interfase del sustrato, produciendo así mayor solubilización del material y producción de ácidos orgánicos

en disolución, dichos resultados concuerdan con lo expuesto en las investigaciones de Barrera-Martínez *et al.* (2016) y García-Cubero *et al.* (2009).

Si bien es cierto, el objetivo de esta investigación no recae sobre la cuantificación de los ácidos orgánicos, realizar esto es una forma alternativa de evidenciar la efectividad del tratamiento sobre la biomasa. En los Anexos 5 al 22, se observa que en cada una de las corridas en el tiempo de retención de 10 min – 12 min se presenta un área que coincide con la retención de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, sin embargo, no fue posible identificar su naturaleza. Pero se puede apreciar que cuando se opera con los menores pH y con la menor carga de sólido se tiene un área prominente con respecto a las corridas con el medio básico y mayor porcentaje de biomasa. Esta tendencia coincide con los resultados expuestos sobre la variable de respuesta de lignina insoluble, confirmándose así que estas condiciones favorecen la deslignificación.

Por otra parte, se cuantifica la lignina soluble del material que corresponde a los monolignoles que se desprenden del compuesto producto de la inserción de los grupos funcionales hidrófilos (carboxilo e hidroxilo) posterior al ataque del ozono (Travaini *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos para esta variable se encuentran en el Cuadro B.10, de ello se tiene que, en las mejores condiciones, se logra aumentar la cantidad de lignina soluble en un 31 % y bajo las peores condiciones en un 11%. Sin embargo, al realizar un balance general de lignina total en material se tiene una deficiencia de aproximadamente 2% con respecto a la cantidad inicial reportada en la biomasa, por ello una recomendación para análisis posteriores sería realizar la cuantificación de los ácidos orgánicos y monolignoles con el fin de evidenciar que el porcentaje faltante es producto de la formación de dichos ácidos.

Igualmente, se procede a realizar la prueba Taguchi L₉ con los resultados obtenidos para la lignina soluble. En la Figura 7.5, se presenta la tabla de respuesta de los efectos sobre la media de los datos obtenidos. Además, en el Anexo 32 se presenta la relación de señal de ruido (S/N), la cual se opera bajo la suposición de “el más grande es mejor” porque se quiere obtener la mayor cantidad de lignina soluble presente en la disolución. Y mediante el ANOVA,

que se presenta en el Cuadro 7.4, se determina que las variables significativas corresponden al pH, carga de sólido y tamaño de partícula puesto a que el p-value se encuentra por debajo de 0.05.

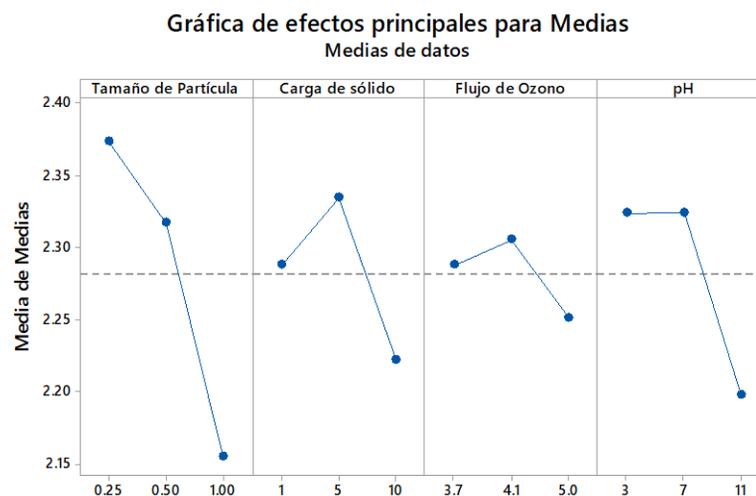


Figura 7.5. Comportamiento de las medias con los factores en estudio para la determinación de lignina soluble en ácido con el pretratamiento de ozonólisis.

Cuadro 7.4. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina soluble.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Varianza	Radio de Varianza	p-Value
T. Partícula	2,00	0,155	0,077	37,066	0,0000
C.Sólido	2,00	0,038	0,019	9,119	0,0069
Flujo Ozono	2,00	0,009	0,005	2,181	0,1689
pH	2,00	0,064	0,032	15,296	0,0013
Error	9,00	0,019	0,002		
Total	17,00	0,285			

De la Figura 7.6, se puede apreciar que los factores que contribuyen en mayor proporción se encuentran el tamaño de partícula y el pH, ya que como se aprecia en la figura anterior son los resultados que se encuentran más alejados de la media de los datos.

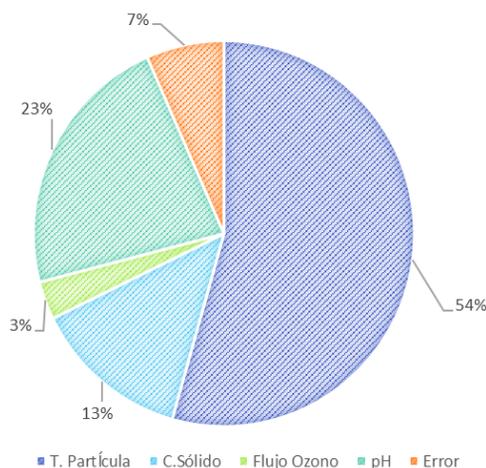


Figura 7.6. Contribución de cada uno de los factores utilizados en el Taguchi L9 para la determinación de lignina soluble.

En este caso el factor de tamaño de partícula es el mayor contribuyente para la obtención de lignina soluble, esto se le atribuye al hecho de que las reacciones entre el ozono y sus radicales con el material se rigen bajo una reacción superficial, por lo que al aumentar el área expuesta el ataque electrofílico y la inserción de grupos carbonilo e hidroxilo se ve favorecido para la producción de monómeros de lignina soluble. Se tiene que al operar con la carga media de sólido se obtiene la mayor cantidad de lignina soluble en disolución resultado que se atribuye a que existe más disponibilidad de sustrato y ozono en el medio para que se dé la degradación de lignina.

De igual forma se evidencia que al operar con el pH de 3 y 7 se presenta mayor cantidad del compuesto soluble, este comportamiento se debe al hecho que hay menor presencia de radicales, ya que estos en el medio acuoso tienen influencia hacia la oxidación de los compuestos fenólicos, sobre todo el radical OH que no difunde dentro de la fibra y tiende a reaccionar cerca de lugar donde se forma por lo que disminuye la cantidad de monolignoles. Además, producto de la oxidación de los compuestos de la lignina soluble se da paso a la formación de ácidos orgánicos, resultado que se complementa con las áreas obtenidas con los pH 3 y 7 en los tiempos de retención definidos para sustancias orgánicas y con los pH finales, presentes en el Cuadro A.38 (Barrera-Martínez *et al.*, 2016; Coca *et al.*, 2016).

Finalmente, al unir los resultados obtenidos en las secciones anteriores, se tiene que con esta biomasa las condiciones operativas que favorecen al pretratamiento de ozonólisis

serían: utilizar una carga de sólido del 5 % con el fin de proporcionar una buena transferencia de masa entre las fases, evitar fenómenos de aglomeración o sedimentación del material y así garantizar un ataque homogéneo por parte del ozono sobre la lignina del material; usar un flujo de ozono de 4,1 g O₃/h para proporcionar buen un tiempo de residencia e incrementar la concentración de ozono disuelto en medio líquido. Hacer uso de un tamaño de particular de 1,0 mm, debido a que se disminuyen costos operativos y se evita el fenómeno de aglomeración y, por último, se recomienda utilizar el pH 3 debido a que se favorece la ruta de reacción directa del ozono y se disminuye la presencia de radicales, además que bajo la configuración de reacción que se utilizó se evidencia un buen rendimiento de azúcares.

7.4. Curva de crecimiento bacteriano del microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida* KT2240

Como fase previa a la exposición de la hoja de rastrojo de piña al microorganismo, se realizó un Factorial 2³ con repetición para determinar las condiciones del medio de cultivo mínimo que favorecen la velocidad de crecimiento microbiológico, ya que esto permitirá que, al proporcionar la biomasa, correspondiente a la fuente del carbono, la bacteria crezca a una mayor tasa y así mejorar los rendimientos de azúcares y la deslignificación del material producto de los complejos enzimáticos. Las velocidades de crecimiento específico obtenidas a partir del modelo de *Monod* se presentan en la Figura 7.12. A continuación, en la Figura 7.7 y 7.8, se ejemplifica una representación gráfica de la curva característica de crecimiento bacteriano y el modelo utilizado para la determinación de la constante.

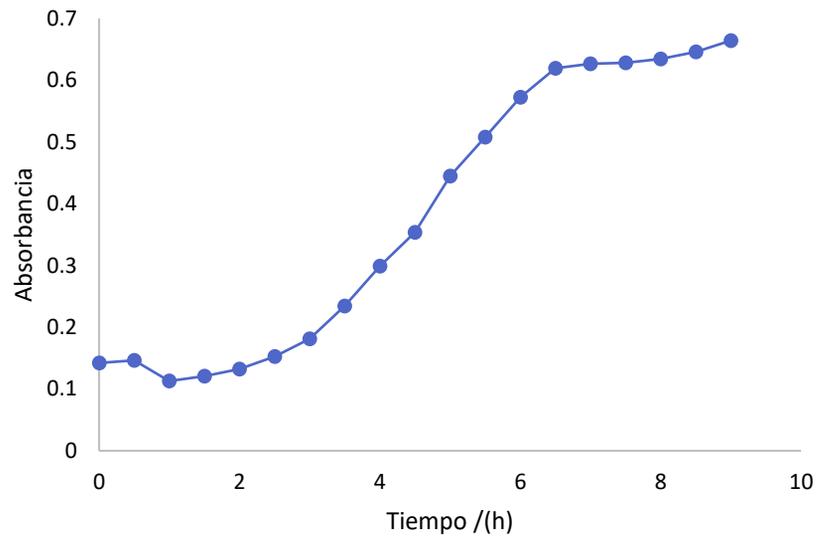


Figura 7.7. Curva de crecimiento bacteriano obtenida a pH7, con inoculación líquida y el medio Luria Bertani.

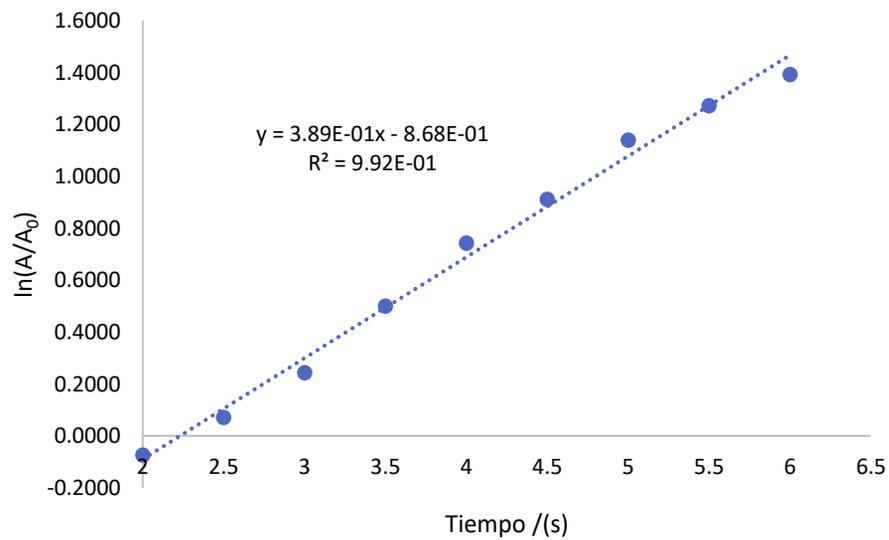


Figura 7.8. Determinación de la constante de velocidad de crecimiento específica a pH7, con inoculación líquida y el medio Luria Bertani.

Primeramente, a los datos se les procede a realizar un análisis de residuos con el fin de comprobar que estos cumplen con los supuestos de aleatoriedad y un comportamiento normal, los cuales se evidencian en la Figura 7.9. En la gráfica de la esquina superior izquierda se observa la tendencia de la normalidad de los datos, del histograma se tiene una tendencia central con poca variabilidad, y la varianza e independencia de los datos se observa en los otros gráficos puesto a que los puntos se encuentran distribuidos de forma aleatoria sobre la banda de observación.

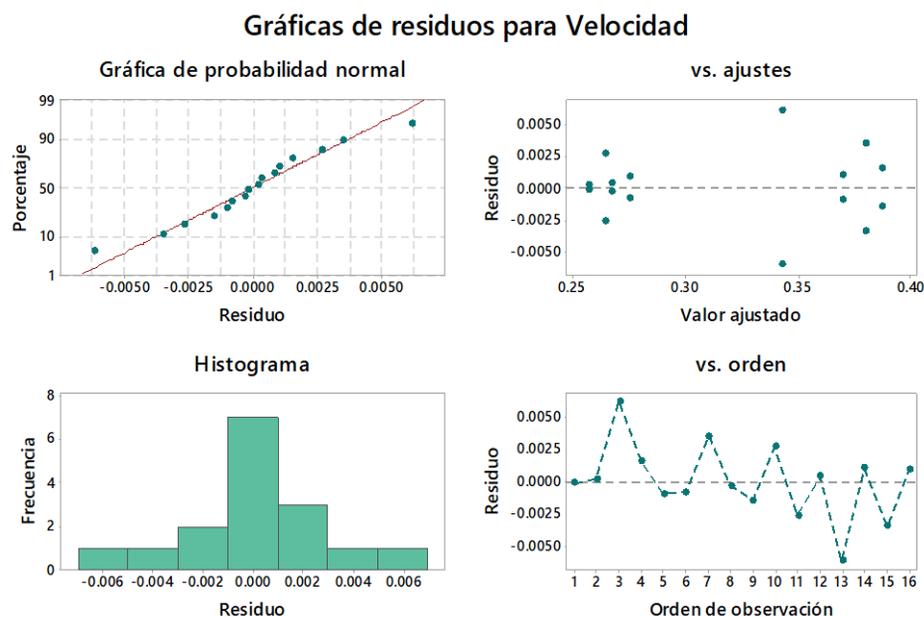


Figura 7.9. Gráfico de residuos para probar supuestos de normalidad, varianza constante e independencia obtenidos con Minitab® Student.

Según el análisis factorial presente en el Anexo 34, se obtuvieron los resultados presentes en la Figura 7.10. En la gráfica a), se aprecia los efectos e interacciones significativas para la variable de respuesta, los cuales corresponden al: medio de cultivo, pH, medio de inoculación y la interacción del pH-medio de cultivo, significancia que se confirma ya que el p-value en estos parámetros es menor al criterio de aceptación $p < 0.01$. De igual forma, en el diagrama de Pareto se observan los efectos significativos ya que sobrepasan la línea de

referencia, y la magnitud del efecto sobre la velocidad de crecimiento específica, logrando concluir que el factor que afecta en mayor proporción corresponde al medio de cultivo.

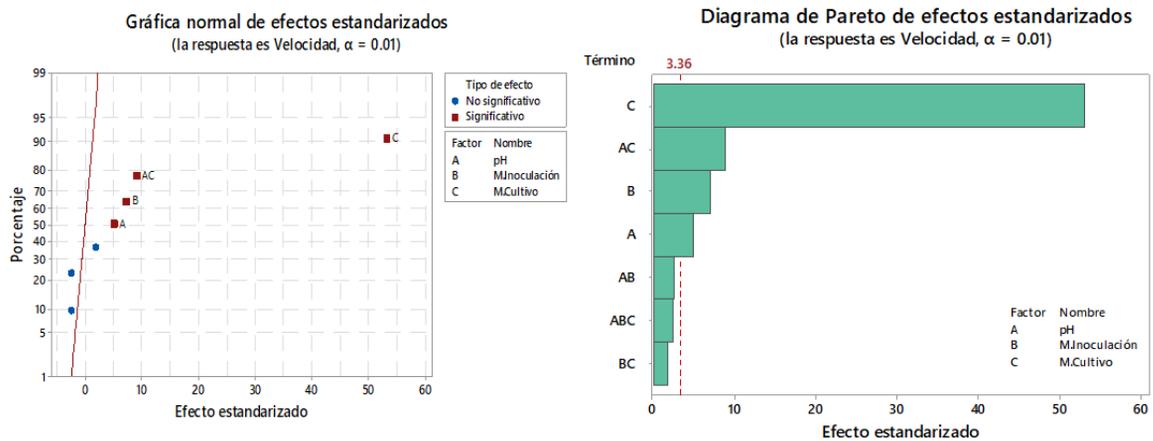


Figura 7.10.a) Gráfica de efectos estandarizados b) Diagrama de Pareto de los efectos obtenidos por el modelo en Minitab® Student.

En la Figura 7.11, se presenta el comportamiento de los factores e interacciones en estudio con respecto a la media de los datos. De la gráfica a) se puede apreciar que los medios de cultivo generan una diferencia significativa, debido a que la pendiente de la recta que es muy pronunciada. Por otro lado, los otros dos factores no generan mayor variabilidad sobre la velocidad de crecimiento que tiene el microorganismo, pero se obtienen mejores resultados cuando se opera con los niveles altos. De la gráfica b) se determina que la única interacción significativa corresponde al medio de cultivo-pH, pues las rectas se intersecan, además se observa que las rectas de las demás interacciones se comportan de forma paralela. Por ello, se concluye que las condiciones más favorables de los niveles estudiados para el crecimiento de *Pseudomonas putida* corresponden al medio de cultivo LB, a pH 7 e inocular la cepa en medio líquido.

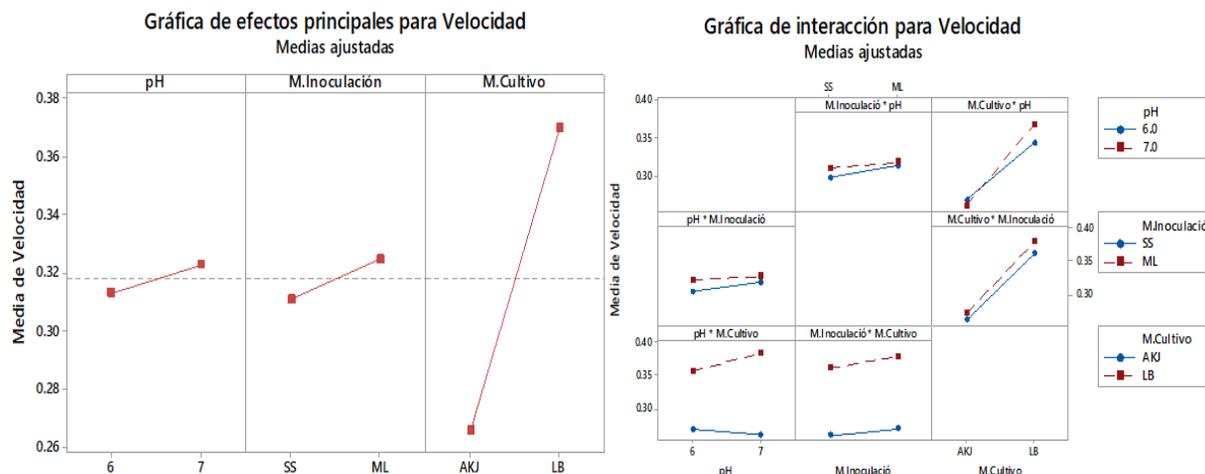


Figura 7.11.a) Gráfica de efectos principales b) Gráfica de interacciones obtenidas en Minitab® Student.

El hecho de que el medio mínimo Luria-Bertani proporcione las velocidades más altas, se le atribuye a que su composición es más rica en nutrientes, sobretodo por el compuesto de triptona (peptona de la caseína) que le brinda al microorganismo nitrógeno, azufre, fósforo, minerales y aminoácidos esenciales. Además, el extracto de levadura provee aminoácidos, péptidos, vitaminas del grupo B, carbohidratos y trazas de oligoelementos esenciales. También, el contenido de cloruro de sodio propicia los electrolitos necesarios para el transporte y equilibrio osmótico de los microorganismos, factor que es otra desventaja con respecto al medio Abdul-Kadhim & Jarallah, ya que este únicamente lo compone el de extracto de levadura, sulfato de magnesio; que le proporciona azufre y magnesio, y fosfato de amonio que provee el fósforo y nitrógeno (Lengeier, Drews, & Schlegel, 1999; Martínez-García, Nikel, Aparicio, & de Lorenzo, 2014; Obeng et al., 2018).

Por otro lado, se tiene que al operar a pH 7 la cepa crece a una mayor tasa, lo que concuerda según lo expuesto por Lengeier *et al.* (1999) y Sánchez-Clemente *et al.* (2018), ya que la bacteria al provenir del suelo y hábitats acuáticos se puede clasificar como neutrófilo. Además, según Obeng *et al.* (2018) en su investigación sobre la cuantificación de celulasas con esta bacteria, determina que a este pH se obtiene la mayor tasa de actividad de glucosidasas

y actividades por arriba del promedio de endoglucanasas y exoglucanasas. Finalmente, se tiene que al inocular en medio líquido la velocidad específica aumenta y esto se le atribuye a que existen mayor cantidad de UFC que se encuentran acondicionadas con los requerimientos nutricionales. En la Figura 7.9, se aprecia la gráfica de cubo en donde se visualiza que el promedio de las mejores corridas produce una una tasa de crecimiento de 0.3875 h^{-1} .

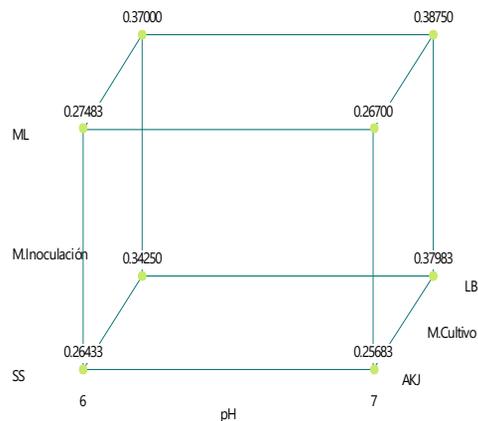


Figura 7.12. Gráfica de cubo obtenido en Minitab® Student.

7.5. Concentración de azúcares fermentables obtenidas con microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida* KT2440.

Seguidamente, se procedió a llevar a cabo la hidrólisis con el microorganismo *Pseudomonas putida* KT2440, para ello, se fijaron las mejores condiciones obtenidas en la sección preliminar y se procedió a variar la carga de rastrojo de piña, que corresponde a la fuente de carbono. Esta variable es de importancia, ya que se busca operar con altas cargas de sustrato con el fin de obtener concentraciones de azúcares por arriba del 5 % m/v, para que estas sean aprovechables en fermentaciones o producción de hidrógeno (Córdoba, 2011; Montoya-Pérez & Durán-Herrera, 2017). Como análisis estadístico se realizó un análisis de varianza de un solo factor a un 95% de confianza, los datos utilizados se encuentran a continuación.

Cuadro 7.5. Concentración total de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento con el microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida*.

Carga de Sólido, CS /(%m/v)	Concentración, Cn /(g/100 mL)		
	A	B	C
15	0,92409	0,89430	0,85230
45	0,91706	1,05964	1,16836
60	0,76866	0,84912	0,76528

En la gráfica 7.13, se presenta el comportamiento de los datos obtenidos de azúcares fermentables cuantificados posterior a la hidrólisis con el microorganismo, de ello se tiene un comportamiento normal, que se comprobó ya que al realizar la prueba de Anderson-Darling el p-value fue de 0,276. En el histograma se aprecia una tendencia central con variabilidad media, y de los gráficos de residuos se observa que los datos se comportan de forma aleatoria por ende son independientes entre sí.

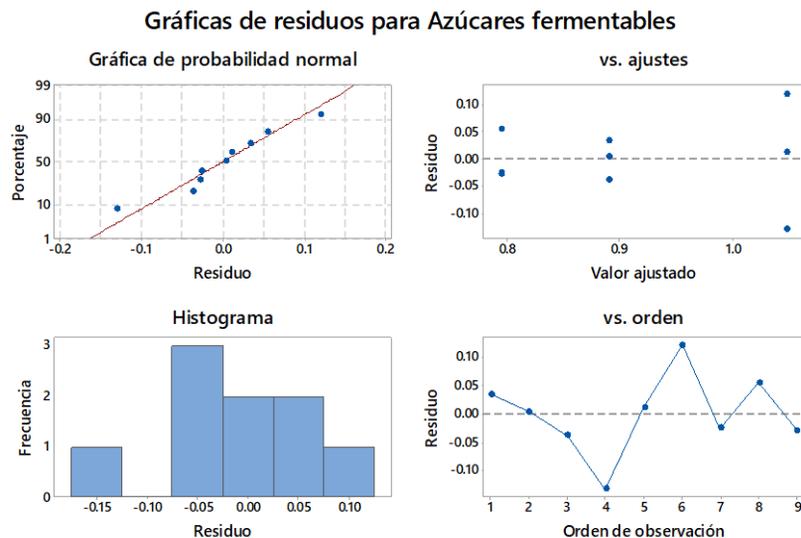


Figura 7.13. Gráfico de residuos para probar supuestos de normalidad, varianza constante e independencia obtenidos con Minitab® Student.

Como se observa en la Figura 7.14 a), existen diferencias significativas entre las medias obtenidas al operar con la carga de 45 %m/v y 60 %m/v. De igual forma, este comportamiento se afirma debido a que el p-value es de 0,023, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula sobre

la igual de las medias. Esta tendencia se le atribuye a que al operar con altas cargas de sólido la cantidad de oxígeno disuelto en el medio es menor, lo que limita la transferencia de masa entre los nutrientes en disolución y la bacteria evitando que se de un buen crecimiento bacteriano y por ende se monitoree menor actividad. Por otro lado, las enzimas también se ven afectadas por adsorción improductiva de las mismas por bajo contenido de actividad de agua en el sustrato, poca accesibilidad del área superficial, interacción enzima-lignina, o inhibición producto de compuestos secundarios (Andersen, 2007; Lengeier *et al.*, 1999). Además, en la gráfica b) se observa la desviación de los datos obtenidos, concluyendo así que a pesar de que no existe diferencia significativa entre las medias con menores cargas de sólido, se obtienen mejores rendimientos de azúcares cuando se opera con 45% de rastrojo en el medio, debido a que existe mayor disponibilidad de sustrato.

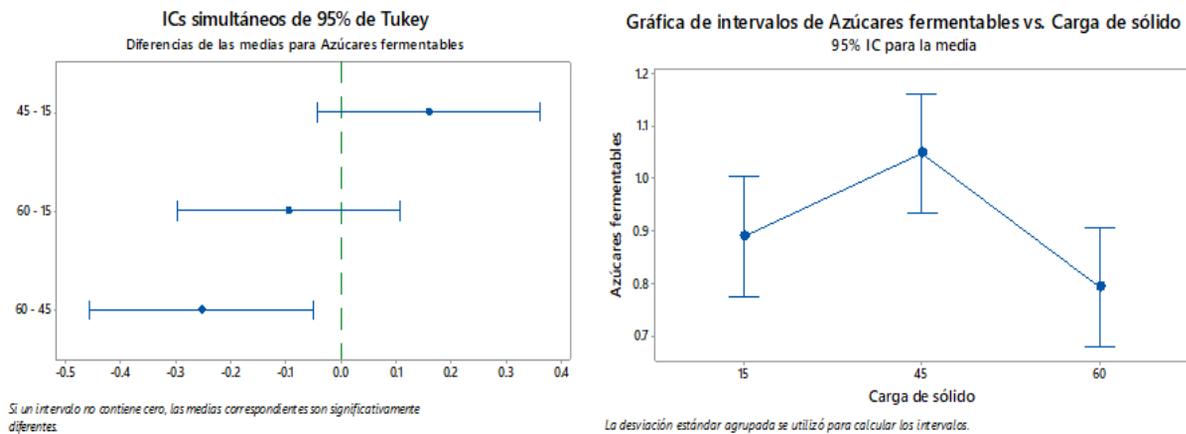


Figura 7.14. a) Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey b) Gráfica de la desviación estándar de intervalos para los azúcares fermentables obtenidos con Minitab® Student.

Es de importancia mencionar, que los azúcares que se cuantificaron en esta sección corresponden a: glucosa, fructosa y sacarosa. La primera de ellas, es producto del mecanismo de hidrólisis de las celulasas con la celulosa como se presenta en la Figura 4.1, sin embargo; la aparición de las otras azúcares según Pereira *et al.* (2016), es resultado de la producción de glucosa isomerasa, compuesto usual de los complejos enzimáticos provenientes de bacterias, la cual es responsable de la isomerización de glucosa en fructosa. Según Nikel *et al* (2015),

Pseudomona putida KT2240 la ruta metabólica pentosa fosfato es la principal responsable de la aparición del compuesto. La presencia de fructosa en el medio según Weijers & Van't Riet (1992) y Kokkinidis *et al.* (2012) aumenta la actividad de β -glucosidasas, lo que es favorable en el proceso porque elimina la celobiosa reduciendo su efecto inhibitor sobre las celulasas. Por otro lado, al no existir presencia del azúcar xilosa, la cual esta ligada al ataque de la hemicelulosa del material, se descarta la presencia de 1,4- β -xilanasas y β -xilidasas las cuales son las encargadas de la remoción de las cadenas laterales de xilano para la producción de xilooligosacáridos (Travaini *et al.*, 2016).

7.6. Delignificación del rastrojo de piña obtenido con microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida* KT2440.

Según Ravi *et al.* (2017), la cepa *Pseudomonas putida* KT2240 se clasifica como una de las especies bacterianas capaces de despolimerizar lignina de alto peso molecular y también de catabolizar una amplia variedad de aromáticos de lignina de bajo peso molecular mediante la vía especializada β -cetoacilato, producto de la formación de lacasas extracelulares que utilizan oxígeno como cofactor para la oxidación de los compuestos orgánicos a través de un ciclo catalítico de transferencias de electrones hacia los átomos de cobre. En la Figura 7.15, se presenta el mecanismo propuesto por Ahmad *et al.* (2010) para la formación de los productos principales de la degradación de lignina. En la ruta A, se da la eliminación del enlace β -aril éter de la lignina permitiendo la formación de cetonas y el producto B, que corresponde a ácidos dicarboxílicos, se presenta como resultado de la oxidación intermediaria del enlace bifenilo (Ahmad *et al.*, 2010; Chávez & Domine, 2010; Sudarsan, Dethlefsen, Blank, Siemann-Herzberg, & Schmid, 2014).

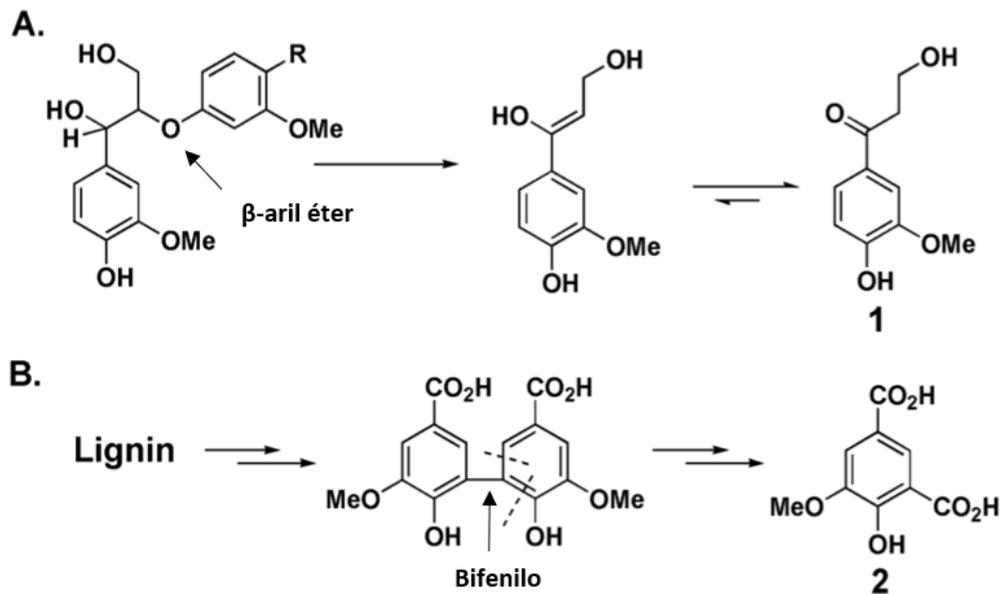


Figura 7.15. Posibles mecanismos para la formación de descomposición de lignina (Ahmad *et al.*, 2010).

A raíz de que la cepa posee dichas cualidades, se caracterizó el material hidrolizado a las diferentes cargas, los resultados se encuentran en el Cuadro 7.6. También, se quiso cuantificar la actividad enzimática de la lacasa en el medio bajo el método modificado de peroxidasa de manganeso descrito por Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2017). Sin embargo, al ser una técnica con dependencia colorimétrica se vio afectada por la pigmentación desprendida por el rastrojo, ya que al ser verde oscuro, causó interferencia para determinar la oxidación del 2,6-dimetoxifenol (Weijers & Van't Riet, 1992).

Cuadro 7.6. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestra	Lignina Insoluble, LIA / (%)			Lignina soluble, LSA / (%)		
	A	B	C	A	B	C
1	8,2716	8,4860	8,6717	2,2322	2,1890	2,1602
2	8,2445	8,1541	8,1142	2,2383	2,4381	2,4058
3	8,8613	8,6542	8,8698	2,1270	2,1325	2,0951

De igual forma, los datos de lignina insoluble obtenidos se procedieron a analizar mediante un ANOVA. En la Figura 7.16, se aprecia que los datos se ajustan a una tendencia normal, mas el coeficiente de determinación es de un 84 % lo que indica que los datos poseen alta variabilidad, como se evidencia en el histograma. Esto se le atribuye a que el comportamiento del microorganismo se ve afectado tanto la composición heterogénea del sustrato como por los subproductos de hidrólisis, ya que durante esta se producen cambios en el pH y desprendimiento de monolignoles que tienden a desfavorecer el crecimiento bacteriano. Por otro lado, en el gráfico de residuo versus orden se observa la independencia de los datos, puesto a que no exhibe patrones. Finalmente, de la prueba Anderson-Darling se determinó que los datos poseen un comportamiento normal ya que el p-value es de 0,349 que al ser superior al 0,05 confirma la hipótesis nula.

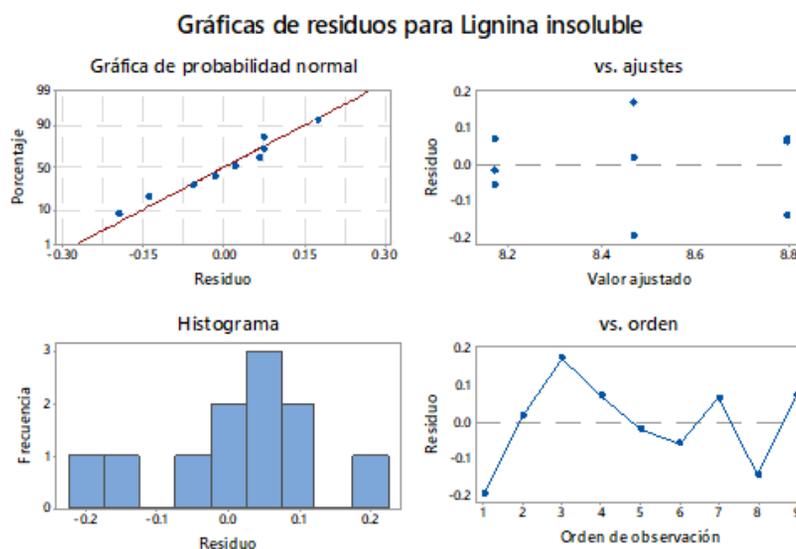


Figura 7.16. Gráfico de residuos para probar supuestos de normalidad, varianza constante e independencia obtenidos con Minitab® Student.

En la Figura 7.17 a), se aprecia que existe diferencia significativa entre las medias al operar con 45 %m/v y 60 %m/v de rastrojo de piña. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula debido a que el p-value es de 0,004. Este comportamiento, como se expresa anteriormente, se da por la baja concentración de oxígeno disuelta en el medio lo que limita el crecimiento bacteriano, y por ende la producción enzimática. También, pudo deberse a que las enzimas

segregadas tuvieren una adsorción limitada producto del bajo contenido de agua disponible. En la gráfica b), se observa que la mayor remoción de lignina se da con la carga de sustrato al 45%, y este comportamiento pudo deberse a que, al existir mayor fuente de carbono en el medio, el crecimiento del microorganismo se dé a una mayor tasa y por ende la segregación de lacasas ocurra a mayor velocidad que al operar con menos sustrato. Además, según los datos recolectados de pH final de los medios de cultivo, que se encuentran en el Cuadro A.39, se tiene que las disoluciones con mayor acidez corresponden a las de carga media, resultado que se atribuye a la presencia de mayor cantidad de ácidos carboxílicos, que como se observa Figura 7.12, es uno de los productos principales (Ahmad *et al.*, 2010; Andersen, 2007).

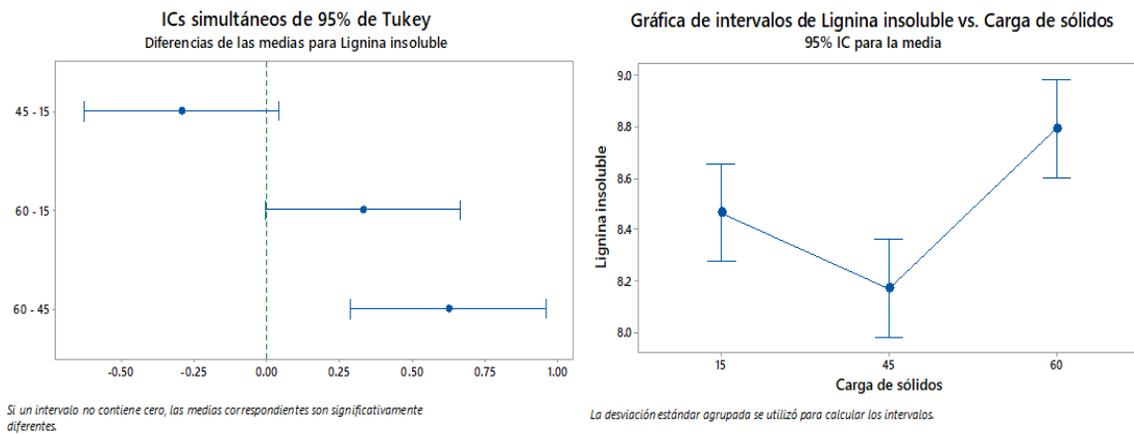


Figura 7.17. a) Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey b) Gráfica de la desviación estándar de intervalos para lignina insoluble obtenidos con Minitab® Student.

De igual forma, se obtuvo el mismo comportamiento al cuantificar la lignina soluble del material como se observa en la Figura 7.18. Resultados que comprueban actividad deslignificante, por ello se recomienda que en futuras investigaciones se cuantifiquen tanto los ácidos orgánicos como oxidorreductasas

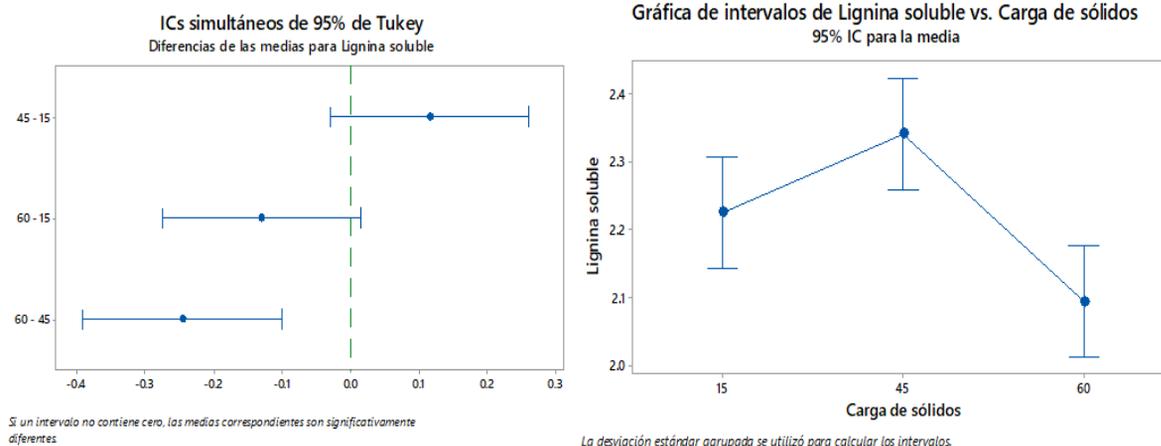


Figura 7.18. a) Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey b) Gráfica de la desviación estándar de intervalos para lignina soluble obtenidos con Minitab® Student.

7.7. Validación de resultados y sinergia del pretratamiento de ozonólisis con el microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida* KT2440

En el pretratamiento de ozonólisis, debido a que la variable de interés en este estudio son los azúcares fermentables en el medio acuoso, se decidió operar a las condiciones que generaron un mayor rendimiento de estos, correspondientes a: 10 % m/v de rastrojo, un flujo de ozono de 4,1 g O₃/h y un tamaño de partícula de 1,00 mm. Con respecto al factor de pH, debido a que se obtuvieron tendencias similares al operar a pH 3 y pH 11, se procedió a cuantificar la producción de azúcares con respecto al tiempo en estas dos condiciones. En la Figura 7.19 y Figura 7.20, se presenta el comportamiento de los datos, en donde se evidencia que a condiciones básicas se da una producción de azúcares mayor, resultado que coincide con la tendencia de la corrida tres del diseño Taguchi. Por otro lado, es de importancia recalcar que, bajo estas condiciones, las concentraciones de azúcares superan la media del diseño en un 48 %.

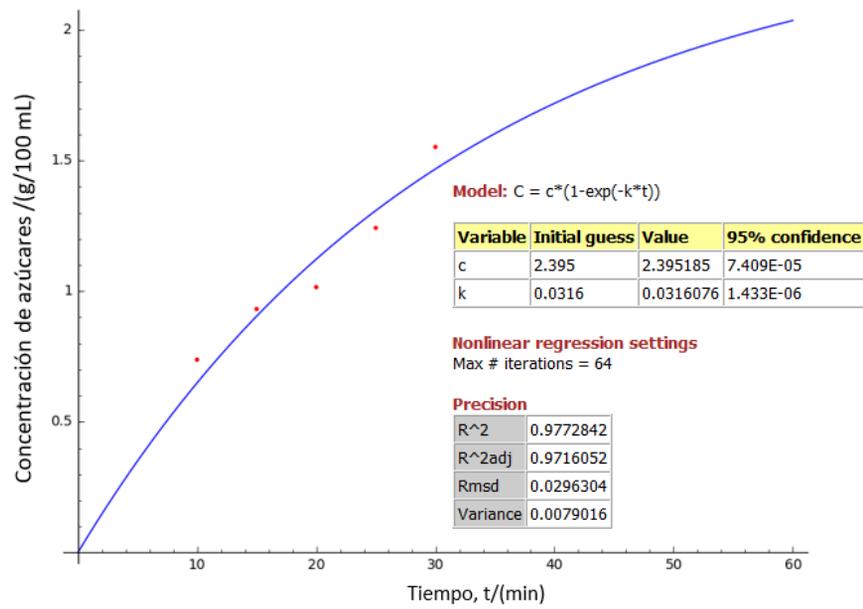


Figura 7.19. Concentración de azúcares fermentables obtenidas a pH 3 respecto al tiempo en el proceso de ozonólisis.

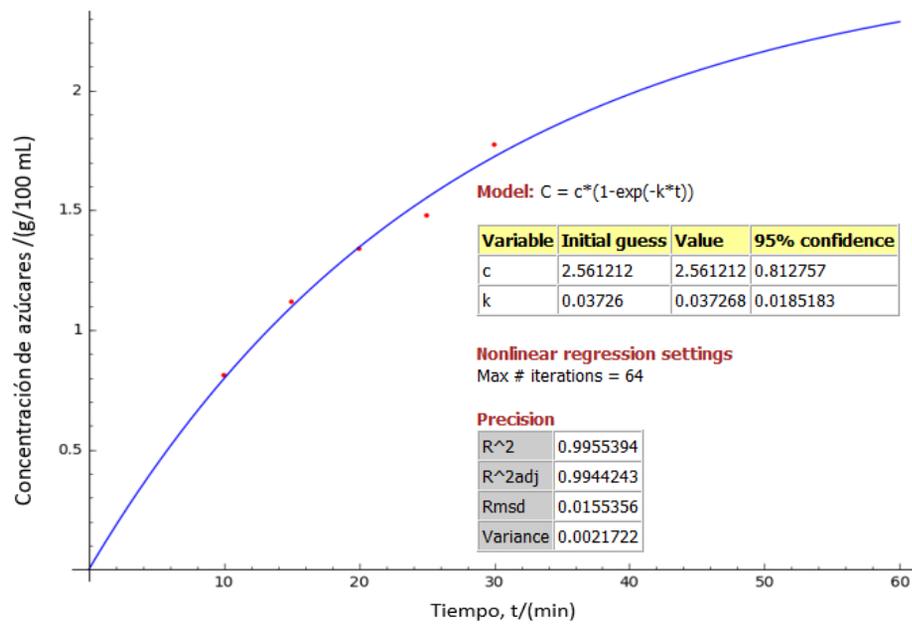


Figura 7.20. Concentración de azúcares fermentables obtenidas a pH 11 respecto al tiempo en el proceso de ozonólisis.

Mediante al ajuste de los datos al modelo presente en la ecuación 7.2, se determinó la constante específica de reacción que describe el proceso de ozonólisis del rastrojo de piña a los diferentes pH para la producción de azúcares fermentables. En donde, se asume un orden de reacción de primer orden, que según Mulakhudair *et al.* (2017), está ligado a que se generan azúcares como producto de la degradación de los enlaces del complejo lignina-holocelulosa del material. Los valores obtenidos del ajuste se encuentran presentes a continuación:

$$C_A = C_\infty \times (1 - e^{-k \times t}) \quad 7.2$$

$$C_{A \text{ pH } 3} = 2.395 \times (1 - e^{-0.0316 \times t}) \quad 7.3$$

$$C_{A \text{ pH } 11} = 2.561 \times (1 - e^{-0.0372 \times t}) \quad 7.4$$

Donde,

C_A : concentración de azúcares, g/ 100 mL

C_∞ : concentración de azúcares máxima según el modelo, g/ 100 mL

k : constante específica de reacción, min^{-1}

De las ecuaciones anteriores, se observa que la constante de reacción es más alta cuando se operó en el medio alcalino, lo cual es de esperar debido a que se obtiene una mayor concentración de azúcares producto de la disponibilidad de radicales en el medio que tienden a reaccionar con los carbohidratos de la biomasa. Con el medio ácido se tiene un constante de magnitud cercana lo que se atribuye a la formación de los radicales como productos secundarios de la reacción del ozono con la lignina, que están difundiendo y atacando la holocelulosa del material de manera espontánea. Finalmente, se tiene que bajo este modelo la concentración máxima de azúcares que se obtendrían al realizar la ozonólisis con el pH básico también es más alta, que se atribuye al mayor ataque de los celulosa y hemicelulosa.

Posteriormente, se llevó a cabo la hidrólisis del rastrojo de piña mediada por el microorganismo celulolítico con una carga de sustrato de 45% m/v a tamaños de partícula de 0,25 mm y 1,0 mm, obteniendo así una concentración de azúcares de 1,18 y 1,16 g/ 100 mL respectivamente. Dichos valores, se encuentran en el intervalo máximo obtenido en el ANOVA a dicha cantidad de sólido, por la tanto se evidencia que el microorganismo tiene el mismo

comportamiento. De igual forma, se cuantificó la concentración de azúcares con respecto al tiempo y, además, se determinó el crecimiento microbiológico en cada punto para el tamaño de partícula de 1,0 mm, esto con el fin de comparar los métodos en cuanto a producción de azúcar y capacidad de remoción de lignina en igualdad de condiciones. El perfil cinético se observa en la Figura 7.21, en este se aprecian las tres fases usuales de hidrólisis. En la primera sección se da la degradación rápida de la celulosa producto de la facilidad de adsorción de las enzimas sobre su estructura amorfa, seguida de una hidrólisis de rapidez intermedia y por último, una fase de hidrólisis incompleta producto del aumento en el grado de cristalinidad e inaccesibilidad de la celulosa (Andersen, 2007; Arantes & Saddler, 2011).

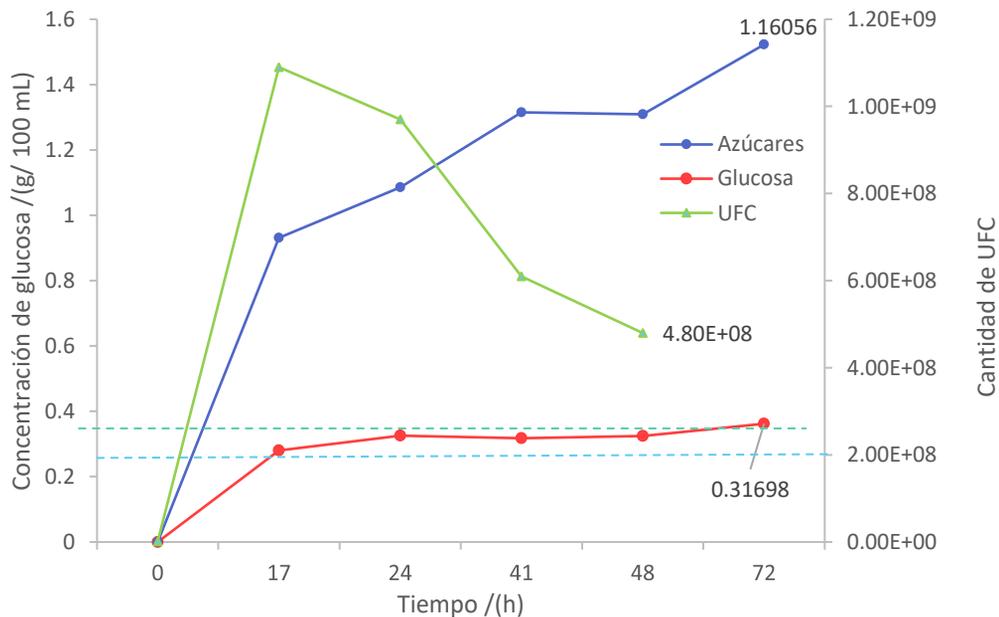


Figura 7.21. Concentración de azúcares fermentables, glucosa y crecimiento bacteriano con respecto al tiempo al utilizar hojas de rastrojo de piña sin pretratar.

Seguidamente, con el fin de determinar si existe sinergia entre los tratamientos en estudio, se procedió a hidrolizar la biomasa ozonada a los diferentes pH e igualmente se determinó el perfil cinético en ambas corridas, los resultados se aprecian en las Figuras 7.22 y 7.23. De ello, se tuvo un comportamiento inusual, ya que como se evidencia en las curvas solo se detectó la presencia de glucosa en el medio, por lo tanto, no se da una liberación de

azúcares totales mayor a la obtenida con tan solo usar el microorganismo, sin embargo, se reportó un incremento en la producción de glucosa en un 50 %. Por otro lado, en estas corridas a las 17 h se cuantificó una mayor cantidad de unidades formadoras de colonias en el medio. Este comportamiento se puede atribuir a la disminución del material lignocelulósico, ya que según Ravi *et al.* (2017) el principal cuello de botella de la capacidad metabólica de la bacteria corresponde a la eliminación de los enlaces fenilmetiléter, que son estructuras típicas de la lignina. Además, este autor reporta que en la velocidad de crecimiento específica de la bacteria tiende a ser el doble en presencia de fuentes de carbono como celulosa y glucosa con respecto a compuestos modelo de lignina, lo que lleva a tasas de conversión más altas.

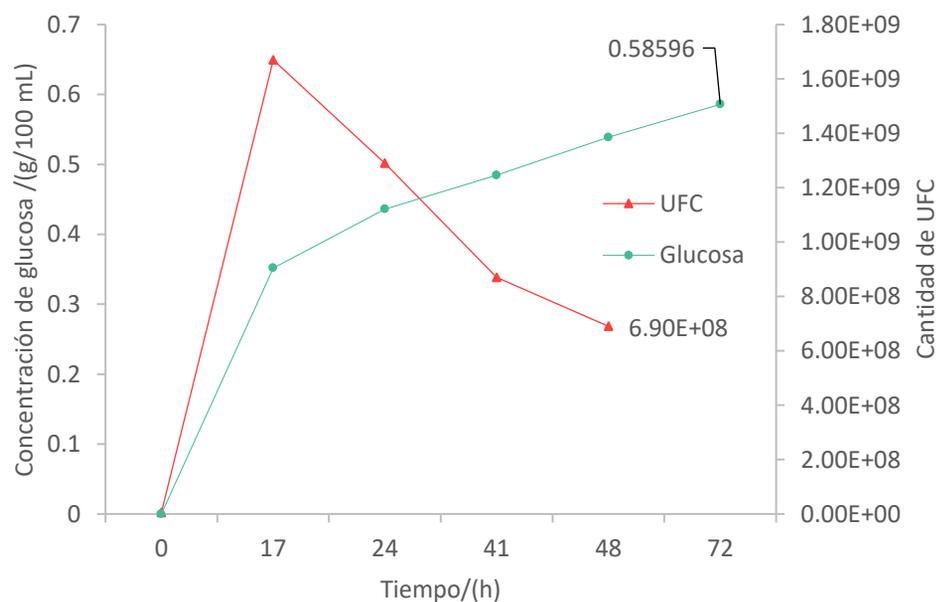


Figura 7.22. Concentración de glucosa y crecimiento bacteriano obtenido al utilizar la biomasa ozonada a pH 3.

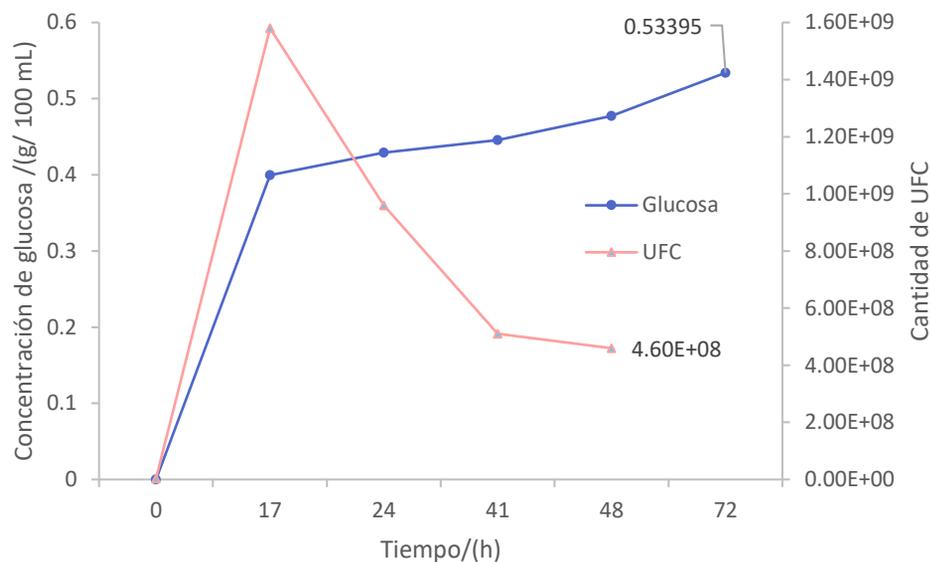


Figura 7.23. Concentración de glucosa y crecimiento bacteriano obtenido al utilizar la biomasa ozonada a pH 11.

La producción de glucosa en estas corridas, se pudo ver favorecida por la remoción de xilosa que se da en pretratamiento de ozonólisis, debido a que dicha azúcar disminuye la actividad de β -glucosidasas haciendo que la hidrólisis sea más lenta y menos eficiente. Además, se da la remoción de oligómeros de lignina soluble los cuales tienden a adsorber las celulasas y generar subproductos que inhiben las enzimas (Pereira *et al.*, 2016; Travaini *et al.*, 2013). También, según Hernández-Salas *et al.* (2009) e Iyer & Ananthanarayan (2008) atribuyen que la presencia de iones producto de la ozonación contribuyen favorablemente a la activación enzimática ya que estos pueden actuar como cofactores que ayudan a mantener las estructuras de las proteínas poliméricas y también estabilizar los sitios activos.

Con el fin de evidenciar los cambios morfológicos de la hoja del rastrojo de piña, se procedió a caracterizar el material mediante microscopía electrónica de barrido sin pretratar y pretratado a diferentes condiciones. En la Figura 7.24 se presentan las imágenes obtenidas, en estas se muestran cambios significativos en pérdida estructural con respecto a la imagen (a) que presenta la biomasa con su integridad física relativamente intacta, ya que se tiene una superficie compacta, ordenada, en gran medida lisa y con pocas grietas. En las imágenes (b) y (c) se aprecian perturbaciones importantes con respecto a pérdida estructural y se observa un gran aumento en la rugosidad del material, sobretodo al realizar la ozonación a pH 3, que se atribuyen a la desintegración de la lignina lo que da como resultado un aumento del área superficial específica por la generación de una estructura multi-porosa, lo que concuerda con los resultados expuestos a lo largo de la investigación (Marangon et al., 2015; Mulakhudair et al., 2017b). Del Anexo 38, en donde se evidencia el material a una magnificación de X90, se puede concluir que la ozonólisis a pH 11 sí desorganiza la estructura lignocelulósica del material, pero no se da de forma tan homogénea como a pH ácido.

Con respecto a la imagen (d), se evidencia un cambio abrupto en cuanto al aspecto visual del material, y según Mulakhudair *et al.* (2017), la superficie porosa que se observa corresponde a la lámina media de la biomasa, la cual se encarga de separar a la pared primaria y secundaria en las plantas, por lo tanto, se evidencia que el microorganismo desintegra la estructura de la biomasa. Este comportamiento, se atribuyó a que al aumentar el área del material previamente, se da lugar a la aparición de un número significativo de sitios reactivos en el material, lo que aumenta la accesibilidad de las enzimas y, por lo tanto, se incrementó la producción de glucosa y la capacidad metabólica de la lignina (Barrera-Martínez *et al.*, 2016; Marangon *et al.*, 2015; Perrone *et al.*, 2017).

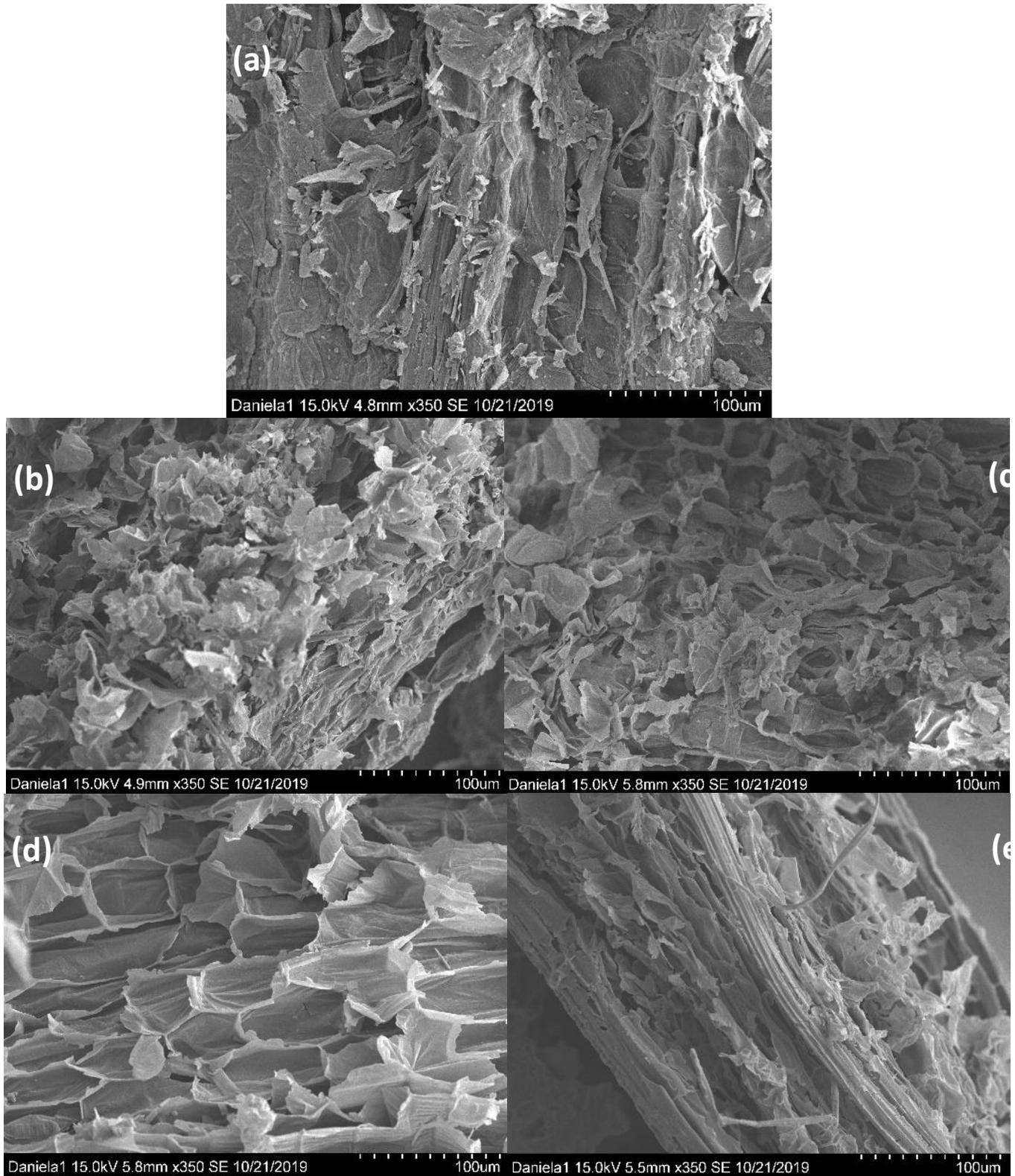


Figura 7.24. Cambios morfológicos de la hoja de rastrojo a 350X. (a) Sin pretratar. (b) Ozonólisis a pH 3. (c) Ozonólisis a pH 11. (d) Ozonólisis a pH 3-P.*putida*. (e) Ozonólisis a pH 11-P.*putida*.

En el Cuadro 7.7, se presenta el resumen de los resultados obtenidos en esta sección, de forma que se aprecia que el proceso en cuanto a producción de azúcar es más efectivo cuando se opera a pH básico con un total entre los dos tratamientos de 23,082 g/L más cuando se trabaja en el medio ácido se tiene una mejor remoción de lignina, alrededor de un 33 %, y una producción de azúcar de 21,376 g/L en total. Por otro lado, al comparar los resultados con la investigación de Mulakhudair *et al.* (2017) en donde se usa el mismo tratamiento y cepa en trigo, se tienen una producción 88 % más de azúcares en el proceso de ozonólisis al utilizar la hoja de rastrojo de piña y un 18 % más de eficiencia en cuanto a la producción de glucosa con el microorganismo *P.putida* al utilizar la biomasa ozonada, ya que se tiene un rendimiento de hidrólisis de un 26 %.

Cuadro 7.7. Resultados obtenidos en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestra	Concentración, Cn /(g/L)	Lignina Insoluble, LIA /(%)	Porcentaje de remoción de lignina/ (%)	pH final de la muestra
O-pH3	15,517 ^T / 6,7725 ^G	8,6104	14,5132	4,47
O-pH11	17,743 ^T / 4,9913 ^G	9,2702	7,9622	4,86
M-0.25	11,795 ^T / 3,6376 ^G	8,7244	14,0462	4,51
M-1	11,605 ^T / 3,6198 ^G	8,6574	13,3814	4,61
OM-pH3	5,8590 ^G	6,7247	33,2346	5,49
OM-pH11	5,3390 ^G	8,5104	15,5058	5,97

T: azúcares fermentables totales, G: glucosa, O: ozonólisis, M: microorganismo y OM: ozonólisis-microorganismo.

Finalmente, en el Cuadro 7.8 se presentan algunos parámetros y resultados del proceso de ozonólisis publicados que han proporcionado los mayores rendimientos en cuanto a deslignificación del material y rendimiento de producción de glucosa en la hidrólisis enzimática. Mas se debe tomar en cuenta que estos resultados se ven afectados por muchos factores, como: la biomasa en estudio, tipo de reactor, el pretratamiento y sus condiciones, las condiciones de hidrólisis y que en el estudio se usen los complejos enzimáticos directamente. A modo de comparación, en esta investigación se deslignifica el material alrededor de un 15% con tan solo 30 min de exposición al ozono y en un 33 % con ayuda del microorganismo. Además, se obtuvo un rendimiento de hidrólisis de un 26 %, el cual se

encuentra cerca del intervalo más bajo reportado, sin embargo, se puede atribuir a que en esta investigación no se inocula directamente los complejos enzimáticos.

Cuadro 7.8. Tabulación de biomásas pretratadas por ozonólisis, parámetros de reacción, deslignificación y rendimiento de la hidrólisis enzimática realizados.

Sustrato	Tamaño de partícula / (mm)	Tiempo de ozonólisis / (h)	Deslignificación / (%)	Rendimiento de hidrólisis / (%)	Referencia
Bagazo de caña de azúcar	3-5	2	66,8	35,2	(Travaini <i>et al.</i> , 2013)
Paja de trigo	<0,25	2	33	62,3	(Bule <i>et al.</i> , 2013)
Paja de trigo	3-5	2,5	45	57	(García-Cubero <i>et al.</i> , 2009)
Madera de cultivo gastada	<5	1	47	21,8	(Ueda <i>et al.</i> , 2015)
Tallo de algodón	2	2,5	42,38	53	(Kaur <i>et al.</i> , 2012)
Césped bermuda	<2	1	31	53	(Lee, Jameel, & Venditti, 2010)
Hojas de rastrojo de piña	0,25-1,0	0,5	14- 33	26	Este trabajo

*El rendimiento de hidrólisis se calcula con base a la glucosa liberada.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que existe sinergia entre el pretratamiento de ozonólisis y la hidrólisis mediada por el microorganismo celulolítico *P.putida* KT2240, ya que se cuantificó un incremento en la producción de glucosa del 50 % al realizar la hidrólisis de la biomasa ozonada. Además, se determinó que al realizar la ozonación a pH ácido se logró una deslignificación de hasta un 15 % más entre procesos. También, mediante la microscopía electrónica de barrido se determinó el cambio morfológico de la hoja de rastrojo de piña que se evidenció como pérdida en el material estructural de la biomasa al realizar la ozonólisis, que posteriormente incrementó por la exposición del material al microorganismo.

Conclusiones

1. Mediante el análisis estadístico Taguchi L_9 se determinó que los factores correspondientes a: pH y flujo de ozono no son significativos para la variable de respuesta de azúcares fermentables al utilizar la hoja de rastrojo de piña. Sin embargo, la carga de sólido fue significativa con una contribución en el proceso de un 93 %, logrando así una cuantificación de azúcares de 1,7 g/ 100 mL en el medio acuoso.
2. Se concluye que el área superficial proporcionada al reducir el material a un tamaño de partícula de 1,0 mm, es el más adecuado para llevar a cabo el proceso de ozonólisis, ya que no se dan pérdidas energéticas al disminuir más el tamaño de la biomasa y se obtienen resultados cercanos a la media en cuanto a producción de azúcar y deslignificación del material.
3. En el proceso de ozonólisis se determinó la presencia de los siguientes azúcares reductores: glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa.
4. Se concluye que, bajo los factores y niveles estudiados en este proyecto, las mejores condiciones para producción de azúcares fermentables con ozonólisis son: una carga de biomasa de 10 %, un flujo de ozono de 4,1 g O_3 /h, pH de 11 y un tamaño de partícula de 1,00 mm.

5. A partir del diseño Taguchi L_9 para las variables de respuesta de lignina insoluble y soluble se determinó que los factores de carga de sólidos, pH y tamaño de partícula son significativos y contribuyen en un 64 %, 26 % y 5 % respectivamente.
6. Mediante el Factorial 2^3 se determinó que los efectos de pH, medio de inoculación, medio de cultivo y la interacción pH-medio de cultivo son significativos para la velocidad de crecimiento específica del microorganismo a un nivel de significancia del 99%.
7. Se concluye que para el estudio efectuado se logra un mayor crecimiento bacteriano al inocular la bacteria en medio líquido, a pH 7 y en el medio de cultivo Luria-Bertani. Bajo estas condiciones se determinó una velocidad de crecimiento específica de $0,3875 \text{ h}^{-1}$.
8. Mediante el análisis de varianza se determinó que al operar a una carga de sólido del 45% m/v se obtiene mayor concentración de azúcares fermentables con un valor de 1,16 g/100 mL. Además, se determina la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa.
9. Se determinó que los datos de concentración de azúcares al operar a pH 3, con una carga de biomasa de 10 %, un flujo de ozono de 4,1 g O_3/h , y un tamaño de partícula de 1,00 mm se ajusta al siguiente modelo $C_A = C_\infty \times (1 - e^{-k \times t})$, donde k posee un valor de $0,0316 \text{ min}^{-1}$ y la concentración máxima de azúcares sería próxima a 2,395 g/100 mL con un R^2 de 0,97.
10. Se determinó que los datos de concentración de azúcares al operar a pH 11, con una carga de biomasa de 10 %, un flujo de ozono de 4,1 g O_3/h , y un tamaño de partícula de 1,00 mm se ajusta al siguiente modelo $C_A = C_\infty \times (1 - e^{-k \times t})$, donde k posee un valor de $0,0372 \text{ min}^{-1}$ y la concentración máxima de azúcares sería próxima a 2,561 g/100 mL con un R^2 de 0,99.
11. Al realizar la hidrólisis de la biomasa ozonada a los diferentes pH con *P.putida* se determinó un incremento en la producción de glucosa en un 50 %, sin embargo, no se tuvo presencia de las otras azúcares fermentables.

12. El análisis por microscopía electrónica de barrido permitió corroborar que el pretratamiento a pH 3 logra desintegrar de forma más homogénea la estructura de la biomasa y que, además, se favorece la actividad del microorganismo por el aumento de los sitios activos que se proporciona.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar la ozonólisis de la hoja de rastrojo de piña con tamaños de partícula entre 1,0 -2,0 mm, con el fin de evaluar si al disminuir el área superficial con esta biomasa la reacción no se ve afectada.
2. Se recomienda variar la concentración de ozono y fijar el flujo de operación, además de realizar el perfil cinético durante más tiempo a pH 3 y 11, con el fin de determinar una tendencia en cuanto a producción de azúcares.
3. Se recomienda realizar un análisis estadístico que permita optimizar el pretratamiento de ozonólisis de forma que se obtengan concentraciones de azúcares aprovechables y buenas tasas de remoción de lignina, por ejemplo, un diseño de superficie.
4. Se recomienda realizar la cuantificación de los ácidos orgánicos y compuestos modelos de lignina mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas, para poder realizar un balance de masas con respecto a consumos de las diferentes secciones de la biomasa.
5. Se recomienda utilizar los complejos enzimáticos correspondientes celulasas, oxidorreductasas y xilanasas para obtener mejores resultados con respecto a producción de azúcares y deslignificación del material.

BIBLIOGRAFÍA

- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Ahmad, M., Taylor, C. R., Pink, D., Burton, K., Eastwood, D., Bending, G. D., & Bugg, T. D. H. (2010). Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Molecular BioSystems*, 6(5), 815–821. <https://doi.org/10.1039/b908966g>
- Alpizar, J., & Villegas, L. (2013). UTILIZACIÓN DE LA BIOMASA RESIDUAL DEL CULTIVO DE LA PIÑA (*Ananas comosus*) PARA LA DESPROTEINIZACIÓN ENZIMÁTICA DE DESECHOS DE LA ACTIVIDAD CAMARONERA EFFECT OF PINEAPPLE (*Ananas comosus*) CULTURE BY-PRODUCTS ON THE ENZYMATIC DEPROTEINIZATION OF SHRIMP. *UNICIENCIA*, 27, 156–170. Recuperado de <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/uniciencia/article/view/4948>
- Amador, J. (2009). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA , TIEMPO DE PRETRATAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR*. Universidad de Costa Rica.
- Amarasekara, A. (2013). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. En *Handbook of Cellulosic Ethanol* (1a ed., pp. 147–217). Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc. Recuperado de <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=1575634>.
- Andersen, N. (2007). Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Experimental and Modeling studies. *Technical University of Denmark (DTU), BioCentrum*, 4(1), 39–45.
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- Arantes, V., & Saddler, J. N. (2011). Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 4(February). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-3>
- Avellaneda, L., Guevara, C., & Torres, E. (2014). Assessment of cellulolytic microorganisms in soils of Nevados park, Colombia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1211–1220. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400011>
- Bajpai, P. (2016). Structure of Lignocellulosic Biomass. En *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production* (pp. 7–12). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6>
- Barrera-Martínez, I., Guzmán, N., Peña, E., Vázquez, T., Cerón-Camacho, R., Folch, J., ... Aburto,

- J. (2016). Ozonolysis of alkaline lignin and sugarcane bagasse: Structural changes and their effect on saccharification. *Biomass and Bioenergy*, *94*, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.010>
- Baushke, S. W., & Hashsham, S. A. (2007). Energetics, Stoichiometry, and Kinetics of Microbial Growth. En L. R. Reddy, C. A.; Beveridge, T. J.; Breznak, J. A.; Marzluf, G. A.; Schmidt, T. M.; Snyder (Ed.), *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition* (3rd Editio, pp. 286–308). American Society for Microbiology (ASM). Recuperado de <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMGMME001/methods-general-molecular/methods-general-molecular>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *36*, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Berk, Z. (2009). Reaction Kinetics CHAPTER. En *Food Process Engineering and Technology* (pp. 127–141). Elsevier Inc. Recuperado de <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFPET0002/food-process-engineering/food-process-engineering>
- Binod, P., & Pandey, A. (2015). Chapter 1 - Introduction. En *Pretreatment of Biomass* (pp. 3–6). India: Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00001-3>
- Bule, M. V., Gao, A. H., Hiscox, B., & Chen, S. (2013). Structural modification of lignin and characterization of pretreated wheat straw by ozonation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(16), 3916–3925. <https://doi.org/10.1021/jf4001988>
- CANAPEP. (2018a). La Cámara es factor clave para el desarrollo y consolidación del sector piñero de Costa Rica. *Piña de Costa Rica*, *2*, 16–17. Recuperado de <https://canapep.com/wp-content/uploads/2018/06/pina-de-cr-29.pdf>
- CANAPEP. (2018b). Piña en Costa Rica:Historia. Recuperado de <https://canapep.com/wp-content/uploads/2018/06/pina-de-cr-29.pdf>
- CANAPEP. (2018c). Producción y Exportaciones de Piña. Recuperado de <https://canapep.com/estadisticas/>
- Chaves, A. V, Waghorn, G. C., & Tavendale, M. H. (2002). A simplified method for lignin measurement in a range of forage species. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, *64*, 129–133.
- Chávez Sifontes, M., & Domine, M. E. (2010). Lignina, Estructura Y Aplicaciones: Métodos De Despolimerización Para La Obtención De Derivados Aromáticos De Interés Industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, *4*(4), 15–46. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4710101>
- Chiang, Y. P., Liang, Y. Y., Chang, C. N., & Chao, A. C. (2006). Differentiating ozone direct and

- indirect reactions on decomposition of humic substances. *Chemosphere*, 65(11), 2395–2400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.080>
- Coca, M., González-Benito, G., & García-Cubero, M. T. (2016). Chemical Oxidation With Ozone as an Efficient Pretreatment of Lignocellulosic Materials. En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 409–429). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00018-9>
- Córdoba, M. (2011). *Determinación del efecto de la concentración de la base NaOH, de la celulosa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña. Lic. Universidad De Costa Rica, Costa Rica*. Universidad de Costa Rica. Recuperado de [http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/605/Tesis Maureen Córdoba.pdf?sequence=1](http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/605/Tesis%20Maureen%20C%C3%B3rdoba.pdf?sequence=1)
- Córdoba, M., & Molina, M. E. (2014). DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA CELULOSA , CELOBIASA Y DE NaOH EN LA HIDRÓLISIS, 24(2), 35–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/ring.v24i2.11767>
- Corredor, D. Y. (2008). *PRETREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS. AN ABSTRACT OF A DISSERTATION*. Recuperado de <http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/handle/2097/693/DeisyCorredor2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dvořák, P., & de Lorenzo, V. (2018). Refactoring the upper sugar metabolism of *Pseudomonas putida* for co-utilization of cellobiose, xylose, and glucose. *Metabolic Engineering*, 48(May), 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.019>
- Feiner, G. (2006). Introduction to the microbiology of meat and meat products. En *Meat products Handbook- Practical Science and Technology* (pp. 574–594). Woodhead Publishing. Recuperado de <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C5TQT2/meat-products-handbook/growth-curve-bacteria>
- Figueirêdo, M. B., Deuss, P. J., Venderbosch, R. H., & Heeres, H. J. (2019). Valorization of Pyrolysis Liquids: Ozonation of the Pyrolytic Lignin Fraction and Model Components. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(5), 4755–4765. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04856>
- Fogler, H. S. (2008). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Pearson Educación. Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?id=zA8xQwAACAAJ&dq=elementos+de+ingenieria+de+las+reacciones+quimicas+fogler+4ta+edicion+pdf&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj9nbSfvpziAhX-RBUIHX2wAnIQ6AEIKzAB>
- García-Cubero, M. T., González, G., Indacochea, I., Coca, M., & Bolado, S. (2009). Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 16(1), 1608–1613. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.012>

- Golan, A. (2011). CELLULASES FROM FUNGI AND BACTERIA AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS. En *Cellulase: types and action, mechanism, and uses*. Nova Science Publishers, Inc. Recuperado de <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/lib/sibdilibro-ebooks/detail.action?docID=3018648>.
- González, L. (2012). *Manual Técnico para el manejo de rastrojo en el cultivo de piña*. Costa Rica.
- Gupta, R., Mehta, G., Deswal, D., Sharma, S., Jain, K. K., & Singh, A. (2013). Cellulases and their biotechnological applications. En *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* (pp. 89–106). India: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0876-1>
- Gutiérrez, I., Moreno, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hernández-Salas, J. M., Villa-Ramírez, M. S., Veloz-Rendón, J. S., Rivera-Hernández, K. N., González-César, R. A., Plascencia-Espinosa, M. A., & Trejo-Estrada, S. R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, 100(3), 1238–1245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>
- Hernández, R., & Prado, L. A. (2018). Impact and biorefinery opportunities for agricultural waste of the cultivation of pineapple (*Ananas comosus*) in Costa Rica. *UNED Research Journal*, Vol. 10(2)(January), 455–468. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22458/urj.v10i2.2059>
- Hu, W.-S. (2018). Kinetics of Cell Growth Processes. En *Engineering Principles in Biotechnology*. (pp. 145–181). John Wiley & Sons. Recuperado de <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEPB00001/engineering-principles/engineering-principles>
- IEA. (2019). Monthly Oil Data Services and other official data source. Recuperado de <https://www.eni.com/assets/documents/documents-en/WORLD-OIL-REVIEW-2019-Volume-1.pdf>
- Irías A, G. L. (2014). Composición química de la biomasa residual de la planta de piña variedad md2 proveniente de guacimo, limón. *Ciencia y Tecnología*, 30(2)(2), 27–34. Recuperado de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/cienciaytecnologia/article/view/20347>
- Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019–1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>
- Janaki, P., & Chinnusamy, C. (2016). Field Dissiation Kinetics of Paraquat in Acid Soil as Function of Concentration and its Residues in Tea Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 28(6), 1639–1642. <https://doi.org/https://doi.org/10.14233/ajchem.2016.19690>

- Kabdasli, I., & Arslan-Alaton, I. (2010). Introduction to redox reactions. En *Chemical Oxidation Applications for Industrial Wastewaters* (Vol. 0). IWA Publishing.
- Kar, A. (2008). Pharmaceutical microbiology. En *Pharmaceutical microbiology* (pp. 146–166). Recuperado de <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/lib/sibdilibro-ebooks/reader.action?docID=442139&query=Textbook+of+Microbiology#>
- Kaur, U., Oberoi, H. S., Bhargav, V. K., Sharma-Shivappa, R., & Dhaliwal, S. S. (2012). Ethanol production from alkali- and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.007>
- Kokkinidis, M., Glykos, N. M., & Fadouloglou, V. E. (2012). Protein flexibility and enzymatic catalysis. En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 87, pp. 181–218). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398312-1.00007-X>
- Kole, C. (2011). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20447-0>
- Kuhad, R., & Singh, A. (2013). *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. New Delhi, India: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0876-1>
- Lee, J. M., Jameel, H., & Venditti, R. A. (2010). Effect of ozone and autohydrolysis pretreatments on enzymatic digestibility of coastal bermuda grass. *BioResources*, 5(2), 1084–1101. <https://doi.org/10.15376/biores.5.2.1084-1101>
- Lengeier, J. W., Drews, G., & Schlegel, H. G. (1999). Growth and Nutrition. En *Biology of prokaryotes* (pp. 421–422). Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag, Rüdigerstrasse.
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M. N. M., Rooney, D. W., & Walker, G. M. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.061>
- López, M., Wing, R., & Rojas, A. (2014). Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas Comosus*) para la alimentación animal. *Agron. Mesoam*, 25(2), 383–392. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15453>
- Maglianesi, M. A. (2013). Desarrollo de las piñeras en Costa Rica y sus impactos sobre ecosistemas naturales y agro-urbanos. *Biocenosis*, 27(1–2), 62–70. Recuperado de <http://investiga.uned.ac.cr/revistas/index.php/biocenosis/article/viewFile/611/507>
- Marangon, C., Travaini, R., Colodette, J., Morales, M., & Bolado, S. (2015). Ozonolysis. En *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies* (pp. 105–135). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00007-4>
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T., & de Lorenzo, V. (2014). *Pseudomonas 2.0: Genetic upgrading of P. putida KT2440 as an enhanced host for heterologous gene*

- expression. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 0–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0159-3>
- Matte, A., Kozlov, G., Trempe, J.-F., Currie, M. A., Burk, D., Jia, Z., ... Cygler, M. (2009). Preparation and Characterization of Bacterial Protein Complexes for Structural Analysis, 76(09), 1–42. [https://doi.org/10.1016/S1876-1623\(08\)76001-2](https://doi.org/10.1016/S1876-1623(08)76001-2)
- Mazzoli, R. (2012). Development of Microorganisms for Cellulose-Biofuel Consolidated Bioprocessings: Metabolic Engineers' Tricks. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4). <https://doi.org/10.5936/csbj.201210007>
- Montoya-Pérez, L., & Durán-Herrera, J. E. (2017). Producción de Hidrógeno a partir de la fermentación de residuos agroindustriales de la piña. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(3), 106. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i3.3277>
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Editorial Universidad de Antioquia. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=5RjS6B0X5RgC&pg=PA67&dq=clasificacion+de+las+bacterias+segun+ph&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwibw5Tbt73dAhXlpYsKHTU3CM0Q6AEINjAD#v=onepage&q=clasificacion de las bacterias segun ph&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=5RjS6B0X5RgC&pg=PA67&dq=clasificacion+de+las+bacterias+segun+ph&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwibw5Tbt73dAhXlpYsKHTU3CM0Q6AEINjAD#v=onepage&q=clasificacion+de+las+bacterias+segun+ph&f=false)
- Montoya, M. (2012). *Cuantificación del Mercado Secundario de Piña de la Variedad MD-2 en Costa Rica –Estudio de Caso en Pital de San Carlos–*. Universidad EARTH.
- Mulakhudair, A. R., Hanotu, J., & Zimmerman, W. (2017). Exploiting ozonolysis-microbe synergy for biomass processing: Application in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 105, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.018>
- Mussatto, S., & Teixeira, J. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *applied Microbiology an Microbial Biotechnology*, 2, 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica. Microbiología básica para el área de salud y afines*. (Segunda Ed). Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA45&dq=condiciones+para+el+crecimiento+bacteriano&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjVq_GkpbndAhUrWN8KHWd7AvgQ6AEIVDAI#v=onepage&q=condiciones para el crecimiento bacteriano&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA45&dq=condiciones+para+el+crecimiento+bacteriano&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjVq_GkpbndAhUrWN8KHWd7AvgQ6AEIVDAI#v=onepage&q=condiciones+para+el+crecimiento+bacteriano&f=false)
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., & Lorenzo, V. De. (2015). *Pseudomonas putida* KT2440 Strain Metabolizes Glucose through a Cycle Formed by Enzymes of the Entner-

- Doudoroff , Embden-Meyerhof-Parnas , and Pentose Phosphate Pathways * □. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 290(43), 25920–25932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>
- Obeng, E. M., Brossette, T., Ongkudon, C. M., Budiman, C., Maas, R., & Jose, J. (2018). The workability of Escherichia coli BL21 (DE3) and Pseudomonas putida KT2440 expression platforms with autodisplayed cellulases: a comparison. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4829–4841. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8987-4>
- Olkkonen, C., Tylli, H., Forsskåhl, I., Fuhrmann, A., Hausalo, T., Tamminen, T., ... Janson, J. (2000). Degradation of model compounds for cellulose and ligno-cellulosic pulp during ozonation in aqueous solution. *Holzforschung*, 54(4), 397–406. <https://doi.org/10.1515/HF.2000.067>
- Pereira, J., Travaini, R., Paganini Marques, N., Bolado, S., & Bocchini Martins, D. A. (2016). Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from Myceliophthora thermophila JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. *Bioresource Technology*, 204(December), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.064>
- Perrone, O. M., Rossi, J. S., Moretti, M. M. de S., Nunes, C. da C. C., Bordignon, S. E., Gomes, E., ... Boscolo, M. (2017). Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment: Effects on the fiber and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 224, 733–737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.043>
- PROCOMER, P. de C. E. (2012). Estadísticas: exportaciones. Recuperado el 10 de junio de 2018, de <http://sistemas.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx>
- Quesada, K., Alvarado, P., Sibaja, R., & Vega, J. (2005). UTILIZACIÓN DE LAS FIBRAS DEL RASTROJO DE PIÑA (Ananas comusus variedad champaka) COMO MATERIAL DE REFUERZO EN RESINAS DE POLIÉSTER Karol. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 6(2), 157–179.
- Ragnar, M., Eriksson, T., & Reitberger, T. (1999). Radical formation in ozone reactions with lignin and carbohydrate model compounds. *Holzforschung*, 53(3), 292–298. <https://doi.org/10.1515/HF.1999.049>
- Rajendran, K., & Taherzadeh, M. (2014). Pretreatment of lignocellulosic Materials. En B. Virendra & K. Akihiko (Eds.), *Conversion of Hemicellulose Hydrolyzates to Ethanol* (First Edit, pp. 43–75). John Wiley & Sons.
- Raspolli, A., & Antonetti, C. (2012). 5 Biomass pretreatment: separation of cellulose , hemicellulose, and lignin – existing technologies and perspectives. En *Biorefinery: from biomass to chemicals and fuels* (pp. 101–122). De Gruyter, Inc. <https://doi.org/10.1515/gps-2012-0094>
- Ravi, K., García-Hidalgo, J., Gorwa-Grauslund, M. F., & Lidén, G. (2017). Conversion of lignin model compounds by Pseudomonas putida KT2440 and isolates from compost. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5059–5070. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8211-y>
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Madrigal-León, K., Masís-Mora, M., Pérez-Villanueva, M., & Chinpamplillo, J. S. (2017). Removal of carbamates and detoxification potential in a biomixture: Fungal bioaugmentation versus traditional use. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135(October 2016), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.011>
- Roldán, G., & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical*. Editorial Universidad de Antioquia. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=FA5Jr7pXF1UC&pg=PA377&dq=metodo+del+numero+mas+probable&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi89LWcilfeAhWuuVkkKHTKOCfkQ6AEIQDAE#v=onepage&q=metodo del numero mas probable&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=FA5Jr7pXF1UC&pg=PA377&dq=metodo+del+numero+mas+probable&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi89LWcilfeAhWuuVkkKHTKOCfkQ6AEIQDAE#v=onepage&q=metodo+del+numero+mas+probable&f=false)
- Ruiz, F. J., & Martínez, Á. T. (2009). Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 164–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x>
- Sánchez-Clemente, R., Igeño, M. I., Población, A. G., Guijo, M. I., Merchán, F., & Blasco, R. (2018). Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. *Proceedings*, 2(20), 1297. <https://doi.org/10.3390/proceedings2201297>
- Segura, F., Echeverri, R., Patiño, A., & Mejía, A. (2007). Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 14(1), 72–81.
- Shafiee, S., & Topal, E. (2009). When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*, 37(1), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2008.08.016>
- Singleton, P., & Sainsbury, D. (2006). *Pseudomonas. Dictionary of microbiology & molecular biology* (Tercera Ed). Hoboken, NJ: Wiley: John Wiley & Sons Ltd. Recuperado de <http://ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/login?qurl=https%3A%2F%2Fsearch.credoreference.com%2Fcontent%2Fentry%2Fwileymicrob%2Fpseudomonas%2F0%3FinstitutionId%3D7919>
- Sluiter, A, Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). *Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory*.
- Sluiter, Amie, Sluiter, J., Wolfrum, E. J., Sluiter, A., Sluiter, J., & Wolfrum, E. J. (2013). Methods for Biomass Compositional Analysis. En *Catalysis for the Conversion of Biomass and Its Derivatives* (pp. 222–224). Germany: Max Planck Institute for the History of Science.
- Souza-Correia, J. A., Ridenti, M. A., Oliveira, C., Araújo, S. R., & Amorim, J. (2013).

- Decomposition of lignin from sugar cane bagasse during ozonation process monitored by optical and mass spectrometries. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(11), 3110–3119. <https://doi.org/10.1021/jp3121879>
- Sudarsan, S., Dethlefsen, S., Blank, L. M., Siemann-Herzberg, M., & Schmid, A. (2014). The Functional Structure of Central Carbon Metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5292–5303. <https://doi.org/10.1128/AEM.01643-14>
- Tabil, L., Adapa, P., & Kashaninejad, M. (2016). *Biomass Feedstock Pre-Processing – Part 1: Pre-Treatment. Biofuel's Engineering Process Technology*. <https://doi.org/10.5772/711>
- Tap, C., & Rice, R. G. (2012). Generation and control of Ozone Processing. En *Ozone in Food Processing* (Vol. 1, pp. 33–36).
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena Edición). Madrid, España: EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, S.A. Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA159&dq=condiciones+para+el+crecimiento+bacteriano&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiwnqSGmrndAhUwVt8KHVusARAQ6AEIQjAF#v=onepage&q&f=true>
- Travaini, R., Judit, M., Ana, L., & Bolado, S. (2016). Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource Technology*, 199, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.143>
- Travaini, R., Otero, M. D. M., Coca, M., Da-Silva, R., & Bolado, S. (2013). Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresource Technology*, 133, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.133>
- Ueda, C., Takashima, Y., Ishiguri, F., Iizuka, K., Yoshizawa, N., & Yokota, S. (2015). Ozone oxidation pretreatment for enzymatic saccharification of spent culture media after *Lentinula edodes* cultivation. *Journal of Wood Science*, 61(1), 65–69. <https://doi.org/10.1007/s10086-014-1441-z>
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2006). *Fisiología y metabolismo bacteriano. Temas de bacteriología y virología médica*. Facultad de Medicina de la Universidad de la República, Montevideo.
- Vargas-vargas, M. A., Hernández-chaverri, R. A., & Jiménez-silva, A. (2019). Caracterización de la biomasa de piña (*Ananas comosus*) y su valoración en la propagación micelial del hongo shiitake (*Lentinula edodes*). *Yulök Revista de Innovación Académica*, 3(1), 13–27.
- Vasco, J., Ge, X., & Li, Y. (2016). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 561–585). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00024-4>

- Velásquez, A. V., Martins, C. M. M. R., Pacheco, P., & Fukushima, R. S. (2019). Comparative study of some analytical methods to quantify lignin concentration in tropical grasses. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(11), 1686–1694. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0450>
- Vidal, P. F., & Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin - Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(88\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0144-4565(88)90012-1)
- Weijers, S. R., & Van't Riet, K. (1992). Enzyme stability in downstream processing part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. *Biotechnology Advances*, 10(2), 237–249. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(92\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(92)90004-5)
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>
- Wilson, D. B. (2016). Microbial Diversity and Cellulase Production. En Elsevier (Ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications* (pp. 43–48). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00005-8>
- Xu, F., & Wang, D. (2014). *Analysis of Lignocellulosic Biomass Using Infrared Methodology. Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00002-5>
- Zainuddin, M. F., Shamsudin, R., Mokhtar, M. N., & Ismail, D. (2014). Physicochemical Properties of Pineapple Plant Waste Fibers from the Leaves and Stems of Different Varieties. *BioResources*, 9(3), 5311–5324. <https://doi.org/10.15376/biores.9.3.5311-5324>
- Zhou, X., Broadbelt, L. J., & Vinu, R. (2016). *Mechanistic Understanding of Thermochemical Conversion of Polymers and Lignocellulosic Biomass. Advances in Chemical Engineering* (1a ed., Vol. 49). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2016.09.002>

APÉNDICES

A. DATOS EXPERIMENTALES

Cuadro A.1. Datos de masas utilizadas para la preparación de patrones de azúcares fermentables.

Patrón	Masas, M /(mg)
Glucosa	50,03
Fructosa	49,97
Xilosa	50,03
Sacarosa	102,4

Cuadro A.2. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Glucosa en la columna de intercambio iónico.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)
0,50	12043101
0,75	18538109
1,00	24503542
2,00	48543915
3,00	72974672

Cuadro A.3. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Fructosa en la columna de intercambio iónico.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)
0,50	11387949
0,75	17928624
1,00	23614516
2,00	47022681
3,00	71000972

Cuadro A.4. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Xilosa en la columna de intercambio iónico.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)
0,50	10913551
0,75	17656370
1,00	23170011
2,00	45739906

Cuadro A.5. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Sacarosa en la columna de intercambio iónico.

Volumen de patrón, V_p (μL)	Área, a (V min)
0,50	11430009
0,75	17645922
1,00	23744136
2,00	47202055
3,00	70881389

Cuadro A.6. Datos de área reportada para las corridas experimentales del diseño estadístico Taguchi L_9 .

Muestra	Azúcar	Área, a (V min)	
		A	B
1	Glucosa	3504910	3662341
	Fructosa	5509583	5963676
	Sacarosa	910620	704220
	Xilosa	78141	87225
2	Glucosa	18275596	20163323
	Fructosa	26259109	28612536
	Sacarosa	2426977	1809893
	Xilosa	371147	604848
3	Glucosa	37842998	42523600
	Fructosa	59381762	54362121
	Sacarosa	130113	195110
	Xilosa	1027088	1952259
4	Glucosa	2830983	3332055
	Fructosa	4334416	4896374
	Sacarosa	684265	364705
	Xilosa	37494	50096
5	Glucosa	14438788	14421321
	Fructosa	21319720	20186955
	Sacarosa	1596050	1507877
	Xilosa	163049	203450

Cuadro A.6. (continuación) Datos de área reportada para las corridas experimentales del diseño estadístico Taguchi L_9 .

Muestra	Azúcar	Área, $a/(V \text{ min})$	
		A	B
6	Glucosa	24925226	31049943
	Fructosa	35390368	44565201
	Sacarosa	1245679	1661590
	Xilosa	579942	649490
7	Glucosa	3379057	4342350
	Fructosa	5364009	6152819
	Sacarosa	668244	155249
	Xilosa	35464	38887
8	Glucosa	14833887	19671686
	Fructosa	29957476	28365999
	Sacarosa	1728272	1210126
	Xilosa	260986	304884
9	Glucosa	38292233	42236012
	Fructosa	57108298	52743411
	Sacarosa	3643936	2026063
	Xilosa	928745	1270735

Cuadro A.7. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Réplica	Masa crisol, $M_c /(\text{g})$	Masa crisol + biomasa, $M_{cb} /(\text{g})$	Masa crisol + biomasa seca, $M_{cbs} /(\text{g})$
Hojas de rastrojo	1	21,0937	25,2131	24,8169
	2	20,7892	24,9630	24,5695

Cuadro A.8. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las muestras del diseño experimental Taguchi L_9 .

Muestra	Réplica	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol + biomasa, M_{cb} /(g)	Masa crisol + biomasa seca, M_{cbs} /(g)
1	A	12,0171	15,1982	14,9415
	B	10,9805	14,1514	13,8683
2	A	10,0827	17,5096	16,8943
	B	9,6938	18,5372	17,9069
3	A	12,0340	19,3611	18,8080
	B	11,5188	16,3192	15,9464
4	A	12,2304	16,9766	16,5910
	B	10,2112	15,4923	14,9966
5	A	11,2262	16,5706	16,0959
	B	10,9963	16,9794	16,4491
6	A	10,5240	17,6323	17,0715
	B	12,1832	17,8617	17,3638
7	A	10,7424	15,9166	15,4763
	B	10,0407	14,7461	14,3186
8	A	11,7129	16,9587	16,4674
	B	11,4432	16,3044	15,8549
9	A	10,1009	14,3042	13,9060
	B	9,8225	13,2596	12,9474

Cuadro A.9. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Réplica	Masa de papel filtro, M_p /(g)	Masa de papel filtro + muestra, M_{pm} /(g)	Masa balón, M_B /(g)	Masa balón + extractos, M_{Be} /(g)
Hojas de rastrojo	1	0,6110	3,3769	168,3889	168,8560
	2	0,6114	3,2778	167,8415	168,2996

Cuadro A.10. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en las muestras del diseño experimental Taguchi L₉.

Muestra	Réplica	Masa de papel filtro, M_p /(g)	Masa de papel filtro + muestra, M_{pm} /(g)	Masa balón, M_B /(g)	Masa balón + extractos, M_{Be} /(g)
1	A	0,6053	3,2276	167,8771	168,2359
	B	0,6044	3,1782	174,8128	175,1667
2	A	0,6007	3,5482	162,4207	162,7875
	B	0,6085	3,6397	168,3962	168,7876
3	A	0,5993	3,4148	166,5685	166,8954
	B	0,6094	3,3616	166,5535	166,8662
4	A	0,5995	2,9938	125,5217	125,8631
	B	0,5993	3,9984	112,2220	112,6921
5	A	0,5992	3,2787	162,4633	162,7473
	B	0,5871	3,4002	174,8158	175,1044
6	A	0,5966	3,3719	174,7938	175,2254
	B	0,5744	3,4303	159,3680	159,8104
7	A	0,6115	3,2728	162,4040	162,6976
	B	0,6054	3,2356	167,8393	168,1275
8	A	0,6062	3,2557	174,8241	175,2008
	B	0,6042	3,2699	166,5687	166,9416
9	A	0,5965	3,2208	162,4169	162,7921
	B	0,6114	3,2778	167,8415	168,2956

Cuadro A.11. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Réplica	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol +muestra seca, M_{cms} /(g)	Masa crisol + cenizas, M_{cc} /(g)
Hojas de rastrojo	1	14,0492	14,0789	14,0499
	2	14,0487	14,0795	14,0496

Cuadro A.12. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras del diseño experimental Taguchi L₉.

Muestras	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol +muestra seca, M_{cms} /(g)	Masa crisol + cenizas, M_{cc} /(g)
1A	17,7072	17,7286	17,7081
1B	20,4791	20,5001	20,4801
2A	17,554	17,5782	17,5570
2B	16,929	16,9511	16,9301
3A	17,7199	17,7471	17,7201
3B	12,6888	12,7178	12,6909
4A	12,6081	12,6312	12,6088
4B	11,8175	11,8406	11,8181
5A	12,8882	12,9198	12,8990
5B	17,0163	17,0376	17,0169
6A	31,0760	31,1061	31,0820
6B	19,5542	19,5791	19,5551
7A	12,4442	12,4651	12,4434
7B	21,0443	21,0663	21,0445
8A	12,2248	12,2496	12,2259
8B	14,5841	14,6096	14,5861
9A	12,1945	12,2189	12,1951
9B	14,1041	14,1294	14,1047

Cuadro A.13. Datos de masas para la determinación de la curva de calibración con el patrón de Lignina Kraft.

Muestra	Réplica	Masa lignina insoluble, M_{LIA} /(g)	Masa lignina insoluble, M_{LSA} /(g)
Lignina Kraft	1	281,2360	18,7640
	2	282,0139	17,9861

Cuadro A.14. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina soluble en hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Réplica	Absorbancia, A /(adim)	Volumen de alícuota, V_a /(mL)	Volumen de dilución, V_d /(mL)
Hojas de rastrojo	1	0,865	4	5
	2	0,823	4	5

Cuadro A.15. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina soluble en las muestras del diseño experimental Taguchi L_9 .

Muestras	Absorbancia, A /(adim)	Volumen de alícuota, V_a /(mL)	Volumen de dilución, V_d /(mL)
1A	0,967	4	6
1B	0,712	4	9
2A	0,898	4	7
2B	0,954	4	6,5
3A	0,895	4	6
3B	0,9367	4	5,5
4A	0,851	4	6,5
4B	0,926	4	5,5
5A	0,921	4	6
5B	0,897	4	6,5
6A	0,953	4	5,5
6B	0,993	4	5
7A	0,855	4	5,5
7B	0,960	4	5
8A	0,817	4	5,5
8B	0,947	4	4
9A	0,917	4	5
9B	0,956	4	5

Cuadro A.16. Datos de absorbancia para la determinación de la curva del crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2³.

Tiempo, t /(h)	Absorbancia, A /(adim)							
	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A
0,0	0,1255	0,1275	0,1506	0,1454	0,1231	0,1225	0,1525	0,1423
0,5	0,1151	0,1352	0,1631	0,1614	0,1305	0,1316	0,157	0,1463
1,0	0,0882	0,0953	0,1441	0,1443	0,0904	0,0915	0,1158	0,1129
1,5	0,091	0,0901	0,1338	0,1384	0,0935	0,0881	0,1217	0,1208
2,0	0,093	0,0926	0,1512	0,1564	0,094	0,089	0,1296	0,1321
2,5	0,0996	0,1018	0,1955	0,2213	0,0947	0,0901	0,1454	0,1528
3,0	0,1076	0,1056	0,2603	0,2984	0,0983	0,0917	0,177	0,1814
3,5	0,127	0,116	0,3377	0,3959	0,1106	0,0963	0,2197	0,2345
4,0	0,1371	0,1274	0,4335	0,3955	0,111	0,1000	0,294	0,2992
4,5	0,1229	0,1212	0,428	0,4088	0,1179	0,1042	0,3405	0,3538
5,0	0,1335	0,1162	0,4289	0,4572	0,1379	0,1466	0,4035	0,4448
5,5	0,1413	0,1309	0,4869	0,4979	0,1611	0,1586	0,4748	0,5079
6,0	0,1702	0,1591	0,5238	0,5378	0,1799	0,1932	0,5572	0,5724
6,5	0,2056	0,1998	0,5634	0,5657	0,1849	0,2384	0,5885	0,6193
7,0	0,3522	0,365	0,5894	0,5911	0,2195	0,3072	0,5956	0,6268
7,5	0,4202	0,4816	0,6055	0,5975	0,2858	0,3702	0,607	0,6282
8,0	0,449	0,4492	0,6187	0,6126	0,3444	0,4832	0,6217	0,6343
8,5	0,4491	0,4477	0,632	0,6345	0,426	0,5545	0,6391	0,6459
9,0	0,5028	0,4698	0,6538	0,6438	0,5355	0,6329	0,6565	0,6642
9,5	0,541	0,4949	0,6615	0,661	0,6116	0,6934	0,6761	0,6775
10,0	0,5714	0,5398	0,6737	0,6688	0,6785	0,6872	0,6985	0,6927
10,5	0,5827	0,5655	0,6811	0,6842	0,6387	0,6557	0,7255	0,7107
11,0	0,5947	0,5844	0,7032	0,6998	0,634	0,6682	0,7552	0,734
11,5	0,6182	0,5975	0,7036	0,6986	0,6602	0,6865	0,7868	0,7637
12,0	0,6295	0,6081	0,7032	0,7035	0,6787	0,708	0,8228	0,798
12,5	0,6302	0,6143	0,7111	0,7061	0,696	0,7274	0,8574	0,8359
13,0	0,652	0,622	0,7223	0,7158	0,7134	0,7425	0,8927	0,8728
13,5	0,6531	0,6282	0,7245	0,7178	0,7356	0,753	0,9228	0,9072
14,0	0,6611	0,6421	0,723	0,715	0,7548	0,7606	0,9508	0,9422

Cuadro A.17. Datos de absorbancia para la determinación de la curva del crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2³.

Tiempo, t /(h)	Absorbancia, A /(adim)							
	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B
0,0	0,1120	0,1333	0,1540	0,1698	0,114	0,1255	0,1469	0,1323
0,5	0,1179	0,1453	0,169	0,1755	0,1262	0,1291	0,1543	0,1153
1,0	0,0909	0,0906	0,1535	0,1582	0,0955	0,0872	0,1208	0,115
1,5	0,0946	0,0899	0,1301	0,1868	0,0878	0,0881	0,1319	0,1249
2,0	0,104	0,09	0,1396	0,2652	0,0889	0,0889	0,1518	0,1401
2,5	0,1114	0,0926	0,1566	0,3273	0,0899	0,0901	0,1787	0,1701
3,0	0,1233	0,0983	0,2042	0,4009	0,0934	0,092	0,217	0,1978
3,5	0,1368	0,1074	0,2415	0,3927	0,096	0,1014	0,2797	0,2493
4,0	0,1221	0,1142	0,3355	0,4095	0,1217	0,1029	0,3226	0,3069
4,5	0,1274	0,1253	0,4142	0,468	0,1182	0,1053	0,3928	0,3642
5,0	0,1421	0,1198	0,4114	0,4958	0,1276	0,1289	0,4565	0,4508
5,5	0,1766	0,1200	0,4451	0,5182	0,1564	0,1228	0,5367	0,5277
6,0	0,2294	0,1339	0,4814	0,5377	0,1936	0,1799	0,5765	0,5961
6,5	0,4603	0,1596	0,5179	0,553	0,187	0,1858	0,5887	0,6053
7,0	0,4257	0,1979	0,5509	0,5699	0,2204	0,2104	0,5976	0,6149
7,5	0,4347	0,3404	0,5887	0,5895	0,2754	0,2578	0,6131	0,6241
8,0	0,4559	0,4945	0,6181	0,6016	0,3578	0,3496	0,6357	0,6371
8,5	0,5173	0,4409	0,6329	0,6067	0,4066	0,4319	0,6576	0,6519
9,0	0,5359	0,4463	0,647	0,6203	0,4859	0,5336	0,6825	0,6677
9,5	0,5576	0,4567	0,6672	0,6272	0,5507	0,61	0,7081	0,6843
10,0	0,5627	0,4801	0,6784	0,6388	0,6544	0,6702	0,7343	0,7011
10,5	0,5781	0,5276	0,6931	0,6493	0,6802	0,7813	0,7655	0,7234
11,0	0,5959	0,5489	0,7032	0,6508	0,683	0,7755	0,8009	0,7518
11,5	0,5977	0,5657	0,7032	0,6489	0,6962	0,7212	0,8352	0,7840
12,0	0,6044	0,5938	0,7136	0,6586	0,7141	0,7131	0,871	0,8244
12,5	0,6239	0,5992	0,7219	0,6531	0,7267	0,7365	0,904	0,8696
13,0	0,6355	0,6032	0,7265	0,6566	0,7341	0,7657	0,9358	0,9228
13,5	0,6379	0,6102	0,7357	0,6627	0,743	0,788	0,9647	0,9826
14,0	0,6405	0,6206	0,7316	0,6664	0,7506	0,7967	0,9931	1,031

Cuadro A.18 Datos de masas utilizadas para la preparación de patrones de azúcares fermentables.

Patrón	Masas, M /(mg)
Glucosa	52,10
Fructosa	51,75
Sacarosa	56,73

Cuadro A.19. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Glucosa en la columna Phenomenex Luna-NH2.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)
0,50	12768432
0,75	20463620
1,00	30317842

Cuadro A.20. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Fructosa en la Phenomenex Luna-NH2.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)
0,50	13315894
0,75	19100374
1,00	29991798

Cuadro A.21. Datos de área para la determinación de la curva de calibración del patrón de Sacarosa en la columna Phenomenex Luna-NH2.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)
0,50	14147157
0,75	24349042
1,00	33531785

Cuadro A.22. Datos de área reportada para las corridas experimentales del diseño estadístico ANOVA.

Carga de Sólido, CS /(%)	Azúcar	Área, a /(V min)		
		A	B	C
15	Glucosa	15969089	15015174	14428260
	Fructosa	5747971	5666494	4541180
	Sacarosa	1231478	1051912	1100945
45	Glucosa	9229438	8699058	9821496
	Fructosa	17861378	17281898	18697888
	Sacarosa	1251414	1990360	3852992
60	Glucosa	3742109	7412059	5642938
	Fructosa	18433412	16860577	14379113
	Sacarosa	1704592	3815325	3900639

Cuadro A.23. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestra	Réplica	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol + biomasa, M_{cb} /(g)	Masa crisol + biomasa seca, M_{cbs} /(g)
15	A	11,7093	13,9868	13,8037
	B	11,7605	14,4314	14,1808
	C	11,4680	14,2328	14,0641
45	A	11,6708	14,4051	14,1582
	B	11,9836	15,1968	14,9035
	C	11,7742	14,9010	14,5856
60	A	11,8153	14,6990	14,4140
	B	10,6670	13,9118	13,6012
	C	12,2222	14,9118	14,6654

Cuadro A.24. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestra	Réplica	Masa de papel filtro, M_p /(g)	Masa de papel filtro + muestra, M_{pm} /(g)	Masa balón, M_B /(g)	Masa balón + extractos, M_{Be} /(g)
15	A	0,7157	2,8005	174,8112	175,0994
	B	0,7116	2,9861	162,4201	162,7416
	C	0,7014	2,9647	167,8496	168,1714
45	A	0,7073	2,9937	168,3958	168,6932
	B	0,7029	3,1025	82,1632	82,4591
	C	0,6984	3,2015	162,4130	162,7168
60	A	0,7003	3,0125	167,8492	168,1961
	B	0,6987	3,30215	174,8063	175,1866
	C	0,7087	3,0189	168,3751	168,7125

Cuadro A.25. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestras	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol + muestra seca, M_{cms} /(g)	Masa crisol + cenizas, M_{cc} /(g)
15-A	12,6896	12,7131	12,6899
15-B	11,8176	11,8414	11,8181
15-C	12,888	12,9133	12,8884

Cuadro A.25. (continuación) Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestras	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol +muestra seca, M_{cms} /(g)	Masa crisol + cenizas, M_{cc} /(g)
45-A	12,4446	12,4683	12,4455
45-B	12,6078	12,6309	12,6083
45-C	12,1946	12,2175	12,1950
60-A	12,2246	12,2499	12,2256
60-B	13,9371	13,9616	13,9377
60-C	14,5567	14,5818	14,5570

Cuadro A.26. Datos de absorbancias para determinar el porcentaje de lignina soluble en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestras	Absorbancia, A /(adim)	Volumen de alícuota, V_a /(mL)	Volumen de dilución, V_d /(mL)
15-A	0,975	4	5
15-B	0,936	4	5
15-C	0,966	4	5
45-A	0,964	4	5
45-B	0,861	4	7
45-C	0,850	4	7
60-A	0,929	5	6
60-B	0,938	5	6
60-C	0,933	5	6

Cuadro A.27. Datos de área para la determinación de la curva de calibración de los patrones de azúcares en la columna de intercambio iónico para la validación de resultados.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
0,50	249833	228396	203888
0,75	584663	523786	475092
1,00	981880	842979	793816
2,00	1397046	1272478	1272478

Cuadro A.28. Datos de área reportada para la validación de resultados de resultados del pretratamiento de ozonólisis.

Tiempo, t /(min)	Factor de dilución, fd	Azúcar	Área, a /(V min)	
			pH 3	pH 11
0		Glucosa	0	0
10	6	Glucosa	106384	105616
		Fructosa	208981	201780
15	6	Glucosa	132299	142857
		Fructosa	250330	267907
20	6	Glucosa	137853	168063
		Fructosa	272783	317899
25	6	Glucosa	168648	185194
		Fructosa	319490	348136
30	6	Glucosa	289273	225139
		Fructosa	268846	399887
		Xilosa	7979	9364

Cuadro A.29. Datos de área para la determinación de la curva de calibración de los patrones de azúcares en la columna Phenomenex Luna-NH2 para la validación de resultados con el microorganismo celulolítico.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Área, a /(V min)		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
0,50	126865	127636	126542
0,75	279637	249767	247667
1,00	401280	386506	385791

Cuadro A.30. Datos de área reportada en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 0.25 mm al microorganismo celulolítico.

Tiempo, t /(h)	Factor de dilución, fd	Azúcar	Área, a /(V min)
72	2.5	Glucosa	89877
		Fructosa	186194
		Sacarosa	54087

Cuadro A.31. Datos de áreas reportadas en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 1 mm al microorganismo celulolítico

Tiempo, <i>t</i> /(h)	Factor de dilución, <i>fd</i>	Azúcar	Área, <i>a</i> /(V min)	
0		Glucosa	0	
17	2.5	Glucosa	36599	
		Fructosa	90749	
24	2.5	Glucosa	65677	
		Fructosa	129494	
41	2.5	Glucosa	60482	
		Fructosa	116983	
		Sacarosa	11909	
48	2.5	Glucosa	64883	
		Fructosa	111573	
		Sacarosa	6009	
72	2.5	Glucosa	88739	
		Fructosa	187727	
		Sacarosa	13202	

Cuadro A.32. Datos de áreas reportadas al exponer el rastrojo de piña previamente ozonado a diferentes pH al microorganismo celulolíticos.

Tiempo, <i>t</i> /(h)	Factor de dilución, <i>fd</i>	Azúcar	Área, <i>a</i> /(V min)	
			pH 3	pH 11
0		Glucosa	0	0
17	2.5	Glucosa	82271	112589
24	2.5	Glucosa	136023	131675
41	2.5	Glucosa	166979	142100
48	2.5	Glucosa	201707	162247
72	2.5	Glucosa	231734	198531

Cuadro A.33. Recuento bacteriano.

Tiempo, <i>t</i> /(min)	Cantidad de UFC		
	1 mm	pH 3	pH 11
0	1,00E+06	5,00E+06	4,00E+06
17	1,09E+09	1,67E+09	1,58E+09
24	9,70E+08	1,29E+09	9,60E+08
41	6,10E+08	8,70E+08	5,10E+08
48	4,80E+08	6,90E+08	4,60E+08

Cuadro A.34. Datos de masas para determinar el porcentaje de sólidos totales en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestra	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol + biomasa, M_{cb} /(g)	Masa crisol + biomasa seca, M_{cbs} /(g)
O-pH3	11,2262	14,8625	14,4989
O-pH11	10,0927	15,0236	14,5943
M-0.25	10,2642	14,8761	14,4911
M-1	12,3051	16,0054	15,7017
OM-pH3	12,1242	15,1706	14,9059
OM-pH11	11,5140	14,6323	14,3715

Cuadro A.35. Datos de masas para determinar el porcentaje de extractos en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestra	Masa de papel filtro, M_p /(g)	Masa de papel filtro + muestra, M_{pm} /(g)	Masa balón, M_B /(g)	Masa balón + extractos, M_{Be} /(g)
O-pH3	0,6001	3,3216	167,8771	168,2159
O-pH11	0,6025	3,4642	162,5103	162,8875
M-0.25	0,5991	2,9848	125,2237	125,5431
M-1	0,6093	3,3148	166,5685	166,9484
OM-pH3	0,5999	3,1678	162,3413	162,6273
OM-pH11	0,5968	3,3617	174,7431	175,0584

Cuadro A.36. Datos de masas para determinar el porcentaje de lignina insoluble en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestras	Masa crisol, M_c /(g)	Masa crisol + muestra seca, M_{cms} /(g)	Masa crisol + cenizas, M_{cc} /(g)
O-pH3	17,7081	17,7322	17,7086
O-pH11	17,5353	17,5618	17,5362
M-0.25	12,6097	12,6344	12,6101
M-1	17,7178	17,7446	17,7202
OM-pH3	12,9982	13,0176	12,9989
OM-pH11	12,0754	12,0998	12,0761

Cuadro A.37. Datos de absorbancias para determinar el porcentaje de lignina soluble en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestras	Absorbancia, A /(adim)	Volumen de alícuota, V_a /(mL)	Volumen de dilución, V_d /(mL)
O-pH3	0,825	4	6
O-pH11	0,774	4	7
M-0.25	0,745	4	7
M-1	0,754	4	7
OM-pH3	0,768	4	5
OM-pH11	0,717	4	5

Cuadro A.38. Datos de pH final de las corridas experimentales con el pretratamiento de ozonólisis según diseño estadístico L9.

Muestra	pH final de la muestra	
	A	B
1	4,15	4,13
2	4,79	4,69
3	4,96	4,94
4	4,82	5,08
5	4,47	4,57
6	4,54	4,52
7	4,59	4,67
8	4,47	4,52
9	4,37	4,30

Cuadro A.39. Datos de pH final de las corridas experimentales con el microorganismo *Pseudomonas putida* según diseño estadístico ANOVA.

Carga de Sólido, CS /(%)	pH final de la muestra		
	A	B	C
15	5,88	5,36	5,25
45	4,83	4,82	4,79
60	7,46	7,52	7,53

Cuadro A.40. Datos de pH final de las corridas de validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestras	pH final de la muestra	Muestras	pH final de la muestra
O-pH3	4,47	M-1	4,61
O-pH11	4,86	OM-pH3	5,49
M-0.25	4,51	OM-pH11	5,97

B. DATOS INTERMEDIOS

Cuadro B.1. Datos de concentración asociados al volumen de inyección de los patrones de azúcares fermentables.

Volumen de patrón, V_p /(μ L)	Concentración, C_n /(g/100 mL)			
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Xilosa
0,50	0,1651	0,1649	0,1690	0,1651
0,75	0,2476	0,2474	0,2534	0,2476
1,00	0,3302	0,3298	0,3379	0,3302
2,00	0,6604	0,6596	0,6758	0,6604
3,00	0,9906	0,9894	1,0138	0,9906

Cuadro B.2. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables.

Patrón	Pendiente	Intercepto
Glucosa	73504648,94	127590,0988
Fructosa	71867546,6	-177039,4767
Xilosa	69534733,34	-25284,74699
Sacarosa	70149924,06	-191638,189

Cuadro B.3. Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis.

Muestra	Azúcar	Concentración, C_n /(g/100 mL)	
		A	B
1	Glucosa	0,0574	0,0601
	Fructosa	0,0989	0,1068
	Sacarosa	0,0196	0,0159
	Xilosa	0,0018	0,0020
2	Glucosa	0,3086	0,3407
	Fructosa	0,4598	0,5007
	Sacarosa	0,0466	0,0356
	Xilosa	0,0071	0,0113
3	Glucosa	0,6413	0,7209
	Fructosa	1,0359	0,9486
	Sacarosa	0,0057	0,0068
	Xilosa	0,0189	0,0355

Cuadro B.3. (continuación) Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis.

Muestra	Azúcar	Concentración, Cn /(g/100 mL)	
		A	B
4	Glucosa	0,0459	0,0544
	Fructosa	0,0784	0,0882
	Sacarosa	0,0156	0,0099
	Xilosa	0,0011	0,0013
5	Glucosa	0,2433	0,2430
	Fructosa	0,3739	0,3541
	Sacarosa	0,0318	0,0302
	Xilosa	0,0033	0,0041
6	Glucosa	0,4217	0,5258
	Fructosa	0,6186	0,7782
	Sacarosa	0,0256	0,0330
	Xilosa	0,0108	0,0121
7	Glucosa	0,0552	0,0716
	Fructosa	0,0963	0,1101
	Sacarosa	0,0153	0,0061
	Xilosa	0,0010	0,0011
8	Glucosa	0,2500	0,3323
	Fructosa	0,5241	0,4964
	Sacarosa	0,0342	0,0249
	Xilosa	0,0051	0,0059
9	Glucosa	0,6490	0,7160
	Fructosa	0,9963	0,9204
	Sacarosa	0,0683	0,0395
	Xilosa	0,0171	0,0233

Cuadro B.4. Concentración total de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónolisis.

Muestra	Concentración, C_n /(g/100 mL)		Desviación estándar
	A	B	
1	0,1778	0,1849	± 0,0050
2	0,8222	0,8885	± 0,0468
3	1,7019	1,7120	± 0,0071
4	0,1412	0,1540	± 0,0091
5	0,6525	0,6317	± 0,0147
6	1,0768	1,3492	± 0,1926
7	0,1681	0,1891	± 0,0149
8	0,8136	0,8597	± 0,0326
9	1,6137	1,6761	± 0,0441

Cuadro B.5. Porcentaje de sólidos totales en hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Sólidos Totales, ST /(%)	
	1	2
Hojas de rastrojo de piña	90,3821	90,5721
Desviación estándar	± 0,1344	

Cuadro B.6. Porcentaje de sólidos totales obtenido en las muestras del diseño experimental L9.

Muestra	Sólidos Totales, ST /(%)	
	A	B
1	91,9305	91,0719
2	91,7152	92,8727
3	92,4513	92,2340
4	91,8756	90,6137
5	91,1178	91,1367
6	92,1106	91,2318
7	91,4905	90,9147
8	90,6344	90,7533
9	90,5265	90,9168

Cuadro B.7. Porcentaje de extractos en hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Masa seca de muestra, ODW /(g)		Porcentaje de extractos, E /(%)	
	1	2	1	2
Hojas de rastrojo de piña	2,4998	2,4150	18,6849	18,9688
Desviación estándar	± 0,2007			

Cuadro B.8. Porcentaje de extractos obtenido en las muestras del diseño experimental L9.

Muestra	Masa seca de muestra, <i>ODW</i> /(g)		Porcentaje de extractos, <i>E</i> /(%)	
	A	B	A	B
1	2,4107	2,3440	14,8837	15,0981
2	2,7033	2,8152	13,5686	13,9033
3	2,6030	2,5385	12,5587	12,3185
4	2,1998	3,0801	15,5198	15,2627
5	2,4415	2,5638	11,6322	11,2569
6	2,5563	2,6055	16,8835	16,9795
7	2,4348	2,3912	12,0583	12,0523
8	2,4014	2,4192	15,6870	15,4141
9	2,3757	2,2926	15,7933	15,6631

Cuadro B.9. Porcentaje de lignina en hojas de rastrojo de piña.

Muestra	Lignina Insoluble, <i>LIA</i> /(%)		Lignina soluble, <i>LSA</i> /(%)	
	1	2	1	2
Hojas de rastrojo de piña	9,9941	10,1502	1,9148	1,8827
Desviación estándar	$\pm 0,1104$		$\pm 0,0226$	

Cuadro B.10. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras del diseño experimental L9.

Muestra	Lignina Insoluble, <i>LIA</i> /(%)		Lignina soluble, <i>LSA</i> /(%)	
	A	B	A	B
1	7,2755	7,2862	2,4494	2,4067
2	7,4063	7,4088	2,4630	2,5223
3	9,2919	9,3238	2,1983	2,2014
4	8,0147	8,0410	2,2819	2,2438
5	7,4478	7,4202	2,3537	2,4096
6	8,6294	8,6506	2,3137	2,2991
7	7,8982	7,9059	2,1100	2,2363
8	8,4379	8,4346	2,0760	2,1833
9	8,7315	8,6937	2,1610	2,1614

Cuadro B.11. Logaritmo de las absorbancias de la curva de crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2³ para la determinación de la velocidad de crecimiento específica.

Tiempo, t /(h)	Ln(A/A ₀) /(adim)							
	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A
0,0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,5	-0,0865	0,0586	0,0797	0,1044	0,0584	0,0717	0,0019	-0,1375
1,0	-0,3527	-0,2911	-0,0441	-0,0076	-0,3088	-0,2918	-0,1230	-0,1401
1,5	-0,3214	-0,3472	-0,1183	-0,0493	-0,2750	-0,3296	0,0316	-0,0576
2,0	-0,2997	-0,3198	0,0040	0,0729	-0,2697	-0,3195	0,2166	0,0573
2,5	-0,2311	-0,2251	0,2609	0,4200	-0,2623	-0,3072	0,3506	0,2513
3,0	-0,1539	-0,1885	0,5472	0,7189	-0,2250	-0,2896	0,5723	0,4022
3,5	0,0119	-0,0945	0,8075	1,0017	-0,1071	-0,2406	0,7390	0,6336
4,0	0,0884	-0,0008	1,0573	1,0007	-0,1035	-0,2029	0,8800	0,8414
4,5	-0,0209	-0,0507	1,0445	1,0337	-0,0432	-0,1618	1,0496	1,0126
5,0	0,0618	-0,0928	1,0466	1,1456	0,1135	0,1796	1,1998	1,2260
5,5	0,1186	0,0263	1,1734	1,2309	0,2690	0,2583	1,2909	1,3835
6,0	0,3047	0,2214	1,2465	1,3080	0,3794	0,4556	1,3188	1,5053
6,5	0,4936	0,4492	1,3194	1,3586	0,4068	0,6658	1,3253	1,5207
7,0	1,0319	1,0518	1,3645	1,4025	0,5784	0,9194	1,3478	1,5364
7,5	1,2084	1,3290	1,3914	1,4133	0,8423	1,1059	1,3874	1,5512
8,0	1,2747	1,2594	1,4130	1,4382	1,0288	1,3723	1,4257	1,5719
8,5	1,2749	1,2560	1,4343	1,4733	1,2414	1,5100	1,4641	1,5948
9,0	1,3879	1,3042	1,4682	1,4879	1,4702	1,6422	1,5017	1,6188
9,5	1,4611	1,3562	1,4799	1,5143	1,6031	1,7335	1,5377	1,6433
10,0	1,5158	1,4431	1,4982	1,5260	1,7069	1,7245	1,5757	1,6676
10,5	1,5354	1,4896	1,5091	1,5488	1,6464	1,6776	1,6152	1,6989
11,0	1,5558	1,5225	1,5410	1,5713	1,6391	1,6965	1,6567	1,7374
11,5	1,5945	1,5446	1,5416	1,5696	1,6795	1,7235	1,6972	1,7793
12,0	1,6126	1,5622	1,5410	1,5766	1,7072	1,7543	1,7427	1,8296
12,5	1,6137	1,5724	1,5522	1,5803	1,7324	1,7814	1,7828	1,8830
13,0	1,6477	1,5848	1,5678	1,5939	1,7570	1,8019	1,8172	1,9423
13,5	1,6494	1,5947	1,5709	1,5967	1,7877	1,8160	1,8516	2,0051
14,0	1,6616	1,6166	1,5688	1,5928	1,8135	1,8260	1,8930	2,0532

Cuadro B.12. Logaritmo de las absorbancias de la curva de crecimiento bacteriano según el arreglo Factorial 2³ para la determinación de la velocidad de crecimiento específica.

Tiempo, t /(h)	Ln(A/A ₀) /(adim)							
	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A
0,0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,5	0,0513	0,0862	0,0929	0,0330	0,1017	0,0283	0,0291	0,0277
1,0	-0,2087	-0,3861	-0,0033	-0,0708	-0,1771	-0,3641	-0,2753	-0,2314
1,5	-0,1688	-0,3939	-0,1686	0,0954	-0,2611	-0,3538	-0,2256	-0,1638
2,0	-0,0741	-0,3928	-0,0982	0,4459	-0,2487	-0,3448	-0,1627	-0,0744
2,5	-0,0054	-0,3643	0,0167	0,6563	-0,2375	-0,3314	-0,0477	0,0712
3,0	0,0961	-0,3046	0,2821	0,8591	-0,1993	-0,3105	0,1490	0,2428
3,5	0,2000	-0,2160	0,4499	0,8384	-0,1719	-0,2132	0,3651	0,4995
4,0	0,0863	-0,1547	0,7787	0,8803	0,0654	-0,1985	0,6564	0,7432
4,5	0,1288	-0,0619	0,9894	1,0138	0,0362	-0,1755	0,8033	0,9108
5,0	0,2380	-0,1068	0,9826	1,0716	0,1127	0,0267	0,9730	1,1397
5,5	0,4554	-0,1051	1,0613	1,1157	0,3162	-0,0217	1,1357	1,2723
6,0	0,7170	0,0045	1,1397	1,1527	0,5296	0,3601	1,2958	1,3919
6,5	1,4134	0,1801	1,2128	1,1807	0,4949	0,3924	1,3504	1,4707
7,0	1,3352	0,3952	1,2746	1,2108	0,6592	0,5167	1,3624	1,4827
7,5	1,3562	0,9375	1,3410	1,2447	0,8820	0,7199	1,3814	1,4849
8,0	1,4038	1,3109	1,3897	1,2650	1,1438	1,0245	1,4053	1,4946
8,5	1,5301	1,1962	1,4134	1,2734	1,2716	1,2359	1,4329	1,5127
9,0	1,5654	1,2084	1,4354	1,2956	1,4498	1,4473	1,4598	1,5406
9,5	1,6051	1,2314	1,4661	1,3066	1,5750	1,5812	1,4892	1,5605
10,0	1,6142	1,2814	1,4828	1,3250	1,7475	1,6753	1,5218	1,5827
10,5	1,6412	1,3757	1,5042	1,3413	1,7862	1,8287	1,5597	1,6083
11,0	1,6716	1,4153	1,5187	1,3436	1,7903	1,8212	1,5998	1,6406
11,5	1,6746	1,4455	1,5187	1,3407	1,8094	1,7486	1,6408	1,6802
12,0	1,6857	1,4939	1,5334	1,3555	1,8348	1,7373	1,6855	1,7242
12,5	1,7175	1,5030	1,5449	1,3471	1,8523	1,7696	1,7267	1,7706
13,0	1,7359	1,5096	1,5513	1,3525	1,8624	1,8085	1,7671	1,8138
13,5	1,7397	1,5212	1,5639	0,6627	1,8745	1,8372	1,8002	1,8524
14,0	1,7438	1,5381	1,5583	0,6664	1,8847	1,8482	1,8301	1,8903

Cuadro B.13. Datos de velocidad de crecimiento específica.

Muestra	Velocidad de crecimiento específico, μ / (h ⁻¹)		Desviación estándar
	A	B	
1	0.267	0.262	± 0.004
2	0.257	0.257	± 0.000
3	0.276	0.274	± 0.001
4	0.267	0.267	± 0.000
5	0.336	0.349	± 0.009
6	0.376	0.383	± 0.005
7	0.371	0.369	± 0.001
8	0.389	0.386	± 0.002

Cuadro B.14. Datos de concentración asociados al volumen de inyección de los patrones de azúcares fermentables.

Volumen de patrón, V_p / (μL)	Concentración, C_n / (g/100 mL)		
	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
0,50	0,1719	0,1708	0,1872
0,75	0,2579	0,2562	0,2808
1,00	0,3439	0,3416	0,3744

Cuadro B.15. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables.

Patrón	Pendiente	Intercepto
Glucosa	102072994,8	-5140817
Fructosa	97648391,16	-4211167
Sacarosa	103545385,1	-5067614

Cuadro B.16. Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento con el microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida*.

Carga de Sólido, CS /(%m/v)	Azúcar	Concentración, C_n / (g/100 mL)		
		A	B	C
15	Glucosa	0,51703	0,49367	0,47929
	Fructosa	0,25497	0,25289	0,22408
	Sacarosa	0,15209	0,14775	0,14893
45	Glucosa	0,35196	0,33897	0,36646
	Fructosa	0,56510	0,55027	0,58652
	Sacarosa	0,15257	0,17041	0,21538
60	Glucosa	0,17405	0,24596	0,21129
	Fructosa	0,46380	0,43158	0,38076
	Sacarosa	0,13081	0,17158	0,17322

Cuadro B.17. Concentración total de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento con el microorganismo celulolítico *Pseudomonas putida*.

Carga de Sólido, CS /(%m/v)	Concentración, Cn /(g/100 mL)			Desviación estándar
	A	B	C	
15	0.92409	0.89430	0.85230	± 0.0361
45	0.91706	1.05964	1.16836	± 0.1260
60	0.76866	0.84912	0.76528	± 0.0475

Cuadro B.18. Porcentaje de sólidos totales obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestra	Sólidos Totales, ST /(%)		
	A	B	C
1	91,9605	90,6174	93,8983
2	90,9703	90,8720	89,9130
3	90,1169	90,4278	90,8388

Cuadro B.19. Porcentaje de extractos obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestra	Masa seca de muestra, ODW /(g)			Porcentaje de extractos, E /(%)		
	A	B	C	A	B	C
1	1,9172	2,0611	2,1252	15,0324	15,5985	15,1421
2	2,0799	2,1806	2,2506	14,2985	13,5699	13,4985
3	2,0837	2,3542	2,0986	16,6484	16,1538	16,0777

Cuadro B.20. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras del diseño experimental ANOVA.

Muestra	Lignina Insoluble, LIA /(%)			Lignina soluble, LSA /(%)		
	A	B	C	A	B	C
1	8,2716	8,4860	8,6717	2,2322	2,1890	2,1602
2	8,2445	8,1541	8,1142	2,2383	2,4381	2,4058
3	8,8613	8,6542	8,8698	2,1270	2,1325	2,0951

Cuadro B.21. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables en la columna de intercambio iónico para la validación de resultados.

Patrón	Pendiente	Intercepto
Glucosa	2160368,33	45421,87
Fructosa	1982890,65	22075,87
Sacarosa	2008446,00	-34793,95

Cuadro B.22. Concentración de azúcares fermentables liberado en el pretratamiento de ozónólisis para las corridas de validación.

Tiempo, t/(min)	Azúcar	Concentración, Cn /(g/100 mL)			
		pH 3		pH 11	
10	Glucosa	0,1693	0,7378	0,16718	0,8119
	Fructosa	0,5656		0,64376	
15	Glucosa	0,24128	0,9320	0,37061	1,1184
	Fructosa	0,69067		0,74386	
20	Glucosa	0,25671	1,0153	0,44061	1,3397
	Fructosa	0,75861		0,89513	
25	Glucosa	0,34224	1,2422	0,48819	1,4788
	Fructosa	0,89994		0,98662	
30	Glucosa	0,67725	1,5517	0,49913	1,7743
	Fructosa	0,74670		1,14321	
	Sacarosa	0,12778		0,13192	

Cuadro B.23. Datos obtenidos para la pendiente e intercepto asociado a las curvas de calibración para la determinación de azúcares fermentables en la columna Phenomenex Luna-NH2.

Patrón	Pendiente	Intercepto
Glucosa	1596085,61	-142361,83
Fructosa	1515854,19	-133668,66
Sacarosa	1384810,55	-135540,16

Cuadro B.24. Concentración de azúcares fermentables liberados en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 0.25 mm al microorganismo celulolítico.

Tiempo, t/(h)	Azúcar	Concentración, Cn /(g/100 mL)
72	Glucosa	0,36376
	Fructosa	0,52753
	Sacarosa	0,28818

Cuadro B.25. Concentración de azúcares fermentables liberados en la corrida de validación de resultados al exponer el rastrojo de piña con un tamaño de partícula de 1 mm al microorganismo celulolítico.

Tiempo, t/(h)	Azúcar	Concentración, Cn /(g/100 mL)
0	Glucosa	0
17	Glucosa	0,28031
	Fructosa	0,37012
24	Glucosa	0,32586
	Fructosa	0,43402
41	Glucosa	0,31772
	Fructosa	0,41338
	Sacarosa	0,26619
48	Glucosa	0,32461
	Fructosa	0,40446
	Sacarosa	0,25554
72	Glucosa	0,36198
	Fructosa	0,53006
	Sacarosa	0,26852

Cuadro B.26. Concentración de azúcares fermentables liberados al exponer el rastrojo de piña previamente ozonado a diferentes pH al microorganismo celulolíticos.

Tiempo, t/(min)	Azúcar	Concentración, Cn /(g/100 mL)	
		pH 3	pH 11
0	Glucosa	0	0
10	Glucosa	0,35185	0,39934
15	Glucosa	0,43604	0,42923
20	Glucosa	0,48453	0,44556
25	Glucosa	0,53893	0,47712
30	Glucosa	0,58596	0,53395

Cuadro B.27. Concentración total de azúcares fermentables liberado en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestras	Concentración, Cn /(g/100 mL)
O-pH3	1,5517
O-pH11	1,7743
M-0.25	1,1795
M-1	1,1605
OM-pH3	0,5859
OM-pH11	0,5339

Cuadro B.28. Porcentaje de sólidos totales obtenido en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestra	Sólidos Totales, ST /(%)
O-pH3	90,0008
O-pH11	91,2937
M-0.25	91,6520
M-1	91,7926
OM-pH3	91,3111
OM-pH11	91,6365

Cuadro B.29. Porcentaje de extractos obtenido en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestra	Masa seca de muestra, ODW /(g)	Porcentaje de extractos, E /(%)
O-pH3	2,4107	14,0541
O-pH11	2,7033	13,9533
M-0.25	2,1998	14,5196
M-1	2,6030	14,5949
OM-pH3	2,4415	11,7141
OM-pH11	2,5563	12,3340

Cuadro B.30. Porcentaje de lignina obtenido en las muestras para la validación de resultados y sinergia de los pretratamientos.

Muestra	Lignina Insoluble, LIA /(%)	Lignina soluble, LSA /(%)
O-pH3	8,6104	2,1483
O-pH11	9,2702	2,2004
M-0.25	8,7244	2,1003
M-1	8,6574	2,0999
OM-pH3	6,7247	1,7740
OM-pH11	8,5104	1,6538

C. MUESTRA DE CÁLCULO

C.1. Cálculo de la concentración de azúcares fermentables

Para el cálculo de la concentración de azúcares fermentables, se procedió a realizar la curva de calibración, la cual presenta una tendencia lineal y se rige bajo la siguiente ecuación:

$$Cn = \left(\frac{A - b}{m} \right) \times fd \quad C.1$$

Donde,

A: área, V min

Cn: concentración del azúcar, g/100 mL

m: pendiente, V min g/ 100 mL

b: intercepto, V min g/100 mL

fd: factor de dilución, adim

Utilizando los datos del Cuadro B.2. fila 1, columna 2 y 3 correspondiente a la pendiente e intercepto para la Glucosa y el dato del área reportado en el Cuadro A.6 para la muestra 1 en la columna 3 y el factor de dilución correspondiente a 1,25 se tiene:

$$Cn = \left(\frac{3504910 - 127590,0998}{73504648,94} \right) \times 1,25 = 0,0574 \frac{g}{100 mL}$$

Resultado que se encuentra tabulado en el Cuadro B.3, fila 2, columna 3. El mismo cálculo se utilizó para obtener los resultados de concentración de azúcares en cada corrida de los pretratamientos.

C.2. Cálculo de porcentaje de sólidos totales

El cálculo del porcentaje de sólidos totales se realizó con la siguiente ecuación:

$$\%TS = \left(\frac{M_{cbs} - M_c}{M_{cb} - M_c} \right) \times 100 \quad C.2$$

Donde,

%TS: porcentaje de sólidos totales en la muestra, %

M_c: masa de la cápsula de porcelana, g

M_{cb}: masa inicial de la cápsula de porcelana y muestra, g

M_{cbs} : masa final de la cápsula de porcelana y muestra, g

Los datos del Cuadro A.8. columnas 3,4 y 5, fila 2 se sustituyen de la siguiente forma:

$$\%TS = \left(\frac{14,9415 - 12,0171}{15,1982 - 12,0171} \right) \times 100 = 91,9305\%$$

Los resultados se presentan en el Cuadro B.5, fila 2, columna 3. El mismo cálculo se utilizó para la determinación de sólidos totales de las diferentes muestras.

C.3. Cálculo de porcentaje de extractos

Para el cálculo del porcentaje de extractivo, primeramente, se determina la cantidad de sólido total en la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$ODW = \frac{(M_{pm} - M_p) \times \%TS}{100} \quad C.3$$

Donde,

ODW : masa en seco de la muestra, g

M_p : masa inicial del papel filtro, g

M_{pm} : masa del papel y la muestra, g

Posteriormente, se hace uso de la siguiente ecuación para el cálculo de los extractos:

$$\%E = \frac{(M_{Be} - M_B)}{ODW} \times 100 \quad C.4$$

Donde,

$\%E$: porcentaje de extractos en la muestra, %

M_B : masa inicial del balón, g

M_{Be} : masa del balón y extractos, g

Los datos presentes en el Cuadro A.10, columnas 3,4,5 y 6, fila 2 se utilizan para el cálculo.

$$ODW = \frac{(3,2276 - 0,6053) \times 91,9305}{100} = 2,4107 \text{ g}$$

$$\%E = \frac{(168,2359 - 167,8771)}{2,4107} \times 100 = 14,8837 \%$$

El resultado se encuentra en el Cuadro B.7. columna 2 y 4, fila 2. Las ecuaciones anteriores, se utilizaron para la determinación de extractos para cada muestra analizada.

C.4. Cálculo de Lignina insoluble en ácido

El cálculo del porcentaje de lignina insoluble en ácido se realizó con la siguiente ecuación:

$$\%LIA = \frac{(M_{cms} - M_c) - (M_{cc} - M_c)}{ODW_{300}} \times 100 \quad C.5$$

Donde,

$\%LIA$: porcentaje de lignina insoluble en ácido, %

M_{cc} : masa del crisol y cenizas insolubles en ácido, g

M_{ci} : masa inicial del crisol, g

M_{cms} : masa del crisol y residuo, g

ODW : masa en seco de 300 mg, mg

Los datos que se sustituyen en la ecuación anterior, se encuentran en el Cuadro A.12. columnas 2,3 y 4, fila 2.

$$\%LIA = \frac{(17,7286 - 17,7072) - (17,7081 - 17,7072)}{0,28177} \times 100 = 7,2755\%$$

El dato de porcentaje de lignina se encuentra reportado en el Cuadro B.9, fila 2, columna 2. El mismo cálculo se utilizó para obtener el resultado de lignina insoluble en cada muestra.

C.5. Cálculo de Lignina soluble en ácido

El cálculo del porcentaje de lignina insoluble en ácido se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\%LSA = \frac{UV \times V \times fd}{\varepsilon \times ODW_{300}} \times 100 \quad C.6$$

Donde,

$\%LIA$: porcentaje de lignina soluble en ácido, %

UV: absorbancia, adim
 V: volumen del filtrado, 86,73 mL
 ε : absorptividad, 30,39 L/g cm

Utilizando los datos presentes en el Cuadro A.15, columnas 2,3 y 4, fila 2 se tiene:

$$\%LSA = \frac{0,967 \times 0,08673 \times \left(\frac{4+6}{4}\right)}{30,39 \times 0,28177} \times 100 = 2,4494 \%$$

El dato de porcentaje de lignina se encuentra reportado en el Cuadro B.9, fila 2, columna 4. El mismo cálculo se utilizó para obtener el resultado de lignina soluble en cada muestra.

C.6. Cálculo de tasa de crecimiento bacteriano

Para el cálculo del crecimiento de los microorganismos se procedió a utilizar la siguiente ecuación:

$$\frac{dA}{dt} = \mu A \quad C.7$$

Donde,

A: absorbancia a 650 nm, adim
 μ : velocidad de crecimiento específico, h⁻¹

Estimando que el orden de reacción tiende a uno, por lo tanto, al linealizar la ecuación se tiene que la pendiente de la recta corresponde a la velocidad de crecimiento específico de la cepa.

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = \mu t$$

Utilizando los datos presentes en el Cuadro B.11, columnas 1 y 2 se tiene:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = 0.267 t$$

El dato de la velocidad de crecimiento específica se encuentra reportado en el Cuadro B.13, fila 2, columna 2. El mismo cálculo se utilizó para obtener las demás constantes.

C.7. Rendimiento de hidrólisis

Para el cálculo del rendimiento de hidrólisis se utilizó la siguiente ecuación:

$$y = \frac{Cn_G}{Cn_B} \times 100 \quad \text{C.8}$$

Donde,

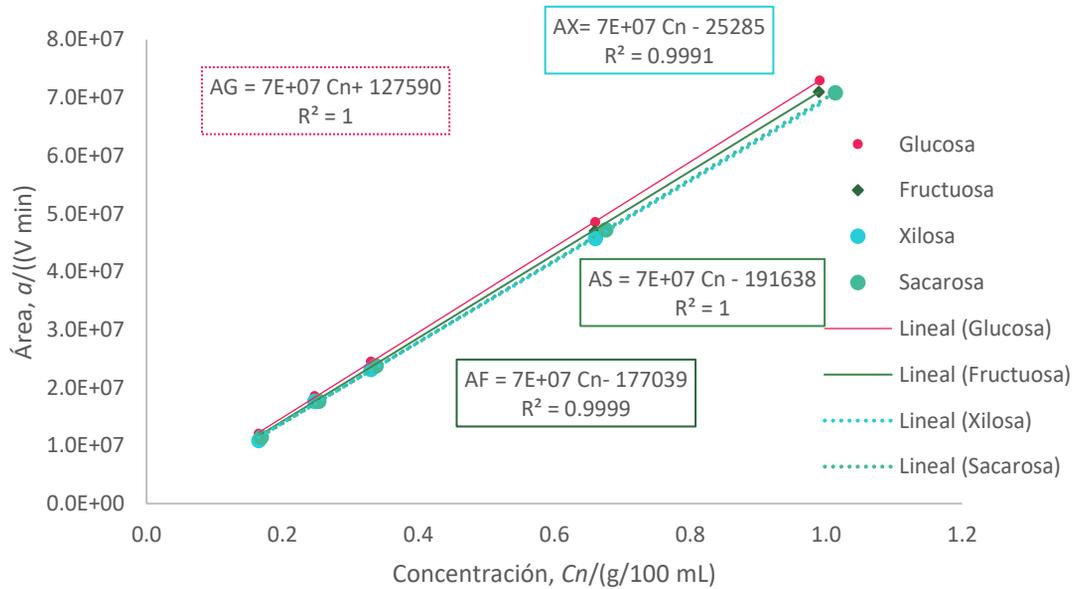
Cn_G : concentración de glucosa, g/L

Cn_B : concentración de biomasa, g/L

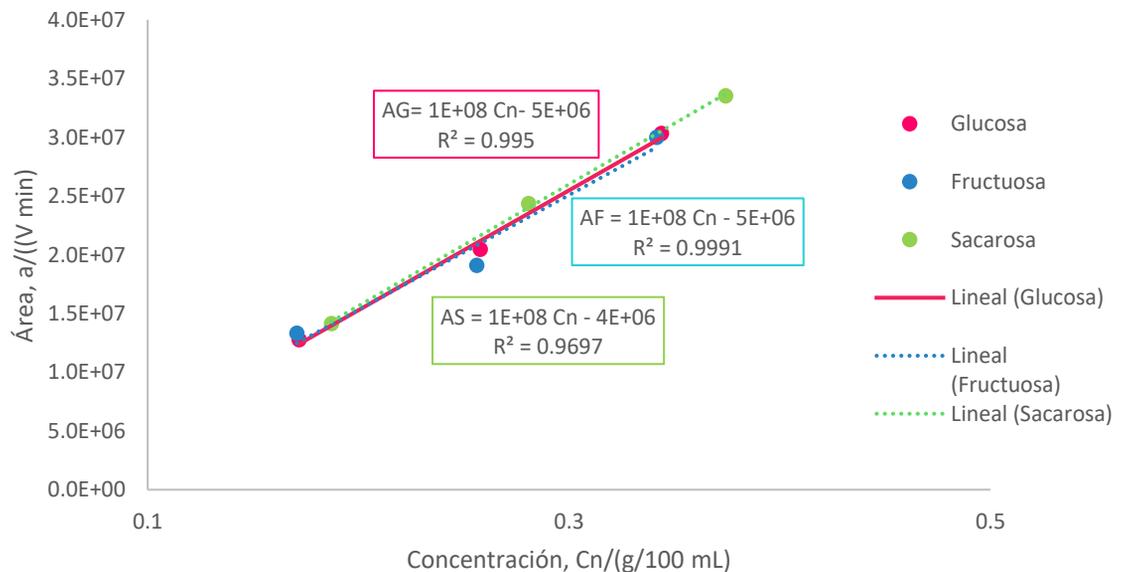
y : rendimiento de hidrólisis, %

$$y = \frac{5,859}{22,5} \times 100 = 26 \%$$

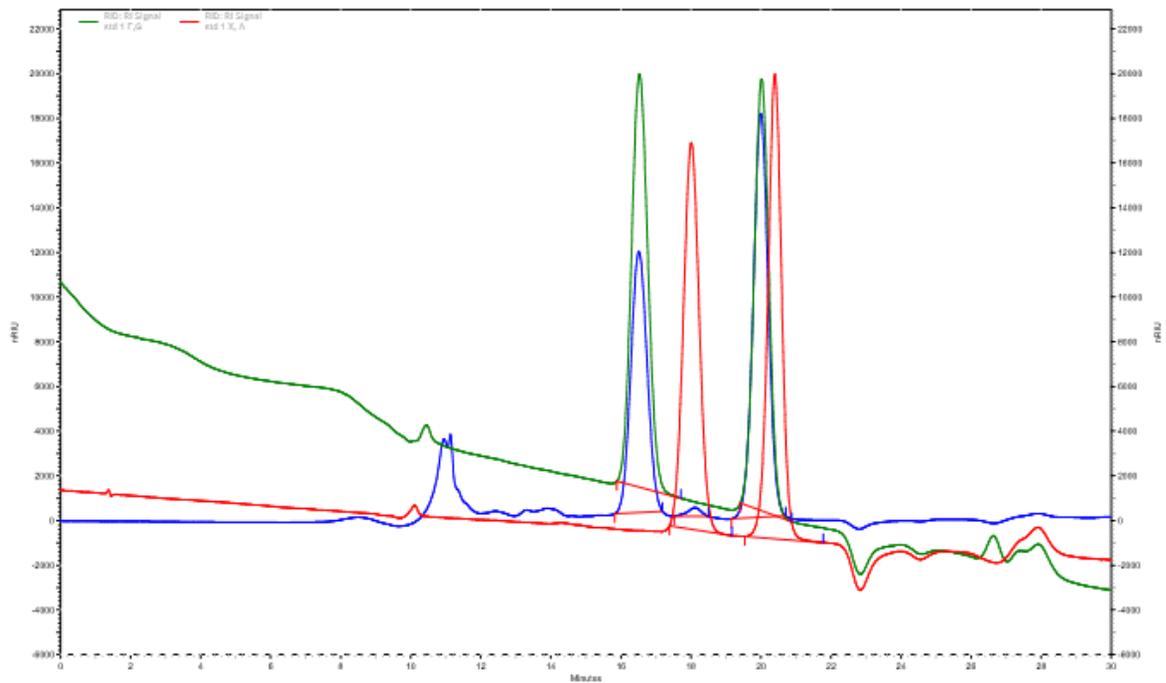
ANEXOS



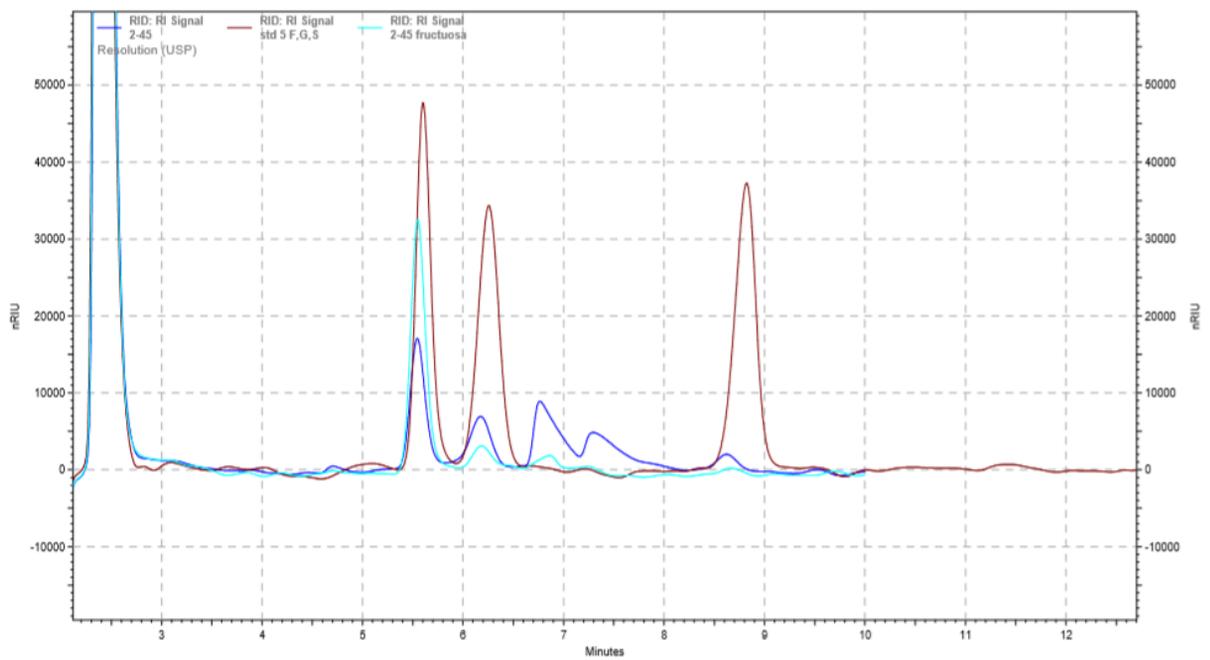
Anexo 1. Curva de calibración para determinación de azúcares fermentables en la columna de intercambio iónico.



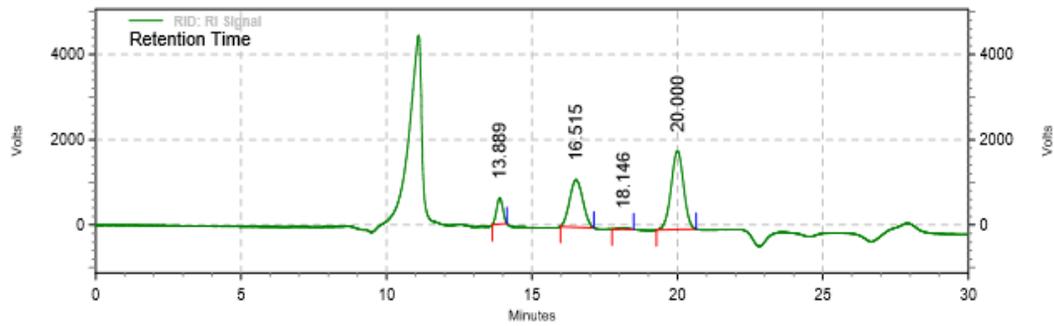
Anexo 2. Curva de calibración para determinación de azúcares fermentables en la columna Phenomenex Luna-NH2.



Anexo 3. Identificación de los azúcares fermentables presentes en las muestras de ozonólisis.



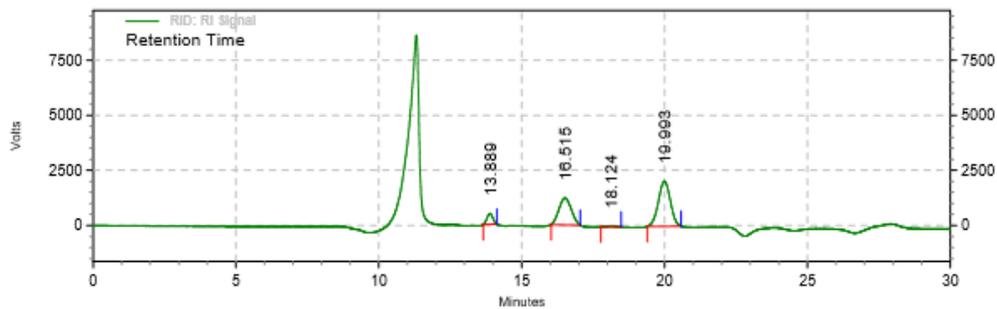
Anexo 4. Identificación de los azúcares fermentables presentes en las muestras con el microorganismo celulolítico.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.889	910620	9.10	61645	17.10
16.515	3504910	35.04	110836	30.75
18.146	78141	0.78	3506	0.97
20.000	5509583	55.08	184434	51.17

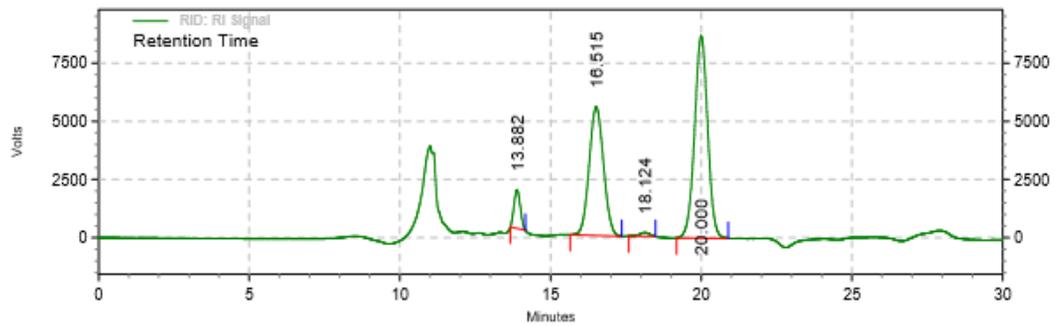
Anexo 5. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 1-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.889	704220	6.76	48950	12.91
16.515	3662341	35.16	121349	32.01
18.124	87225	0.84	4050	1.07
19.993	5963676	57.25	204726	54.01

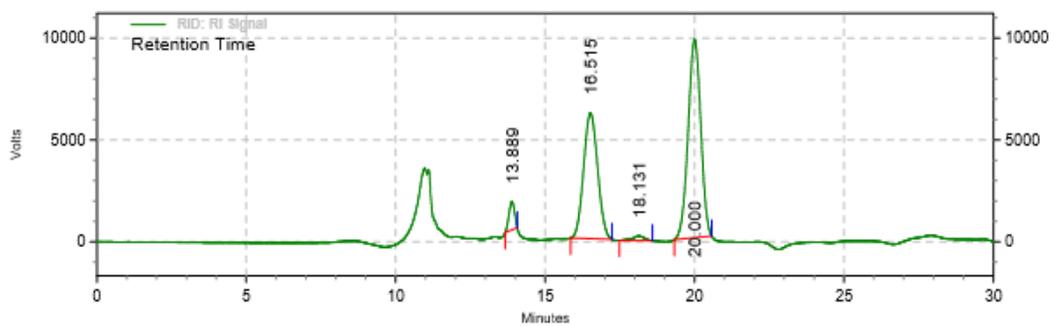
Anexo 6. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 1-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	2426977	5.13	165167	10.31
16.515	18275596	38.61	552243	34.49
18.124	371147	0.78	15711	0.98
20.000	26259109	55.48	868126	54.22

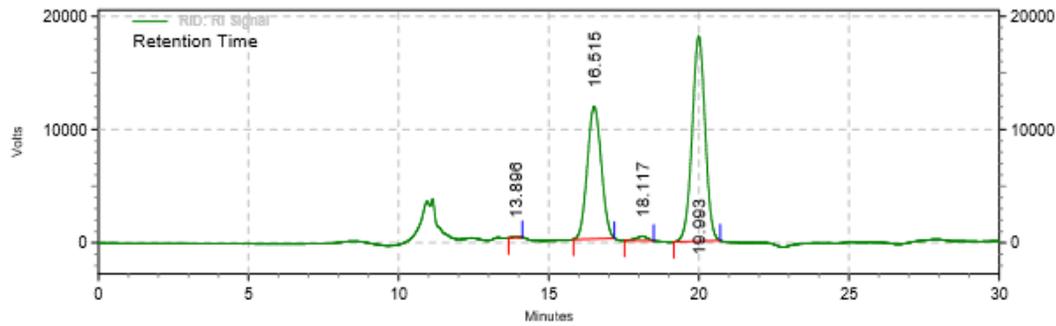
Anexo 7. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 2-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.889	1809893	3.54	137793	7.87
16.515	20163323	39.39	617549	35.26
18.131	604848	1.18	22193	1.27
20.000	28612536	55.89	973958	55.61

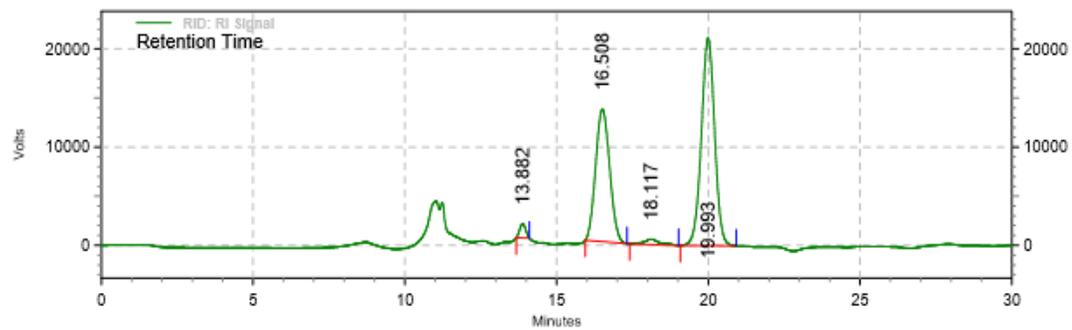
Anexo 8. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 2-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.896	130113	0.14	8521	0.28
16.515	37842998	40.52	1167470	38.63
18.117	1027088	1.10	38652	1.28
19.993	54381762	58.24	1807461	59.81

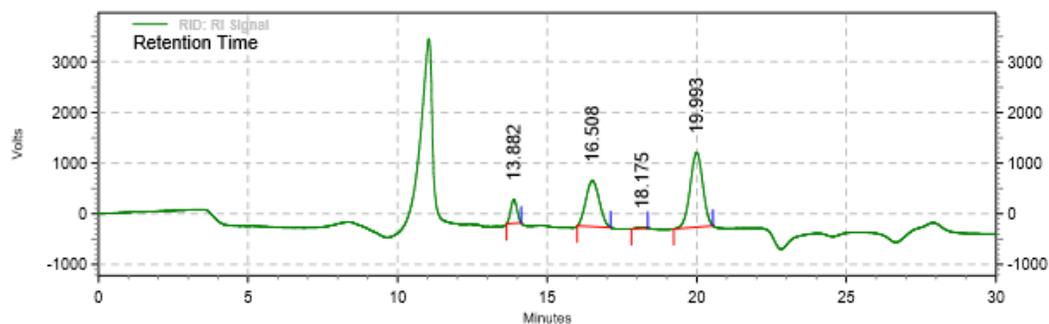
Anexo 9. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 3-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	1951108	1.75	142041	3.88
16.508	43523600	38.93	1349073	36.83
18.117	1952259	1.75	54519	1.49
19.993	64372121	57.58	2117685	57.81

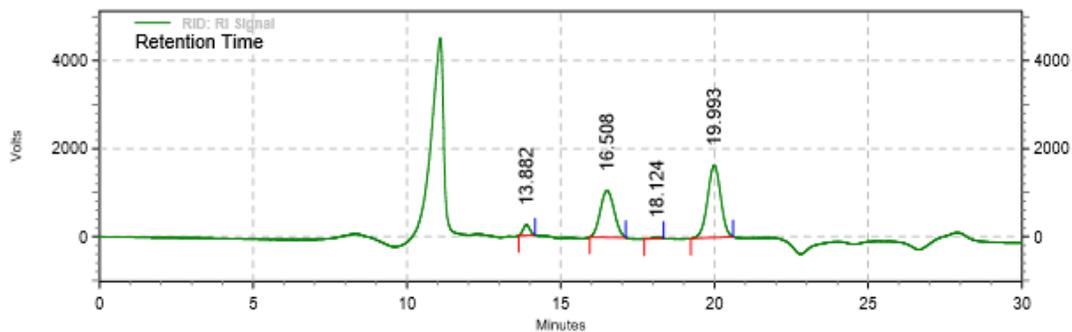
Anexo 10. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 3-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	684265	8.68	47091	16.38
16.508	2830983	35.89	90726	31.56
18.175	37494	0.48	2003	0.70
19.993	4334416	54.96	147688	51.37

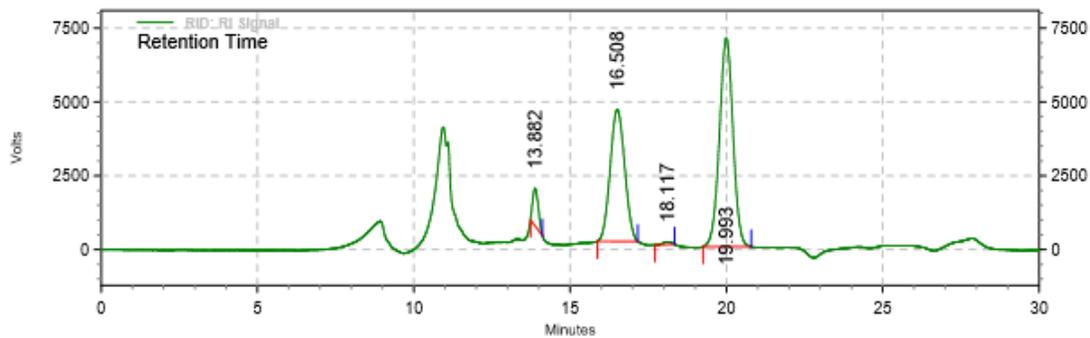
Anexo 11. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 4-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	364705	4.22	24364	8.16
16.508	3332055	38.55	106325	35.63
18.124	50096	0.58	2757	0.92
19.993	4896374	56.65	164994	55.29

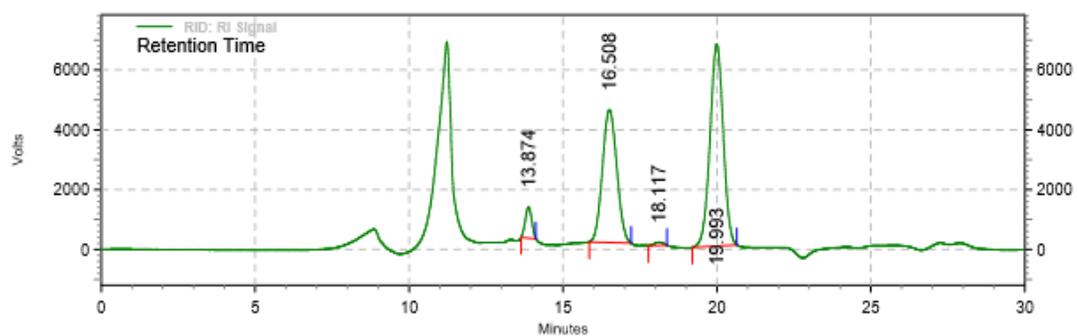
Anexo 12. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 4-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	1596050	4.25	127244	9.87
16.508	14438788	38.49	446221	34.60
18.117	163049	0.43	8986	0.70
19.993	21319720	56.83	707069	54.83

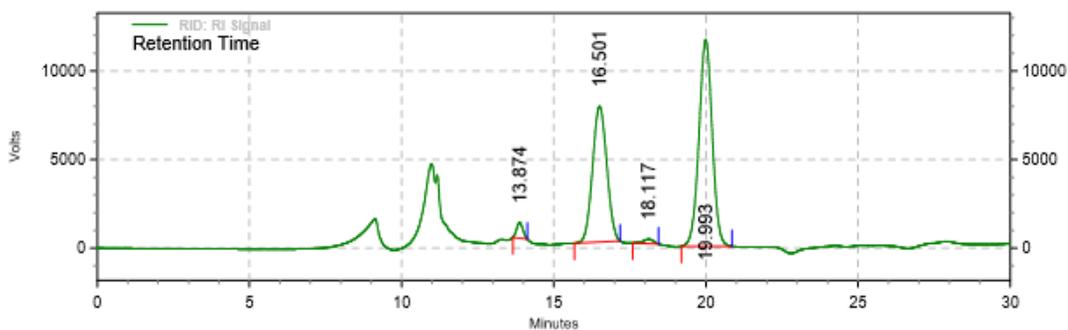
Anexo 13. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 5-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.874	1507877	4.15	103480	8.39
16.508	14421321	39.71	443901	36.01
18.117	203450	0.56	10631	0.86
19.993	20186955	55.58	674705	54.73

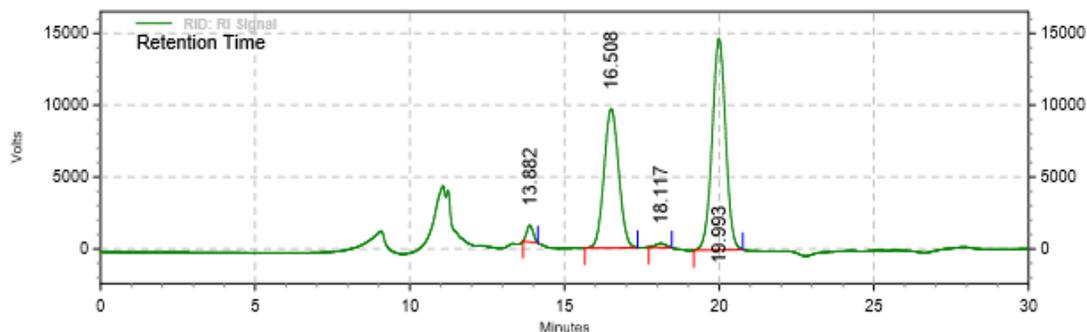
Anexo 14. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 5-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.874	1245679	2.00	86737	4.25
16.501	24925226	40.11	764540	37.44
18.117	579942	0.93	24646	1.21
19.993	35390368	56.95	1166366	57.11

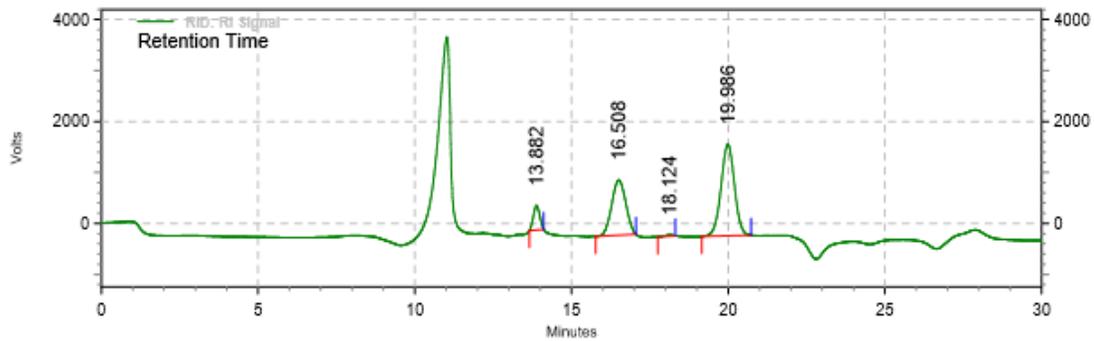
Anexo 15. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 6-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	1661590	2.11	114722	4.45
16.508	31949943	40.53	966910	37.47
18.117	649490	0.82	27543	1.07
19.993	44565201	56.54	1471447	57.02

Anexo 16. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 6-B del análisis estadístico Taguchi L 9.

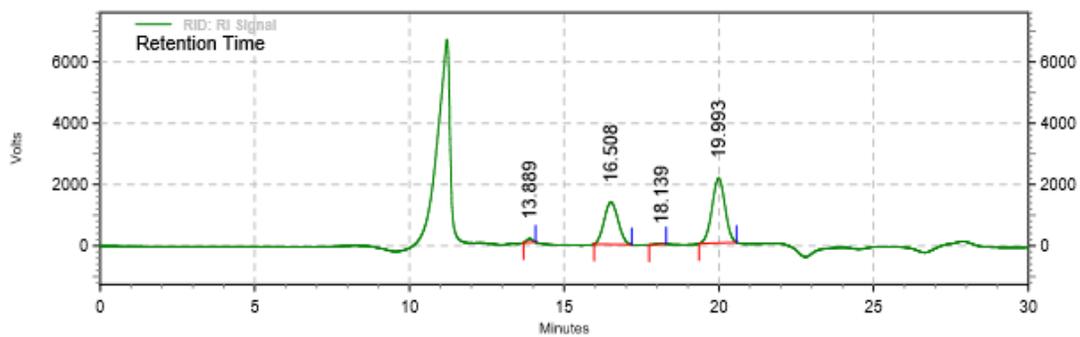


RID: RI Signal

Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	668244	7.07	47498	14.08
16.508	3379057	35.77	108178	32.08
18.124	35464	0.38	2093	0.62
19.986	5364009	56.78	179457	53.22

Anexo 17. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 7-A del análisis estadístico Taguchi L 9.

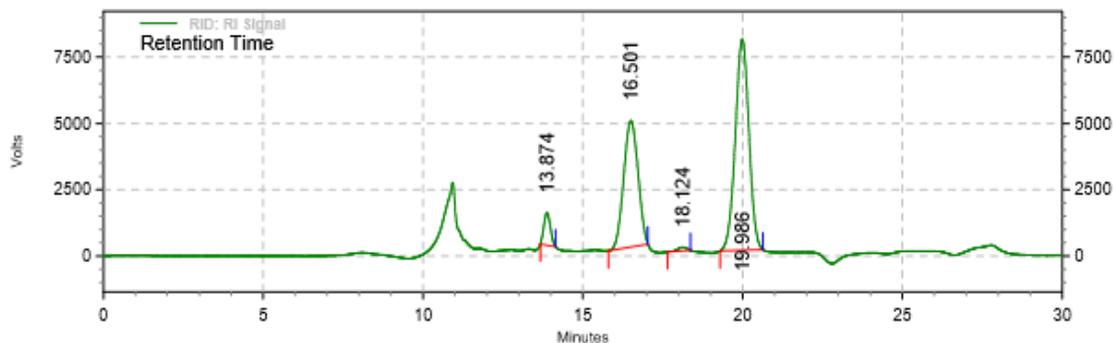


RID: RI Signal

Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.889	155249	1.45	12201	3.35
16.508	4342350	40.62	137764	37.85
18.139	38887	0.36	2399	0.66
19.993	6152819	57.56	211600	58.14

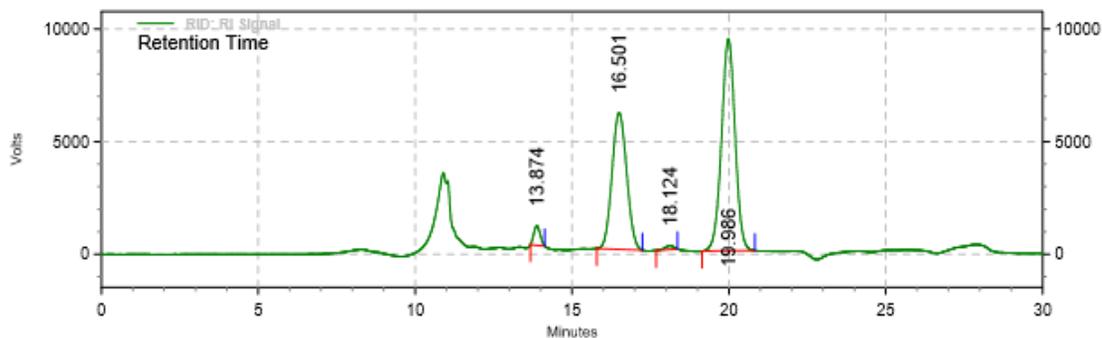
Anexo 18. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 7-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.874	1728272	4.27	121394	8.63
16.501	14833887	36.64	475802	33.81
18.124	260986	0.64	13395	0.95
19.986	23657476	58.44	796785	56.61

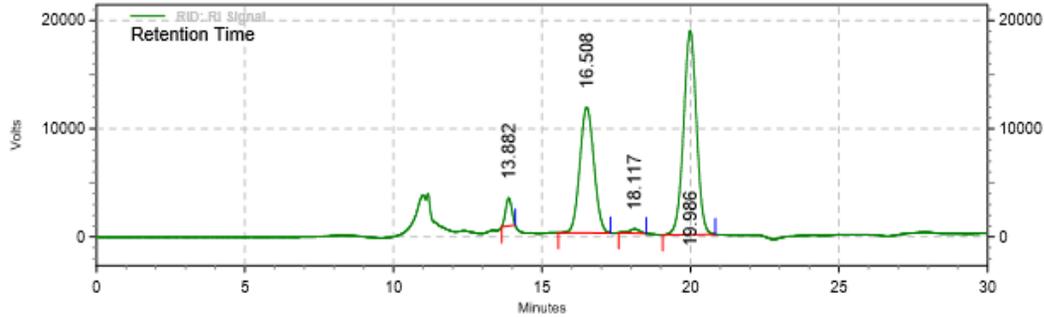
Anexo 19. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 8-A del análisis estadístico Taguchi L 9.



**RID: RI Signal
Results**

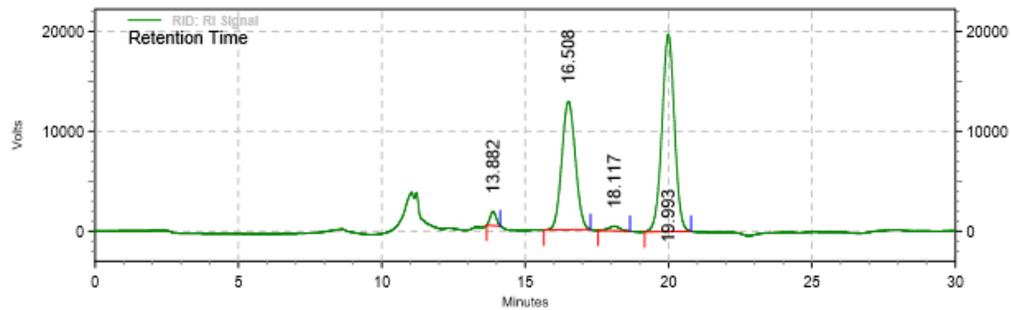
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.874	1210126	2.44	85630	5.20
16.501	19671686	39.70	605564	36.77
18.124	304884	0.62	15517	0.94
19.986	28365999	57.24	940086	57.09

Anexo 20. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 8-B del análisis estadístico Taguchi L 9.


RID: RI Signal
Results

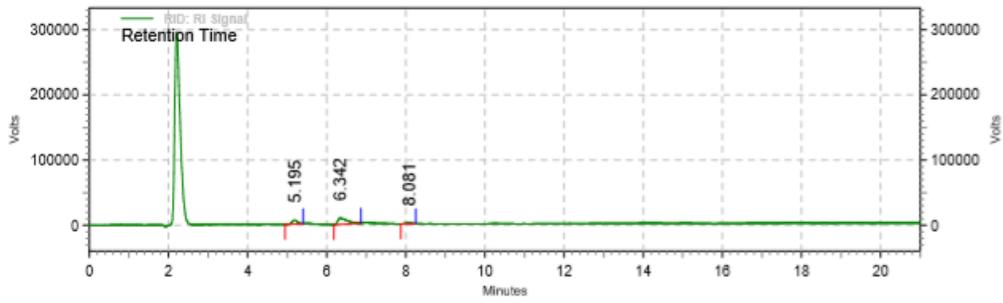
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	3643936	3.64	258410	7.73
16.508	38292233	38.30	1161243	34.73
18.117	928745	0.93	39069	1.17
19.986	57108298	57.12	1885013	56.37

Anexo 21. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 9-A del análisis estadístico Taguchi L 9.


RID: RI Signal
Results

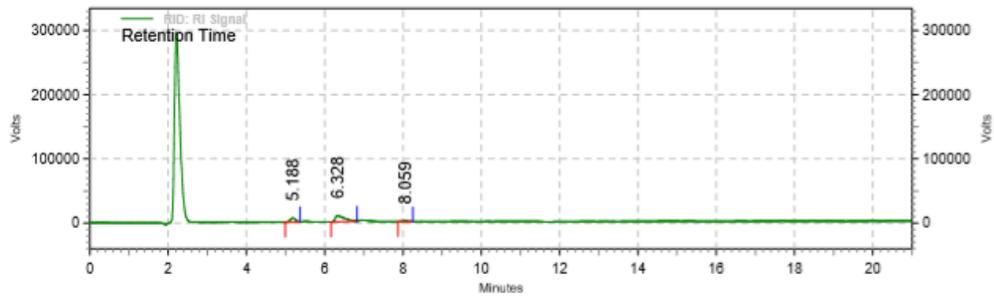
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
13.882	2026063	1.92	139867	4.06
16.508	42236012	40.12	1286064	37.29
18.117	1270735	1.21	45561	1.32
19.993	59743411	56.75	1976939	57.33

Anexo 22. Área de los azúcares fermentables producto de la réplica 9-B del análisis estadístico Taguchi L 9.



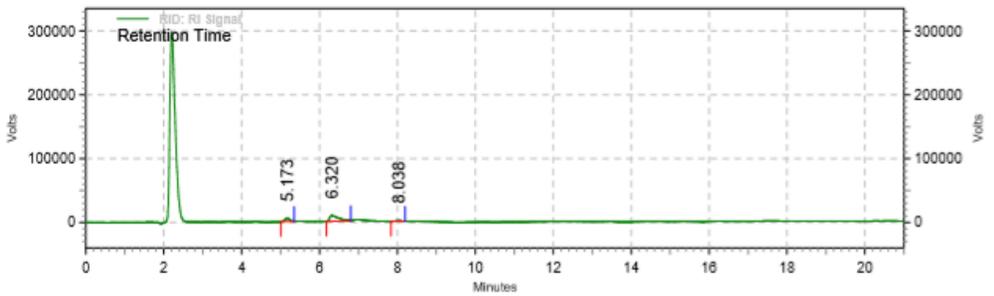
**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.195	5747971	25.05	594650	36.03
6.342	15969089	69.59	947708	57.42
8.081	1231478	5.37	107997	6.54



**RID: RI Signal
Results**

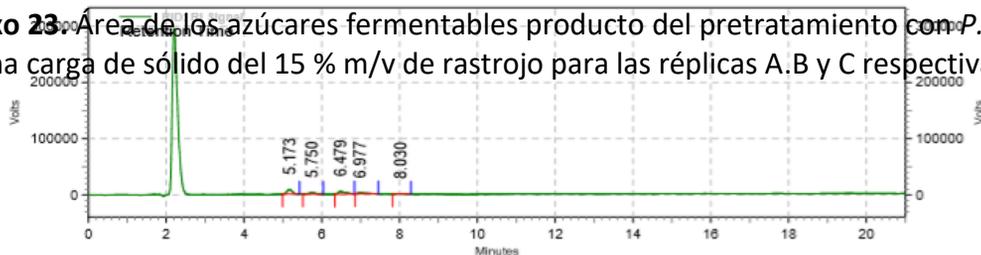
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.188	5666494	26.07	609483	37.55
6.328	15015174	69.09	922095	56.81
8.059	1051912	4.84	91665	5.65



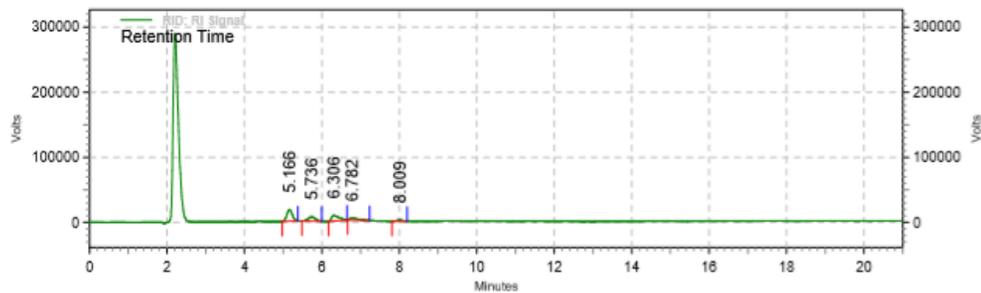
**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.173	4541180	22.63	487329	32.97
6.320	14428260	71.89	893212	60.43
8.038	1100945	5.49	97475	6.59

Anexo 23. Área de los azúcares fermentables producto del pretratamiento con *P.putida* con una carga de sólido del 15 % m/v de rastrojo para las réplicas A,B y C respectivamente.

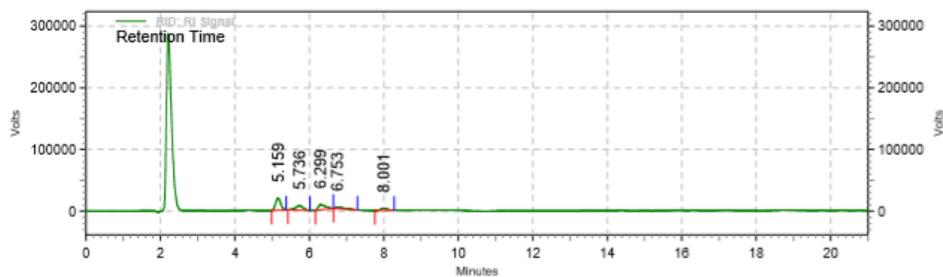


**RID: RI Signal
Results**



**RID: RI Signal
Results**

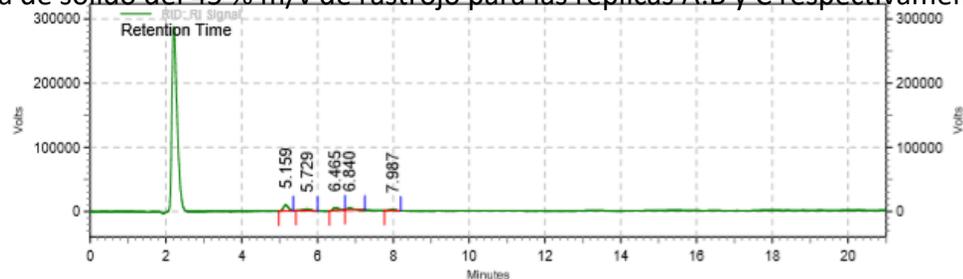
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.166	17281898	39.24	1782387	47.60
5.736	8699058	19.75	649257	17.34
6.306	11551822	26.23	849700	22.69
6.782	4514556	10.25	288608	7.71
8.009	1990360	4.52	174406	4.66

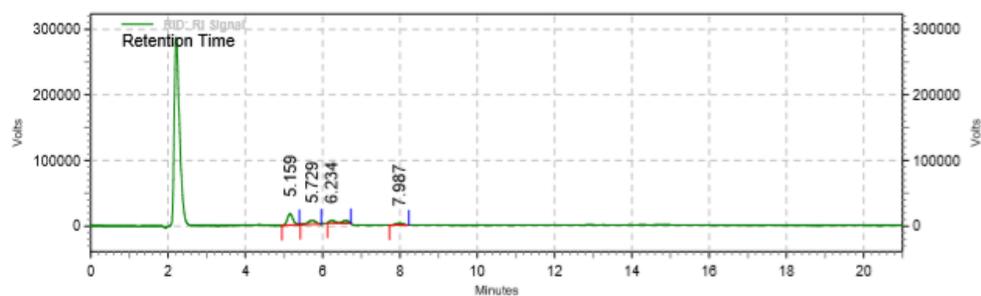


**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.159	18697888	38.89	1959859	48.10
5.736	9821496	20.43	704812	17.30
6.299	11207840	23.31	839553	20.61
6.753	4504832	9.37	264627	6.50
8.001	3852992	8.01	305321	7.49

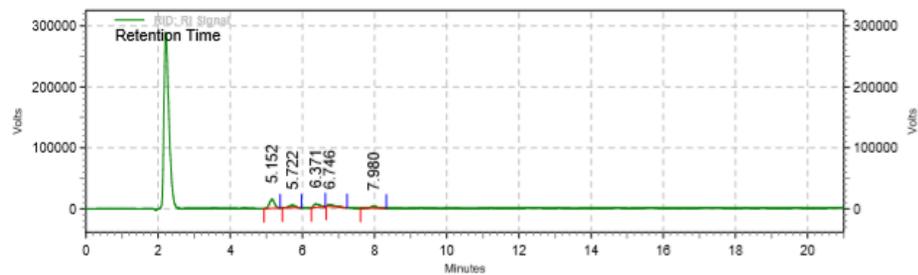
Anexo 24. Área de los azúcares fermentables producto del pretratamiento con *P.putida* con una carga de sólido del 45 % m/v de rastrojo para las réplicas A,B y C respectivamente.





**RID: RI Signal
Results**

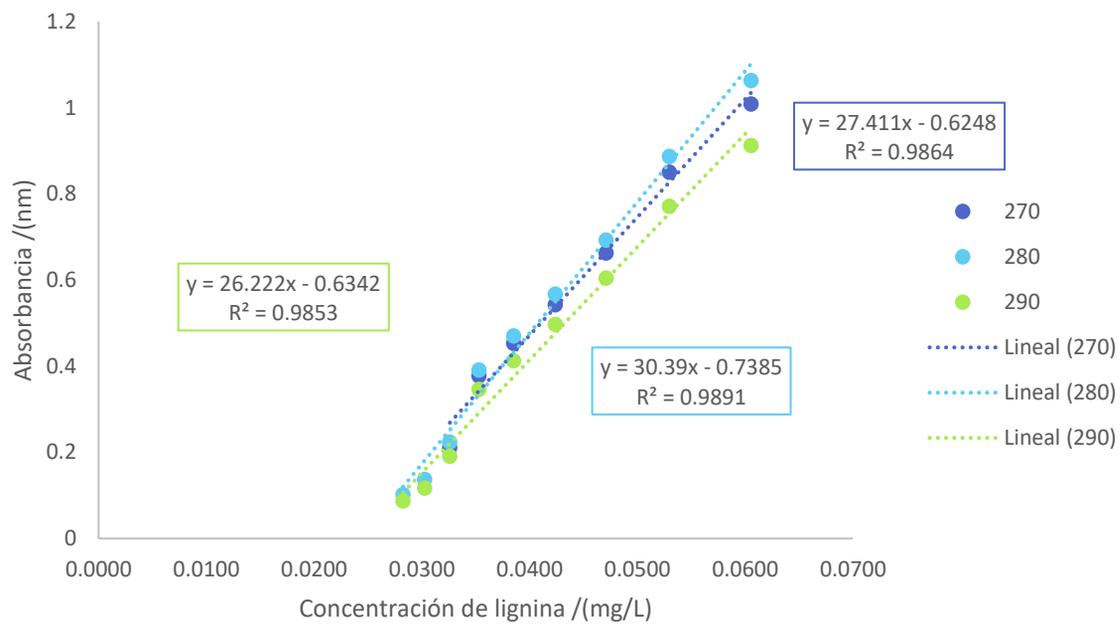
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.159	16860577	47.01	1743170	57.85
5.729	7412059	20.67	573506	19.03
6.234	7774570	21.68	386404	12.82
7.987	3815325	10.64	310148	10.29



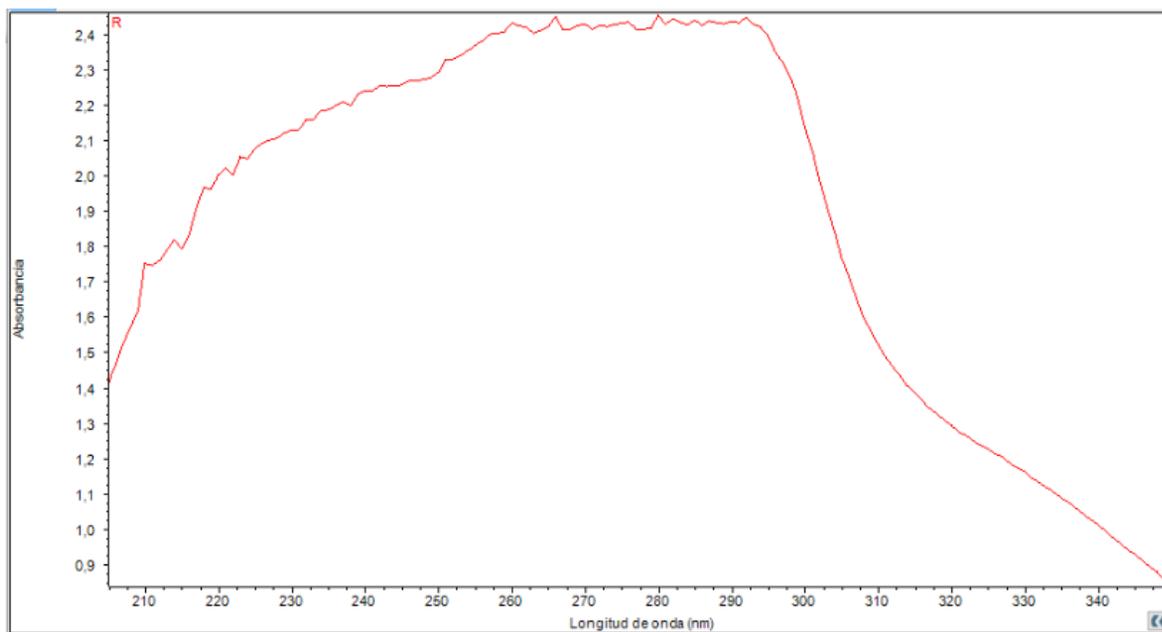
**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
5.152	14379113	41.56	1470223	49.07
5.722	5642938	16.31	429020	14.32
6.371	6275787	18.14	561197	18.73
6.746	4400174	12.72	263071	8.78
7.980	3900639	11.27	272503	9.10

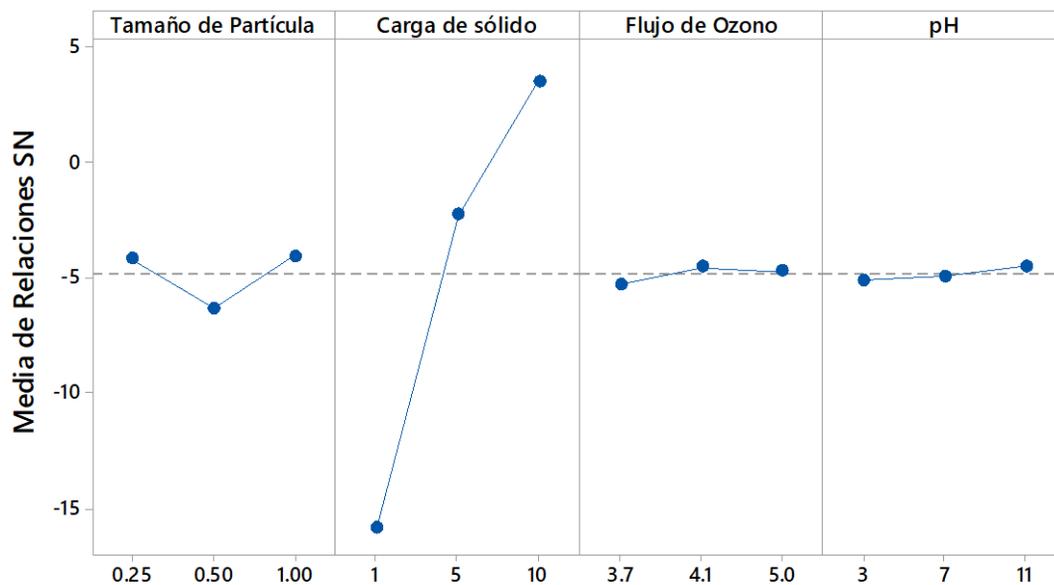
Anexo 25. Área de los azúcares fermentables producto del pretratamiento con *P.putida* con una carga de sólido del 45 % m/v de rastrojo para las réplicas A.B y C respectivamente.



Anexo 26. Curva de calibración para la determinación de la absortividad con el patrón de lignina Kraft.



Anexo 27. Barrido hecho a las muestras del análisis NREL.

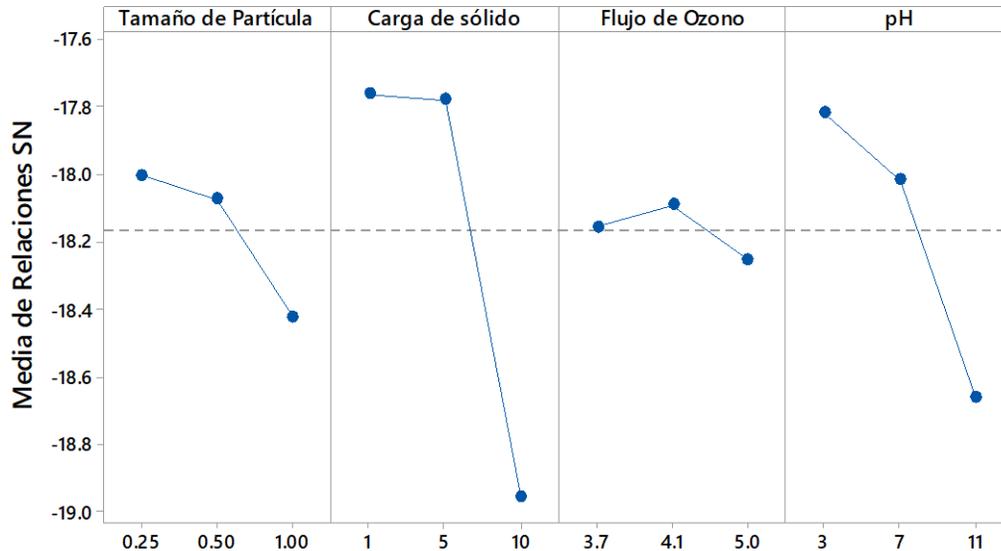


Anexo 28. Valores de la relación S/N para cada uno de los factores utilizados con el pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de azúcares fermentales.

Anexo 29. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de azúcares fermentales.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Varianza	Radio de Varianza	p-Value	Contribución/ (%)
T. Partícula	2.00	0.11	0.06	3.28	0.0848	1.83
C.Sólido	2.00	5.60	2.80	167.28	0.0000	93.36
Flujo Ozono	2.00	0.07	0.04	2.14	0.1731	1.20
pH	2.00	0.07	0.03	1.97	0.1958	1.10
Error	9.00	0.15	0.0167			2.51
Total	17.00	6.00				100.00

Gráfica de efectos principales para Relaciones SN
Medias de datos



Señal a ruido: Más pequeño es mejor

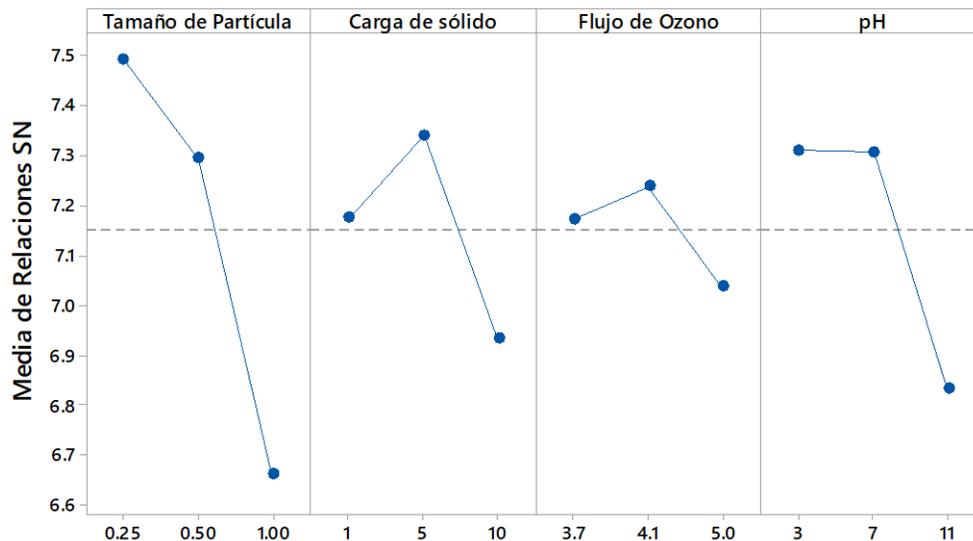
Anexo

30. Valores de la relación S/N para cada uno de los factores utilizados con el pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoñuble.

Anexo 31. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Varianza	Radio de Varianza	p-Value	Contribución/ (%)
T. Partícula	2.00	0.45	0.22	6.63	0.0170	5.64
C.Sólido	2.00	5.08	2.54	74.99	0.0000	63.74
Flujo Ozono	2.00	0.09	0.04	1.29	0.3219	1.10
pH	2.00	2.05	1.02	30.24	0.0001	25.70
Error	9.00	0.30	0.03			3.82
Total	17.00	7.97				100.00

Gráfica de efectos principales para Relaciones SN
Medias de datos



Señal a ruido: Más grande es mejor

Anexo 32. Valores de la relación S/N para cada uno de los factores utilizados con el pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.

Anexo 33. Resultados del ANOVA aplicado a los datos del pretratamiento de ozonólisis para la variable de respuesta de lignina insoluble.

Factor	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Varianza	Radio de Varianza	p-Value	Contribución/ (%)
T. Partícula	2.00	0.155	0.077	37.066	0.0000	54.4
C.Sólido	2.00	0.038	0.019	9.119	0.0069	13.4
Flujo Ozono	2.00	0.009	0.005	2.181	0.1689	3.2
pH	2.00	0.064	0.032	15.296	0.0013	22.4
Error	9.00	0.019	0.002			6.6
Total	17.00	0.285				100.0

Regresión factorial: Velocidad vs. pH, M.Inoculación, M.Cultivo

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0.046087	0.006584	428.41	0.000
Lineal	3	0.044607	0.014869	967.52	0.000
pH	1	0.000390	0.000390	25.38	0.001
M.Inoculación	1	0.000779	0.000779	50.71	0.000
M.Cultivo	1	0.043438	0.043438	2826.48	0.000
Interacciones de 2 términos	3	0.001385	0.000462	30.04	0.000
pH*M.Inoculación	1	0.000102	0.000102	6.62	0.033
pH*M.Cultivo	1	0.001231	0.001231	80.09	0.000
M.Inoculación*M.Cultivo	1	0.000053	0.000053	3.42	0.102
Interacciones de 3 términos	1	0.000095	0.000095	6.19	0.038
pH*M.Inoculación*M.Cultivo	1	0.000095	0.000095	6.19	0.038
Error	8	0.000123	0.000015		
Total	15	0.046210			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0039202	99.73%	99.50%	98.94%

Coeficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		0.317854	0.000980	324.32	0.000	
pH	0.009875	0.004938	0.000980	5.04	0.001	1.00
M.Inoculación	0.013958	0.006979	0.000980	7.12	0.000	1.00
M.Cultivo	0.104208	0.052104	0.000980	53.16	0.000	1.00
pH*M.Inoculación	-0.005042	-0.002521	0.000980	-2.57	0.033	1.00
pH*M.Cultivo	0.017542	0.008771	0.000980	8.95	0.000	1.00
M.Inoculación*M.Cultivo	0.003625	0.001813	0.000980	1.85	0.102	1.00
pH*M.Inoculación*M.Cultivo	-0.004875	-0.002437	0.000980	-2.49	0.038	1.00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{Velocidad} = & 0.2537 + 0.00988 \text{ pH} + 0.0398 \text{ M.Inoculación} - 0.0619 \text{ M.Cultivo} \\ & - 0.00504 \text{ pH*M.Inoculación} + 0.01754 \text{ pH*M.Cultivo} \\ & + 0.0335 \text{ M.Inoculación*M.Cultivo} - 0.00487 \text{ pH*M.Inoculación*M.Cultivo} \end{aligned}$$

Anexo 34. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el análisis del factorial de las velocidades de crecimiento bacteriano.

ANOVA de un solo factor: Azúcares fermentables vs. Carga de sólido Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
	<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.</i>

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Carga de sólido	3	15, 45, 60

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Carga de sólido	2	0.09871	0.049356	7.62	0.023
Error	6	0.03887	0.006478		
Total	8	0.13758			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0804849	71.75%	62.33%	36.44%

Medias

Carga de sólido	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
15	3	0.8902	0.0361	(0.7765, 1.0039)
45	3	1.0484	0.1260	(0.9347, 1.1621)
60	3	0.7944	0.0474	(0.6807, 0.9081)

Desv.Est. agrupada = 0.0804849

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Carga de sólido	N	Media	Agrupación
45	3	1.0484	A
15	3	0.8902	A B
60	3	0.7944	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 35. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el ANOVA de los azúcares fermentables obtenidos con el microorganismo.

ANOVA de un solo factor: Lignina soluble vs. Carga de sólidos Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
	<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.</i>

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Carga de sólidos	3	15, 45, 60

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Carga de sólidos	2	0.09088	0.045440	13.44	0.006
Error	6	0.02029	0.003381		
Total	8	0.11117			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0581467	81.75%	75.67%	58.94%

Medias

Carga de sólidos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
15	3	2.2252	0.0251	(2.1430, 2.3073)
45	3	2.3407	0.0955	(2.2586, 2.4229)
60	3	2.0947	0.0200	(2.0126, 2.1769)

Desv.Est. agrupada = 0.0581467

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Carga de sólidos	N	Media	Agrupación
45	3	2.3407	A
15	3	2.2252	A B
60	3	2.0947	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 36. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el ANOVA de lignina soluble obtenidos con el microorganismo.

ANOVA de un solo factor: Lignina insoluble vs. Carga de sólidos Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
	<i>Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.</i>

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Carga de sólidos	3	15, 45, 60

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Carga de sólidos	2	0.5849	0.29246	16.28	0.004
Error	6	0.1078	0.01797		
Total	8	0.6927			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.134037	84.44%	79.25%	64.99%

Medias

Carga de sólidos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
15	3	8.466	0.186	(8.277, 8.656)
45	3	8.1709	0.0667	(7.9816, 8.3603)
60	3	8.7951	0.1221	(8.6057, 8.9844)

Desv.Est. agrupada = 0.134037

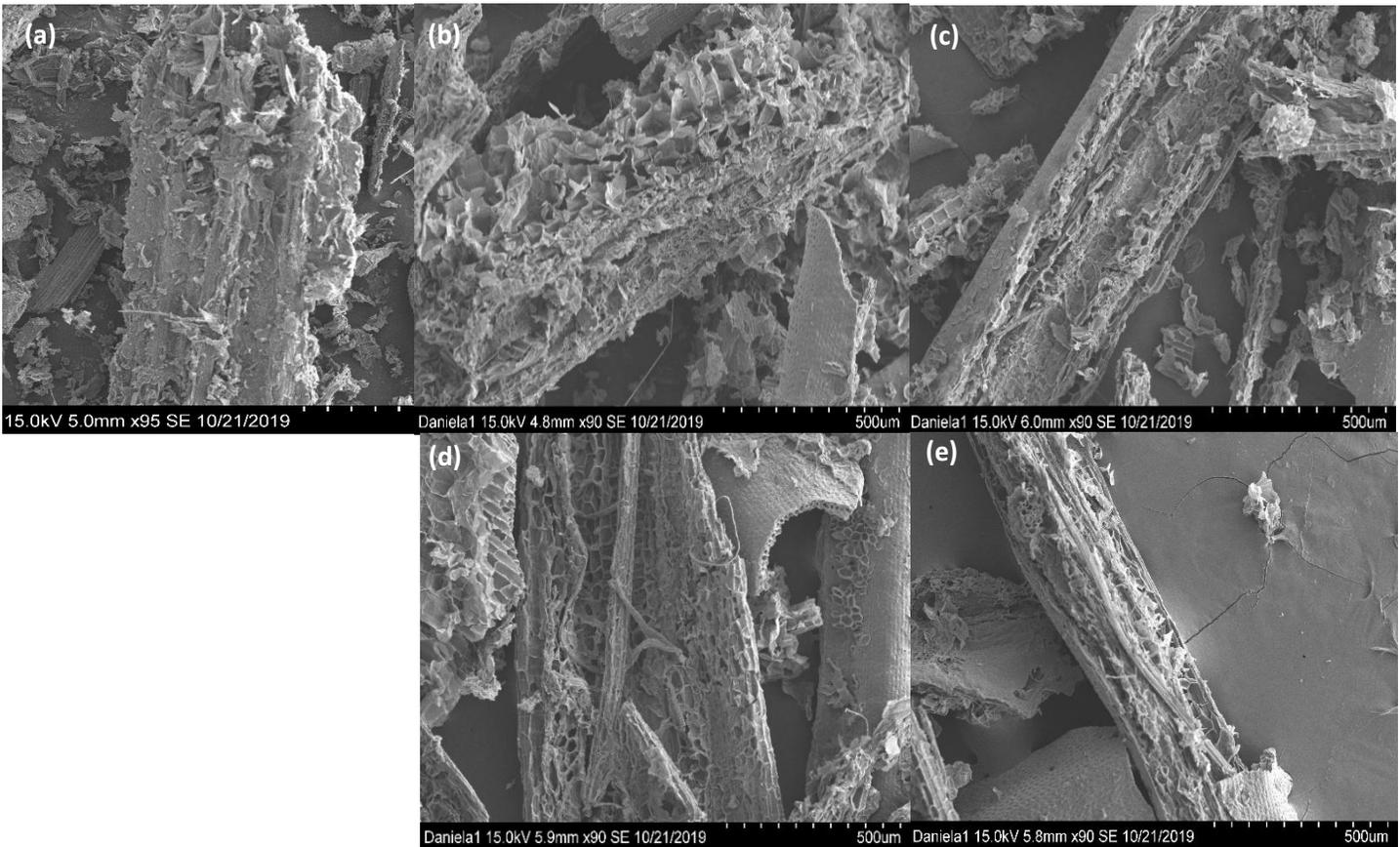
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

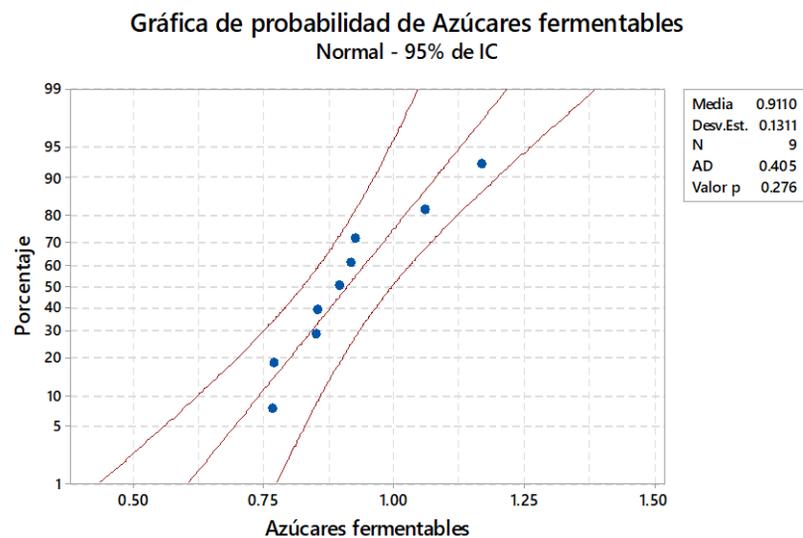
Carga de sólidos	N	Media	Agrupación
60	3	8.7951	A
15	3	8.466	A B
45	3	8.1709	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

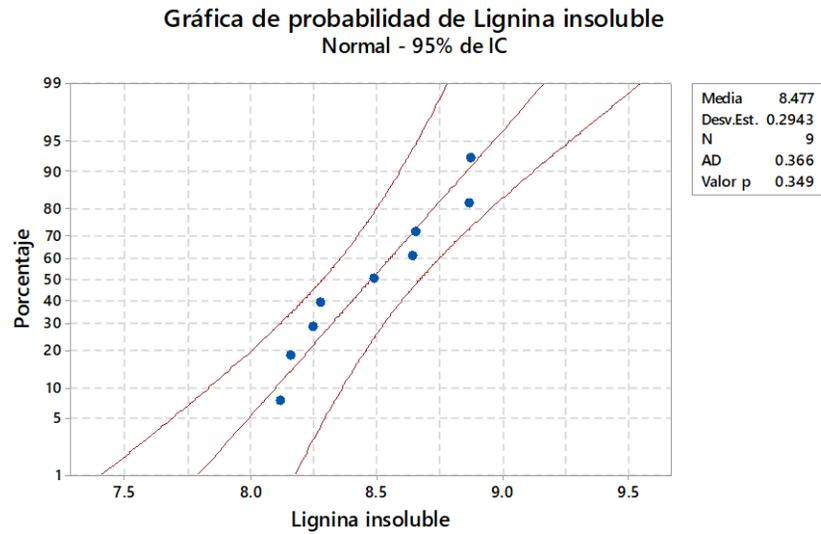
Anexo 37. Datos proporcionados por Minitab® 17 Statical Software versión estudiante para el ANOVA de lignina insoluble obtenidos con el microorganismo.



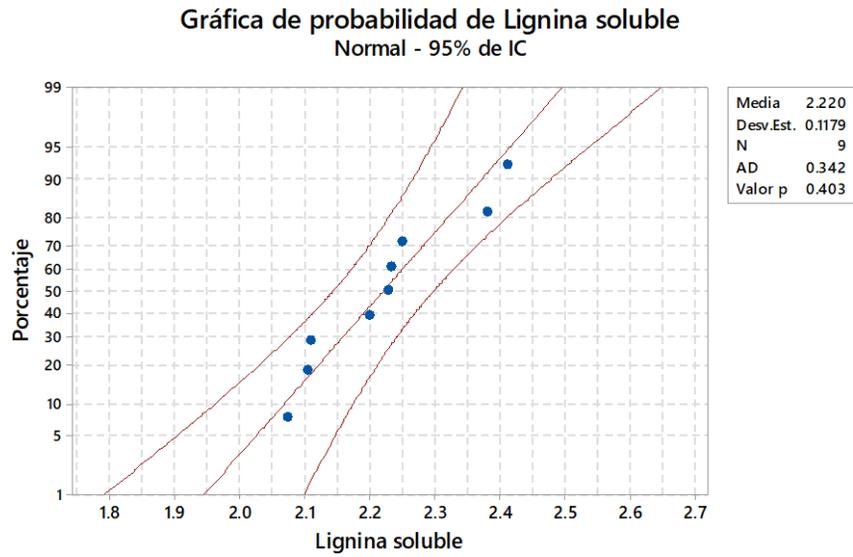
Anexo 38. Cambios morfológicos de la hoja de rastrojo. (a) Sin pretratar. (b) Ozonólisis a pH 3. (c) Ozonólisis a pH 11.(d) Ozonólisis a pH 3-*P.putida*. (e) Ozonólisis a pH 11-*P.putida*.



Anexo 39. Prueba Anderson-Darling para la variable de azúcares fermentables.



Anexo 40. Prueba Anderson-Darling para la variable de lignina insoluble.



Anexo 41. Prueba Anderson-Darling para la variable de lignina soluble.

POLYMATH Report

Nonlinear Regression (L-M)

Model: $C = c*(1-\exp(-k*t))$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
c	2.395	2.395185	7.409E-05
k	0.0316	0.0316076	1.433E-06

Nonlinear regression settings

Max # iterations = 64

Precision

R ²	0.9772842
R ² adj	0.9716052
Rmsd	0.0296304
Variance	0.0079016

General

Sample size	6
Model vars	2
Indep vars	1
Iterations	4

Source data points and calculated data points

	t	C	C calc	Delta C
1	0	0	0	0
2	10	0.737889796	0.649085	0.0888048
3	15	0.931955087	0.9043344	0.0276207
4	20	1.015320441	1.122271	-0.1069503
5	25	1.242177556	1.308349	-0.0661711
6	30	1.551726173	1.467225	0.084501

Anexo 42. Ajuste al modelo de la concentración de azúcares al realizar la ozonólisis a pH 3.

POLYMATH Report

Nonlinear Regression (L-M)

Model: $C = c*(1-\exp(-k*t))$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
c	2.561212	2.561212	0.812757
k	0.03726	0.037268	0.0185183

Nonlinear regression settings

Max # iterations = 64

Precision

R ²	0.9955394
R ² adj	0.9944243
Rmsd	0.0155356
Variance	0.0021722

General

Sample size	6
Model vars	2
Indep vars	1
Iterations	3

Source data points and calculated data points

	t	C	C calc	Delta C
1	0	0	0	0
2	10	0.811858559	0.7968306	0.0150279
3	15	1.118406758	1.096791	0.0216157
4	20	1.339681554	1.345756	-0.006074
5	25	1.478753251	1.552394	-0.0736407
6	30	1.774259132	1.723902	0.0503572

Anexo 43. Ajuste al modelo de la concentración de azúcares al realizar la ozonólisis a pH 11.