

INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

## **Aprovechamiento de bagazo de *Agave tequilana* Weber para la producción de bio-hidrógeno**

Tesis que presenta

**Jacobo Salomon Abreu Sherrer**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Ambientales**

Director de la Tesis:

**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2013



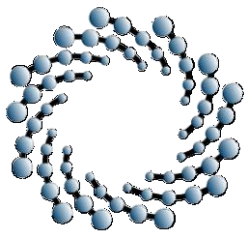
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Jacobo Salomón Abreu Sherrer** y aprobada el **seis de septiembre del dos mil trece** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**  
Director de la tesis

**Dr. Elías Razo Flores**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta**  
Miembro del Comité Tutorial



**IPICYT**

## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Felipe Alatríste Mondragón

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-260993) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Con el apoyo de una Beca Mixta CONACYT, el autor realizó una estancia en el Laboratorio de Bio-procesos del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 006 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de septiembre del año 2013, se reunió a las 09:15 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta</b>	<b>Secretario</b>	<b>UdeG</b>
<b>Dr. Felipe Alatraste Mondragón</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gustavo Dávila Vázquez</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>CIATEJ</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Jacobo Salomón Abreu Sherrer**

sobre la Tesis intitulada:

*Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**

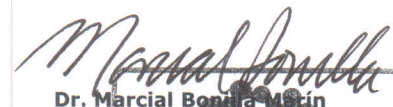
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 11:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de septiembre de 2013.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla León**  
Secretario Académico



*Dedicado a mi padre y madre,  
mis hermanas, sobrinos  
y compañeros de generación.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi asesor Dr. Felipe Alatríste Mondragón por compartir su experiencia y entrega en la realización del presente trabajo.

Agradezco el apoyo técnico en la realización de este trabajo a la I.Q. María del Carmen Rocha Medina, M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez, M. en C. Guillermo Vídriales Escobar y M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz.

Agradezco la asesoría del Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta en la automatización, control y operación del reactor durante el tiempo de estancia realizada en la Universidad de Guadalajara.

## Contenido

Constancia de aprobación de la tesis .....	ii
Créditos Institucionales .....	iii
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de tablas.....	x
Lista de Figuras .....	xi
I. Introducción.....	1
II. Marco teórico. ....	6
II.1. Estructura de los materiales lignocelulósicos. ....	6
II.1.1. Lignina.....	6
II.1.2. Hemicelulosa.....	10
II.1.3. Celulosa.....	12
II.2. Pre-tratamientos del material lignocelulósico.....	13
II.2.1. Pre-tratamientos físicos. ....	14
II.2.2. Pre-tratamientos fisicoquímicos.....	14
II.2.3. Pre-tratamientos químicos.....	17
II.2.4. Hidrólisis enzimática. ....	20
II.3. Metabolismo del proceso de fermentación para la producción de bio- hidrógeno. ....	23
II.4. Cinética de producción de bio-hidrógeno. ....	27
III. Antecedentes.....	31
III.1. Bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber, como material lignocelulósico para la generación de bio-combustible.....	31
III.2. Hidrolizados de bagazo de agave. ....	33
III.3. Producción de bio-combustibles a partir de residuos de <i>Agave tequilana</i> Weber.....	36
IV. Justificación.....	38
V. Hipótesis.....	38
VI. Objetivos.....	38
VI.1. Objetivo general.....	38

VI.2. Objetivos específicos. ....	38
VII. Materiales y Métodos. ....	39
VII.1. Bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber. ....	39
VII.2. Pre-tratamientos químicos y tratamientos enzimáticos. ....	39
VII.2.1. Pre-tratamiento ácido. ....	39
VII.2.2. Pre-tratamientos alcalinos combinados con agentes oxidantes. ....	39
VII.2.3. Pre-tratamientos independientes de álcalis y agentes oxidantes. ....	40
VII.2.4. Pre-tratamientos con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	40
VII.2.5. Pre-tratamientos con activación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	40
VII.2.6. Tratamientos enzimáticos. ....	41
VII.3. Determinación de actividad enzimática. ....	41
VII.4. Estrategia experimental. ....	42
VII.5. Prueba estadística Kruskal-Wallis. ....	44
VII.6. Cinéticas de producción de bio-hidrógeno. ....	45
VII. 6.1. Inoculo. ....	45
VII.6.2. Ensayos en lote para la producción de bio-hidrógeno. ....	45
VII.6.3. Ensayos en lote para la producción de bio-hidrógeno de controles para los hidrolizados enzimáticos. ....	46
VII.6.4. Cuantificación de gas. ....	46
VII.6.5. Análisis de la cinética de producción. ....	46
VII.6.6. Balance de electrones equivalentes. ....	47
VII.7. Producción de bio-hidrógeno en un reactor CSTR. ....	48
VII.7.1. Condiciones de operación. ....	48
VII.7.2. Estrategia experimental. ....	50
VII.7.3. Alimentación del reactor. ....	50
VII.8. Métodos analíticos. ....	51
VII.8.1. Determinación de azúcares reductores (AR), totales (AT) y demanda química de oxígeno (DQO). ....	51
VII.8.2. Determinación de hemicelulosa, celulosa y lignina. ....	51
VII.8.3. Determinación de furfurales y fenoles. ....	52
VII.8.4. Determinación de composición de gas. ....	52
VII.8.5. Determinación de ácidos grasos volátiles (AGVs). ....	52
VIII. Resultados y discusión. ....	53
VIII.1 Composición del bagazo. ....	53



VIII.2. Pre-tratamientos.....	53
VIII.2.1. Experimento 1: Pre-tratamiento secuencial ácido-alcalino-enzimático.	53
VIII.2.2. Experimento 2: Pre-tratamientos con álcalis y agentes oxidantes individuales para remoción de lignina. ....	55
VIII.2.3. Experimento 3: Pre-tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de bagazo con y sin hidrólisis ácida. ....	56
VIII.2.4. Experimento 4: Efecto de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la pérdida de hemicelulosa y celulosa. ....	58
VIII.2.5. Experimento 5: Remoción enzimática de hemicelulosa empleando la mezcla comercial Viscozyme.....	60
VIII.2.6. Experimento 6: Incremento de la remoción de lignina por medio de la activación del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con molibdato. ....	62
VIII.2.7. Experimento 7: Hidrólisis enzimática con la mezcla comercial Viscozyme de bagazo pre-tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /molibdato. ....	64
VIII.2.9. Experimento 9: Hidrólisis enzimática con la mezcla comercial Celluclast de bagazo sin y con pre-tratamiento secuencial (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /molibdato-HCl).....	70
VIII.3. Pruebas de producción de bio-hidrógeno.....	71
VIII.3.1. Cinética de producción. ....	71
VIII.3.2. Productos metabólicos. ....	76
VIII.3.3. Balance de electrones equivalentes a partir de la demanda química de oxígeno (DQO). ....	77
VIII.4. Producción de bio-hidrógeno en un reactor CSTR. ....	80
VIII.4.1. Etapa de arranque. ....	81
VIII.4.2. Etapa de evaluación. ....	82
IX. Conclusiones.....	89
X. Perspectivas. ....	90
XI. Bibliografía. ....	92

## Lista de tablas

	Pagina
<b>Tabla I.1.</b> Composición de diferentes especies de agave y fracciones anatómicas reportados en la literatura (% peso húmedo)	5
<b>Tabla III.1.</b> Balance de masa del bagazo de agave en composición seca (%).	33
<b>Tablas III.2.</b> Tratamientos propuestos para residuos de <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave atrovirens</i> .	35
<b>Tablas III.3.</b> Investigaciones del aprovechamiento de residuos de la industria del tequila para generación de gas y bio-hidrógeno	37
<b>Tabla VII.1.</b> Características del Celluclast y Viscozyme.	41
<b>Tabla VII.2a.</b> Estrategia experimental por etapas de pre-tratamientos y tratamientos de bagazo.	42
<b>Tabla VII.2b.</b> Clave de identificación de pre-tratamientos y tratamientos para bagazo de agave.	43
<b>Tabla VII.3.</b> Estequiometrías para el balance de electrones equivalentes.	47
<b>Tabla VII.4.</b> Estrategia experimental de operación del reactor CSTR.	50
<b>Tabla VIII.1.</b> Resultados del modelo de Gompertz para hidrolizados con Viscozyme y Celluclast.	76
<b>Tabla VIII.2.</b> Metabolitos producidos durante la producción de bio-hidrógeno a partir del hidrolizado enzimático durante los ensayos en lote.	76

## Lista de Figuras

	Pagina
<b>Figura II.1.</b> Estructura de los materiales lignocelulósicos.	7
<b>Figura II.2.</b> Composición de la lignina.	9
<b>Figura II.3.</b> Composición de la hemicelulosa.	11
<b>Figura II.4.</b> Estructura de la celulosa.	12
<b>Figura II.5.</b> Saponificación de carbohidratos con álcalis	18
<b>Figura II.6.</b> Formación de inhibidores en los pre-tratamientos ácidos, para los procesos fermentativos.	20
<b>Figura II.7.</b> Mecanismo propuesto de amorfogénesis/despolimerización de celulosa realizada por celulasas	22
<b>Figura II.8.</b> Ruta metabólica de producción de bio-hidrógeno a partir de glucosa por <i>Clostridium butyricum</i> bajo condiciones anaerobias.	25
<b>Figura II.9.</b> Ruta metabólica de producción de bio-hidrógeno a partir de glucosa por <i>Klebsiella pneumoniae</i> bajo condiciones facultativas.	26
<b>Figura II.10.</b> Ecuación ajustada de Gompertz.	28
<b>Figura II.11.</b> Ecuación ajustada de Gompertz para la producción de bio-hidrógeno	30
<b>Figura III.1</b> Valores y niveles de producción de <i>Agave tequilana Weber</i> en México 1995–2008	31
<b>Figura III.2.</b> Áreas plantadas de <i>Agave tequilana Weber</i> , mezcal feedstocks y henequén en cientos de hectáreas de 1995–2008.	32
<b>Figura VII.1.</b> Diagrama del proceso en CSTR.	49
<b>Figura VIII.1.</b> Porcentajes de remoción de fibras en pre-tratamiento ácido y alcalinos/oxidantes	54
<b>Figura VIII.2.</b> Porcentajes de remoción de fibras en pre-tratamientos con álcalis y oxidantes individuales.	55
<b>Figura VIII.3.</b> Prueba estadística para comparar la producción de azúcares entre tratamientos T7 y T8.	57
<b>Figura VIII.4.</b> Porcentaje de remoción de fibras en tratamientos con diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	58
<b>Figura VIII.5.</b> Porcentaje de remoción de fibras sobre bagazo pre-tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la hidrólisis enzimática.	59
<b>Figura VIII.6.</b> Efecto de dos tipos de preparaciones enzimáticas (Celluclast y Viscozyme) sobre la remoción de fibras de bagazo pre-tratado con 0.1 % (w/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	61
<b>Figura VIII.7.</b> Concentración de azúcares producidos durante los tratamientos enzimáticos (Celluclast y Viscozyme) del bagazo pre-tratado con 0.1 % (w/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	62

<b>Figura VIII.8.</b> Porcentaje de remoción de fibras durante el pre-tratamiento del bagazo de agave con $H_2O_2$ y $H_2O_2/NaMoO_4$ .	63
<b>Figura VIII.9.</b> Porcentaje de remoción enzimática de fibras del bagazo pre-tratado con $H_2O_2$ y con $H_2O_2/molibdato$ .	65
<b>Figura VIII.10.</b> Concentración de azúcares producidos durante la hidrólisis enzimática del bagazo pre-tratado con $H_2O_2$ o con $H_2O_2/molibdato$ .	66
<b>Figura VIII.11.</b> Porcentaje de remoción de fibras durante el pre-tratamiento del bagazo de agave con $H_2O_2/NaMoO_4$ seguido de HCl.	67
<b>Figura VIII.12.</b> Porcentaje de remoción enzimática de fibras del bagazo de agave pre-tratadas con $H_2O_2/NaMoO_4$ seguido de HCl.	69
<b>Figura VIII.13.</b> Concentración de azúcares de los pre-tratamientos con $H_2O_2/NaMoO_4$ y con HCl y las hidrólisis enzimáticas subsecuentes.	69
<b>Figura VIII.14.</b> Comparación de la concentración de azúcares obtenidas durante la hidrólisis enzimática con Celluclast y Viscozyme, utilizando material sin pre-tratamiento (T/15C y T16V) y con pre-tratamiento con $H_2O_2/Mo$ seguido de HCl (T14/C).	71
<b>Figura VIII.15.</b> Cinética de producción de bio-hidrógeno a partir de los hidrolizados enzimáticos obtenidos con Celluclast.	73
<b>Figura VIII.16.</b> Cinética de producción de bio-hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con Viscozyme.	74
<b>Figura VIII.17.</b> Balance de electrones equivalentes en la cinética de producción de bio-hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos.	79
<b>Figura VIII.18.</b> Producción de gas en los experimentos en CSTR a partir de hidrolizados enzimáticos	81
<b>Figura VIII.19.</b> Concentración residual del sustrato en los experimentos en CSTR.	82
<b>Figura VIII.20.</b> Composición de gas en los experimentos en CSTR	84
<b>Figura VIII.21.</b> Velocidades de producción de bio-hidrógeno en el reactor. <b>VVPH:</b> Velocidad de producción de bio-hidrógeno	85
<b>Figura VIII.22.</b> Rendimiento molar de producción de bio-hidrógeno en el reactor. <b>RMH:</b> Rendimiento molar de producción de bio-hidrógeno.	85
<b>Figura VIII.23.</b> Concentración de metabolitos producidos en el reactor.	87
<b>Figura VIII.24.</b> Formación de biomasa y gránulos en el reactor.	88

## Resumen

### **Aprovechamiento de bagazo de *Agave tequilana* Weber para la producción de bio-hidrógeno.**

Se investigaron dos tratamientos enzimáticos (mezclas comerciales Celluclast y Viscozyme de Novozyme) para sacarificar los polisacáridos presentes en el bagazo de *Agave tequilana* cocido, con pre-tratamiento fisicoquímico o sin él. Se obtuvieron concentraciones más altas de azúcares fermentables en las hidrólisis enzimáticas a partir de bagazo sin pre-tratamiento. En ensayos en lote, se obtuvieron rendimientos molares de producción de bio-hidrógeno (RMH) máximos a partir de los hidrolizados con Celluclast (1.31 moles H<sub>2</sub>/mol sustrato) y velocidades de producción de bio-hidrógeno (VVPH) máximas con Viscozyme (142.48 ml H<sub>2</sub>/L-h). La fermentación del agente estabilizante (sorbitol o sacarosa) presente en las preparaciones enzimáticas contribuyó a la producción de bio-hidrógeno. En el caso de los hidrolizados de Celluclast, la contribución máxima fue de 46.9% mientras que para los hidrolizados de Viscozyme fue de 80%. Por último, se alimentó un reactor completamente agitado (CSTR) en continuo con hidrolizado enzimático (Celluclast) a partir de bagazo sin pre-tratamiento. En la etapa de arranque, los tiempos de retención hidráulica (TRH) de 6 a 24 horas permitieron una apropiada selección de los microorganismos acidogénicos, ya que no se detectó metano en el gas durante el tiempo de operación. En la etapa de evaluación, se obtuvieron RMHs de 0.76 y 0.74 mol H<sub>2</sub>/mol sustrato y VVPHs de 72.55 y 49.56 ml H<sub>2</sub>/l-h, para TRH de 12 y 24 horas respectivamente. Comparando los intervalos de producción de bio-hidrógeno, reportados en la literatura para otros hidrolizados lignocelulósicos (0.38-1.70 mol H<sub>2</sub>/mol de azúcares; 4.6-81.4 ml H<sub>2</sub>/l-h), se puede observar que el hidrolizado enzimático obtenido del bagazo sin pre-tratamiento es un sustrato adecuado para producir bio-hidrógeno. Los valores de rendimientos y tasas de producción encontrados en este trabajo son semejantes a los ya reportados, pero son bajos comparados con sustratos modelo (1.03-2.79 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa; 170-1270 ml H<sub>2</sub>/l-h).

**Palabras claves:** Bio-hidrógeno, material lignocelulósico, sacarificación, hidrólisis enzimática, ensayos en lote, tiempo de retención hidráulica.

## **Use of *Agave tequilana* Weber bagasse to produce bio-hydrogen.**

Two enzymatic treatments were tested (commercial mixtures Viscozyme and Celluclast from Novozymes) for saccharification of the polysaccharides present in cooked untreated and pretreated bagasse of *Agave tequilana* Weber. The highest concentrations of fermentable sugars were obtained from the enzymatic hydrolysis of untreated bagasse. In batch tests, the enzymatic hydrolysates of untreated bagasse showed the best molar yield (HMY) with Celluclast (1.31 moles H<sub>2</sub>/mol substrate) and the best volumetric hydrogen production rate (VHPR) with Viscozyme (142.48 ml H<sub>2</sub>/L-h). The fermentation of stabilizing agents (sorbitol or sucrose) present in the enzyme preparations contributed to bio-hydrogen production. The maximum contribution of these stabilizing agents was 46.9% for the hydrolyzates obtained with Celluclast (sorbitol) and 80% for the hydrolyzates obtained with Viscozyme (sucrose). Finally a completed stirred reactor (CSTR) was fed with enzymatic hydrolyzate (Celluclast) from untreated bagasse. In the starting stage, the hydraulic retention times (HRT) of 6 to 24 hours enabled an adequate selection of acidogenic microorganisms, because no methane was detected in the biogas during the operation time. In the evaluation stage, a HMY of 0.76 and 0.74 moles H<sub>2</sub>/mol substrate and VHPR of 72.55 and 49.56 ml H<sub>2</sub>/L-h for HRT of 12 and 24 hours respectively were observed. Comparison of HMY and VHPR obtained in this study with the HMY and VHPR values reported in the literature, for other lignocellulosic hydrolysates (0.38-1.70 mol H<sub>2</sub>/mol sugars; 4.6-81.4 ml H<sub>2</sub>/L-h), indicates that the enzymatic hydrolyzate of untreated bagasse is a suitable substrate for hydrogen production. The yields and rates of hydrogen found in this work are similar with those reported in the literature, but are lower than those found for model substrates (1.03-2.79 mol H<sub>2</sub>/mol glucose; 170-1270 ml H<sub>2</sub>/L-h).

**KEY WORDS:** biohydrogen, lignocellulosic raw, saccharification, enzymatic hydrolysis, batch tests, hydraulic retention time.

## I. Introducción.

Las crisis energética y ambiental son dos temas importantes para el desarrollo sustentable de las naciones. En los últimos años se ha aceptado que la dependencia del 80% de consumo de combustibles fósiles contribuyen al cambio climático global y agotamiento de sus fuentes naturales (Xin *et al.*, 2010). Debido a lo anterior se están investigando otras fuentes de energías alternativas, entre las que se encuentra el bio-hidrógeno, el cual es un bio-combustible limpio y renovable. Sin embargo, existen dudas tanto sobre la rentabilidad en los procesos de producción, como sobre los impactos ambientales asociados a la obtención de los sustratos necesarios para su producción y si realmente es una energía limpia. Debido a lo anterior, existe un gran interés en investigar su producción por medio de procesos biotecnológicos, empleando residuos de materiales lignocelulósicos o aguas residuales. Lo anterior con el objetivo de minimizar los costos de producción y solucionar los problemas ambientales asociados al manejo de dichos residuos.

Los estudios sobre la producción biológica de bio-hidrógeno se han enfocado en procesos de bio-catálisis utilizando algas y cianobacterias, fotodescomposición de compuestos orgánicos por medio de bacterias fotosintéticas y fermentación a partir de compuestos orgánicos por medio de procesos anaerobios (Nanqi *et al.*, 2009). Aunque la producción de bio-hidrógeno por fotosíntesis es un proceso teóricamente perfecto, presenta algunas dificultades en la práctica, principalmente en el diseño de los reactores y la baja eficiencia de utilización de la luz. Por otra parte, entre los procesos biotecnológicos para producir bio-hidrógeno, la fermentación oscura anaerobia es la más favorable, porque se puede obtener bio-hidrógeno con mejores velocidades y tasas de rendimiento a bajo costo, a partir de cualquier tipo de residuo orgánico que sea rico en carbohidratos.

Los sustratos que se han empleado para la producción biológica de bio-hidrógeno y otros bio-combustibles incluyen polisacáridos obtenidos a partir de cultivos dedicados a la producción de combustibles (maíz y caña de azúcar por

ejemplo). A los bio-combustibles obtenidos a partir de estos materiales se les ha llamado bio-combustibles de primera generación. Otra fuente de polisacáridos son los materiales lignocelulósicos, los cuales son una fuente natural de materia prima que puede obtenerse de pastos, arbustos, residuos agrícolas y maderas. Los bio-combustibles obtenidos de este tipo de biomasa se denominan bio-combustibles de segunda generación.

Con referencia a lo anterior, en los últimos años numerosos países, industrializados y en desarrollo, implementaron objetivos y políticas para promover el desarrollo de la industria de bio-combustibles. Los países industrializados, tienen como objetivo promover el desarrollo de sus sectores agrícolas, sumando algunos objetivos de mitigación de gases efecto invernadero. En cambio los países en desarrollo, incluyendo a los de América Latina y el Caribe (ALC), visualizan a los bio-combustibles como una forma de abordar de forma más amplia objetivos de política pública, que incluyen desde temas de seguridad energética hasta mejoras en el resultado de la balanza de pagos, pasando por el desarrollo rural, la promoción de exportaciones y el cumplimiento de objetivos ambientales (Dufey y Stange, 2010). Pero el rápido crecimiento del mercado de los bio-combustibles no ha estado ausente de controversias y debates en diversos ámbitos, principalmente los relacionados con la existencia de efectos que contribuyan al cambio climático durante la producción de bio-combustibles utilizando cultivos ricos en azúcares, como por ejemplo: caña, sorgo, maíz y trigo, los cuales están asociados a impactos locales, tanto ambientales como sociales, vinculados a la producción agrícola a gran escala. Además hay que adicionar los impactos de la producción de bio-combustibles sobre la seguridad alimentaria.

Actualmente se cree que los bio-combustibles reducirán las emisiones de gases de efecto invernadero, lo cual ha ayudado a promover un gran interés por estos. Sin embargo en los análisis de ciclos de vida, las emisiones de gases de efecto invernadero que son producidos en el transporte y refinamiento de cereales y vegetales para obtener etanol o biodiesel de primera generación, substancialmente exceden las emisiones originadas de la extracción y



refinamiento del petróleo crudo y diesel (Smith y Searchinger, 2012). Aunque la producción y consumo de los bio-combustibles de primera generación reducen parcialmente las emisiones de CO<sub>2</sub> comparado con los combustible fósiles, estas emisiones podrían disminuirse aun más si la generación de bio-combustibles se realizara a partir de biomasa lignocelulósica.

Por consiguiente, el objetivo de los gobiernos para alcanzar la meta de sustituir los combustibles fósiles por bio-combustibles de primera generación para el transporte, está limitada por el crecimiento económico, la mitigación del cambio climático, el uso de tierra y agua para la producción de fibras y alimentos, y altos costos de producción. Debido a lo anterior los procesos de producción de bio-combustibles de primera generación regularmente requieren subsidios de los gobiernos para competir con los productos del petróleo. Diversos organismos gubernamentales están de acuerdo en que los bio-combustibles de primera generación contribuyen a incrementar los precios de productos básicos (commodity price) y derivados para fabricación de alimentos. Además estos cultivos especializados para producción de bio-combustibles están establecidos en zonas que compiten con los cultivos para producción de fibras y alimentos. Los impactos acumulativos de los bio-combustibles de primera generación han estimulado el interés en desarrollar los bio-combustibles de segunda generación que incluyen subproductos (paja de cereales, bagazos y residuos forestales), desechos orgánicos (residuos sólidos municipales) y materias primas (pastos y otros cultivos especializados) (Sims *et al.*, 2010).

Todo lo anterior ha llevado a invertir importantes esfuerzos de investigación y desarrollo de nuevos procesos y materias primarias. Estos incluyen la producción de bio-combustibles a partir de residuos lignocelulósicos, lo cual ha llevado a un desarrollo tecnológico que permite utilizar casi cualquier tipo de biomasa como materia prima, incluyendo productos forestales, desechos de aserraderos, residuos de cosechas, pastizales, macro-algas, desechos domésticos e industriales.

En particular los residuos lignocelulósicos son considerados como una fuente de materia prima muy adecuado. La producción anual de materiales lignocelulósicos se estima que exceden 220 mil millones de toneladas en todo el mundo, equivalentes a 60-80 mil millones de toneladas de petróleo crudo. Por lo tanto, los materiales lignocelulósicos por su abundancia y bajos costos son atractivos para producir bio-hidrógeno (Nanqi *et al.*, 2009). Sin embargo, estos materiales necesitan de pre-tratamientos y/o tratamientos enzimáticos para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa, obteniendo de esta manera monosacáridos u otros compuestos de menor peso molecular antes del proceso de fermentación anaerobia. Sin embargo, en los procesos de hidrólisis ácida se producen furfurales y compuestos fenólicos, que pueden presentar efectos negativos sobre la función de la membrana celular, crecimiento y glicolisis sobre levaduras y bacterias (Guan *et al.*, 2010). La formación de estos compuestos inhibitorios, es un factor limitante sobre la factibilidad biotecnológica para la producción de bio-hidrógeno a partir de materiales lignocelulósicos, por lo que su remoción es importante para mejorar la eficiencia de fermentación. La selección del método de destoxificación dependerá del origen del hidrolizado y los tipos de microorganismos que realizaran los procesos de fermentación (Nanqi *et al.*, 2009).

Un residuo lignocelulósico de importancia local y regional en México es el bagazo de agave. El agave es una planta cultivada en las zonas áridas y semi-áridas en México. Es utilizada como materia prima para producir fibras, mezcal, tequila y agua miel. Los cultivos presentan como características importantes un uso eficiente de agua y resistencia a sequías. La composición de diversas especies de agaves (Tabla I.1.) muestran que el contenido de celulosa y hemicelulosa es alto, lo cual indica que tiene alto potencial para su conversión a bio-combustibles (Hongjia *et al.*, 2012). Sin embargo, no está incluido en la lista de materias primarias para la producción de energía (García-Moya *et al.*, 2011).

**Tabla I.1.** Composición de diferentes especies de agave y fracciones anatómicas reportados en la literatura (% peso húmedo).

Especies	Fracción anatómica	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
<i>A. americana</i>	Pencas	68.4	15.7	4.9
<i>A. salmiana</i>	Bagazo	47.3	12.8	10.1
<i>A. tequilana</i>	Bagazo	43	19	15
<i>A. lechuguilla</i>	Pencas	79.8	3-6	15.3
	Pencas	46-48	30	11
<i>A. fourcroides</i>	Pencas	77.6	5-7	13.1

**Fuente:** Hongjia *et al.*, 2012.

El agave azul (*Agave tequilana* Weber) es utilizado en la industria tequilera como materia prima, donde los agaves son cosechados cuando alcanzan una edad media de 5 a 8 años (Valenzuela, 2012). Después de cortar las hojas (jima) la piña se coce y se exprime el jugo. El jugo obtenido es fermentado y destilado. Después que la piña es exprimida se obtiene un residuo lignocelulósico llamado bagazo de *Agave tequilana* Weber (Saucedo-Luna *et al.*, 2011). El bagazo de *Agave tequilana* Weber (Tabla I.1) está compuesto de 43% celulosa, 19% hemicelulosa y 15% lignina, teniendo una apropiada composición para la producción de bio-combustibles (Hongjia *et al.*, 2012). El bagazo es un residuo lignocelulósico que representa 40% del agave procesado y la generación anual de bagazo es aproximadamente 105 000 toneladas. Solamente una pequeña porción es utilizado para preparar compost. De modo que estas particularidades hacen que el bagazo sea atractivo como fuente renovable para producir bio-combustibles y/o productos químicos (Saucedo-Luna *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se evaluó el uso del bagazo de *Agave tequilana* Weber para producir bio-hidrógeno. Se emplearon pre-tratamientos químicos para acondicionar la fibra para el subsecuente tratamiento enzimático y finalmente se evaluaron las condiciones de producción de bio-hidrógeno en reactores anaerobios en lote (batch) y continuo (CSTR por sus siglas en inglés) a partir de hidrolizados obtenidos en los pre-tratamientos y tratamientos enzimáticos.

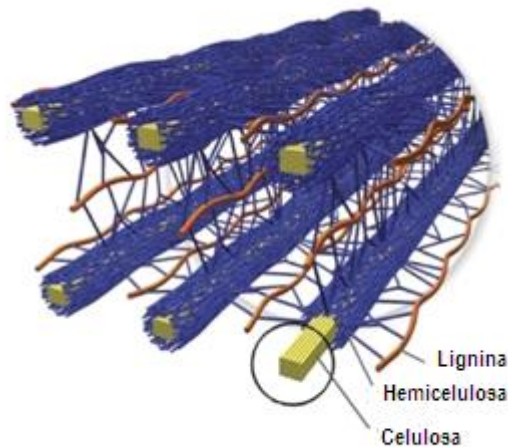
## **II. Marco teórico.**

### **II.1. Estructura de los materiales lignocelulósicos.**

#### **II.1.1. Lignina**

Los materiales lignocelulósicos están compuestos de celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa microfibrilar (formada por cadenas de polímeros ordenadas, estrechamente empaçadas en regiones cristalinas) está incorporada en una matriz de hemicelulosa y lignina (Figura II.1.). La lignina es muy abundante en la naturaleza. Además tiene propiedades para su aplicación industrial, ya que puede reemplazar algunos compuestos obtenidos a partir del petróleo. Desde décadas pasadas, existe un gran interés de reemplazar el fenol por los compuestos obtenidos desde la lignina para la fabricación de resinas. Otra alternativa es el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos para la generación de bio-combustibles o gas. Sin embargo, esto requiere la separación de la celulosa protegida por lignina. En consecuencia se han desarrollado métodos que buscan remover la lignina selectivamente (Smook, 2002; Spear *et al.*, 2002; Swatloski *et al.*, 2003; Koljonen *et al.*, 2004) dejando a la celulosa disponible para su posterior uso para la producción de bio-combustibles. Alternativamente, se están desarrollando investigaciones biotecnológicas dirigidas a modificar plantas con un mayor contenido de celulosa y un menor contenido de lignina, alterando y modificando la estructura de lignina, pero estas estrategias están limitadas por la fisiología vegetal (Doherty, 2011). La lignina es un bio-polímero que se encuentra principalmente en la lámina media y las capas de la pared celular, formando con la hemicelulosa una matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa, constituyendo entre 15 y 40% de la biomasa de algunas especies leñosas. De modo que protege a la celulosa y otros polisacáridos estructurales de ataques biológicos, presentando actividad anti-microbial y anti-fúngica (Doherty, 2011). La lignina está formada por compuestos fenólicos ramificados, entrecruzados y entrelazados con carbohidratos (los enlaces covalentes con los carbohidratos se efectúan a través de los grupos bencil-ésteres, bencil-éteres y fenil-glucosídicos presentes en la

lignina), donde la esterificación principalmente se lleva a cabo con ácidos fenólicos (en pastos con *p*-ácido coumárico y en arbustos con *p*-ácido hidro-benzoico)(Ralph J. *et al.*, 2004).



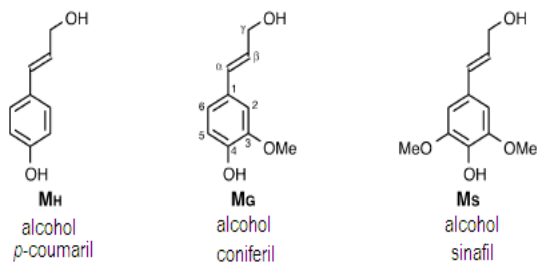
**Figura II.1.** Estructura de los materiales lignocelulósicos (Doherty., 2011).

La lignina tiene una estructura macromolecular formada por monómeros fenil-propanoide entrecruzados (Figura II.2a). La masa molecular típica de la lignina aislada está en un intervalo de 1000-20000 g/mol. Sin embargo el grado de polimerización en la naturaleza es difícil de medir porque es variable durante su extracción y consiste en diferentes tipos de sub-estructuras que se repiten aparentemente al azar. Por consiguiente, la composición química de la lignina (bio-polímero) consiste principalmente en tres tipos de unidades repetidas: cumaril (H), guaiacil (G) y siringil (S). Estas unidades derivan de los denominados monolignoles, los alcoholes *p*-cumárico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinafílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico) que son los precursores de la bio-síntesis de lignina (Ralph J. *et al.*, 2004). Estos monómeros estructurales consisten del mismo esqueleto fenil-propanoide, pero en diferentes grados de sustitución de oxígeno del anillo fenilo (Figura II.2.).

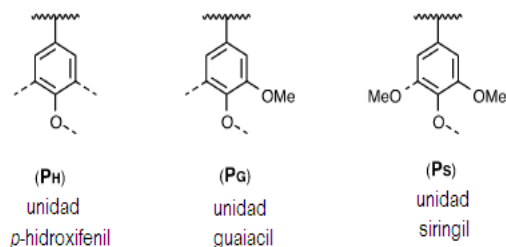
La polimerización de los monómeros de fenil-propanoide es iniciada por una enzima o una combinación aleatoria de oxidasas y/o peroxidasas. La polimerización se efectúa entre radicales libres produciendo una reacción importante de des-hidrogenación enzimática. El grado de posible entrecruzamiento de lignina y rigidez de la estructura dependen del grado de sustitución (Doherty, 2011). Por lo tanto la macromolécula se extiende por reacciones de nuevos monómeros permitiendo el crecimiento del bio-polímero. En el bio-polímero estos monómeros producen unidades de *p*-hidroxifenil, guaiacil y siringil (Figura II.2b). Pero debido a la capacidad de deslocalización de los electrones en los radicales pueden unirse a varios sitios (Figura II.2c) encontrando una variedad de unidades estructurales en el polímero (Ralph *et al.*, 2004). Las unidades genéricas permiten clasificar la biomasa en gimnosperma (softwoods o coníferas), angiosperma (hardwoods o frondosas) y herbáceas (non-woody). En las menos leñosas (softwood) la estructura G (grupos Guacilico) es dominante, mientras que en biomasa más leñosa (hardwood) la lignina contienen estructuras S (Siringil) y G (Guacilico) pero con un mayor contenido de S, mientras que en los pastos predominan las estructuras H (4-hidroxi-fenil) (Doherty, 2011).

La degradación de lignina es un requisito para realizar la hidrólisis de celulosa y/o hemicelulosa. En consecuencia, la degradación de la lignina por hidrólisis es difícil de aplicar por su hidrofobicidad, estructura aleatoria compleja y carente de enlaces hidrolizables comunes. Las enzimas que degradan la lignina son oxidativas e inespecíficas, y actúan vía mediadores no-proteicos. Las principales enzimas ligninolíticas son las manganeso peroxidasas (mnp) y ligninoperoxidasas (LIG ó lip) que son dependientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y las lacasas que oxidan compuestos fenólicos reduciendo el oxígeno molecular en agua (Ortiz, 2009).

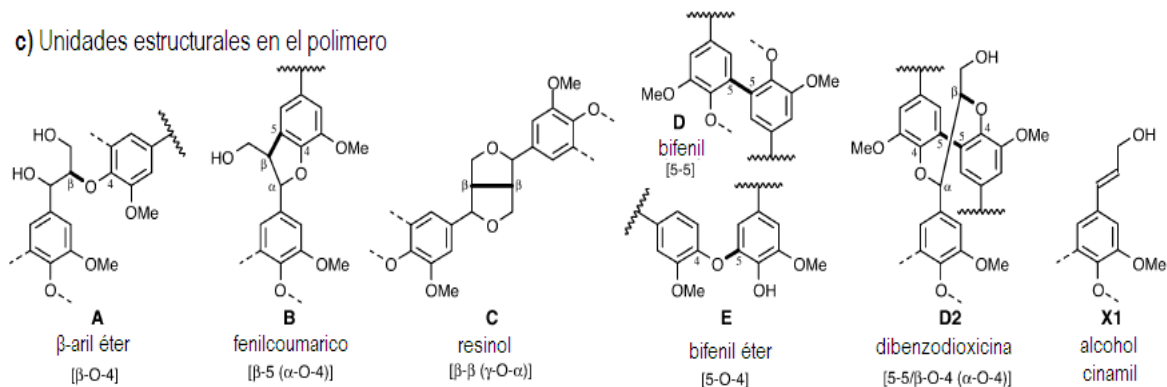
a) Monómeros predominantes (alcoholes hidroxicinnamil)



b) Unidades genéricas de lignina



c) Unidades estructurales en el polímero



**Figura II.2.** Composición de la lignina. (a) monómeros primarios de lignina, **M**, monolignoles. (b) **P** unidades de polímeros de lignina basados en la sustitución de un metoxil sobre un anillo aromático genérico **PH**, **PG** y **PS**. (c) Unidades estructurales mayores en el polímero, los enlaces en negro son formados en las uniones de radicales en las reacciones (Ralph *et al.*, 2004).

### **II.1.2. Hemicelulosa.**

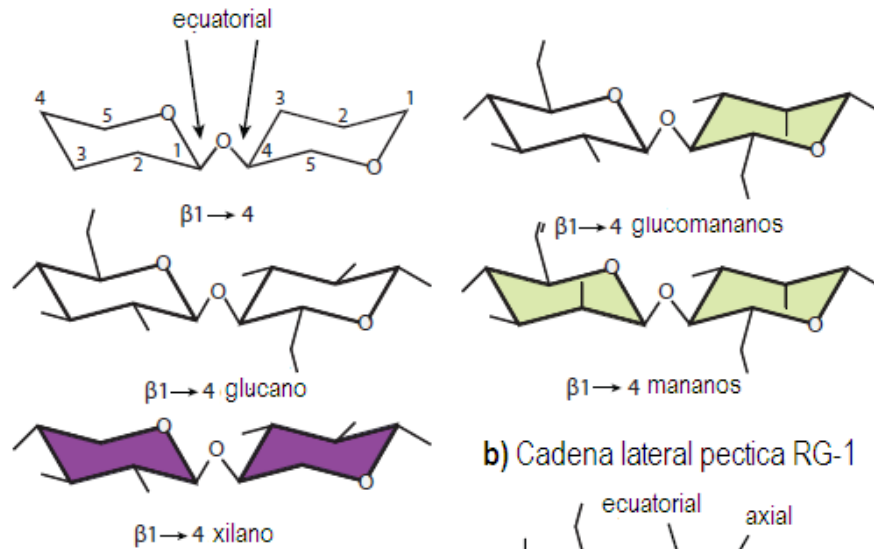
La hemicelulosa es un grupo de polisacáridos heterogéneo con estructuras y biosíntesis no bien conocidas. Está compuesta de una combinación de pentosas (xilosa y arabinosa) y/o hexosas (manosa, galactosa y glucosa), que están frecuentemente acetilados y enlazados hacia grupos tales como ácido urónico y el 4-o-metiléster (Fan y Ragauskas, 2012). De modo que forma una estructura muy compleja y variable formando enlaces covalentes con la lignina y celulosa. Debido a lo anterior la hemicelulosa requiere de la acción de diferentes enzimas para su completa degradación. Además, una gran parte de sus polímeros son insolubles ó fuertemente asociados con la matriz insoluble de la celulosa.

Además, los autores no siempre clasifican la hemicelulosa de la misma forma. Se pueden clasificar según la cadena principal en xilanos (Xyl), xiloglucanos (XyG), mananos y glucomananos. Aunque algunos polisacáridos compuestos por galactosas, arabinosas y arabino-galactosa son regularmente incluidos en el grupo de la hemicelulosa, estos parecen ser más parte de las moléculas de pectina y no tienen la forma ecuatorial  $\beta$ -(1-4) como estructura principal (Scheller y Ulvskov, 2010). En particular, el xilano es un heteropolisacárido con unidades de un polímero principal de 1,4- $\beta$ -D-xilopiranosil.

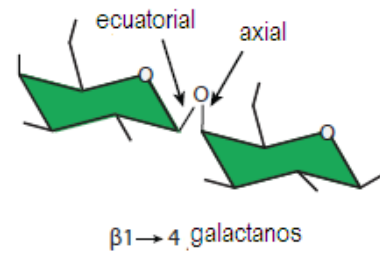
Los enlaces de los xilanos varían entre especies de plantas, los cuales pueden contener arabinosa, ácido glucurónico y 4-o-metileter, ácido acético, ferúlico y p-coumárico. La hemicelulosa es amorfa e hidrofílica y actúa como soporte sobre la celulosa microfibrilar (Fan y Ragauskas, 2012).



a) Disacáridos repetidos de hemicelulosa



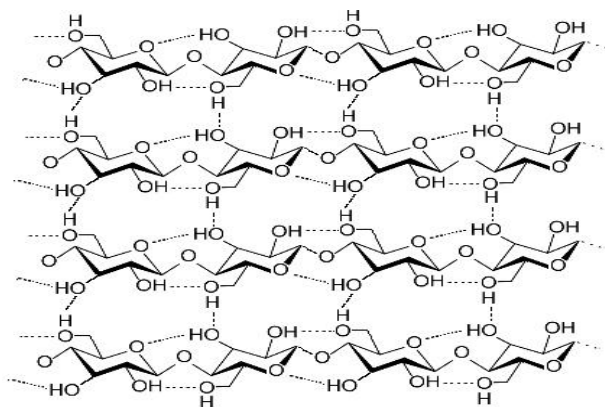
b) Cadena lateral pectica RG-1



**Figura II.3.** Composición de la hemicelulosa. Las hemicelulosas son caracterizadas por la estructura  $\beta$ -(1-4) con una configuración ecuatorial en C1 y C4. (b) Polisacáridos tales como  $\beta$ -(1-4)-galactano tiene una configuración axial en C4 y no debe incluirse como parte de las hemicelulosas (Scheller y Ulvkov 2010).

### II.1.3. Celulosa.

La celulosa es un polímero natural de cadena lineal de glucosa de alto peso molecular. Este carbohidrato tiene una estructura fibrosa con superficie suave y ocasionalmente protegido por una capa cerosa externa (Stanislav *et al.*, 2012). La unidad repetitiva de las cadenas de celulosa está formada por dímeros de celulosa, llamado celobiosa. Pero las cadenas de celulosas (20-300) están agrupados en forma de fibrillas. De manera que la ultraestructura de la celulosa microfibril se debe a enlaces covalentes, puentes de bio-hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Valery *et al.*, 2011), que se presentan entre las cadenas de celulosa. La celulosa tiene una región amorfa o soluble, en consecuencia es menos compacta y más fácilmente hidrolizable (Xuebing *et al.*, 2012). Por otra parte contiene varias regiones con cristalinidad, las cuales incluyen la forma  $I_{\alpha}$  que es triclinica, meta-estable y dominante en pequeñas plantas y la forma  $I_{\beta}$  la cual es monoclinica, estable y dominante en plantas mayores (Stanislav *et al.*, 2012). El grado de polimerización y cristalinidad tienen que ser considerados como factores importantes que influyen en las velocidades de hidrólisis de los sustratos celulósicos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que estos parámetros no explican la recalcitrancia de los sustratos lignocelulósicos. Por ejemplo, la cristalinidad es importante en materiales lignocelulósicos pre-tratados mecánicamente, de manera que puede decrecer por la reducción del tamaño e incremento del área superficial (Alvira *et al.*, 2010).



**Figura II.4.** Estructura de la celulosa.

## II.2. Pre-tratamientos del material lignocelulósico.

El objetivo de realizar un pre-tratamiento es cambiar las propiedades del material lignocelulósico para su degradación enzimática. Diversas investigaciones han propuesto diferentes sistemas de pre-tratamientos sobre materiales lignocelulósicos, reportando además la formación de compuestos tóxicos para los procesos de fermentación, y la degradación parcial de hemicelulosa y celulosa. Los productos residuales de degradación de estos materiales reportados durante el pre-tratamiento, pueden dividirse en las siguientes clases: ácidos carboxílicos (ácido acético, fórmico y levulínico), derivados furanos (furfural y 5-hidroximetilfurfural), compuestos fenólicos, aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos orgánicos (Alvira *et al.*, 2010).

Taherzadeh y Karimi (2008) propusieron una serie de requerimientos para alcanzar un pre-tratamiento económico y efectivo. Dichos requerimientos incluyen:

- a) Producir una fibra celulósica apropiada para el ataque enzimático.
- b) Evitar la destrucción de celulosa y hemicelulosa.
- c) Evitar la formación de posibles inhibidores para la hidrólisis enzimática y para los microorganismos fermentativos.
- d) Minimizar la demanda de energía.
- e) Bajar los costos de reducción de tamaño de materia prima.
- f) Reducción de costos de material para la construcción de reactores de pre-tratamiento.
- g) Producir menos residuos en el proceso de pre-tratamiento.
- h) Evitar el uso de químicos o un bajo consumo de ellos, así como el empleo de químicos baratos.

### **II.2.1. Pre-tratamientos físicos.**

El pre-tratamiento físico permite incrementar el área superficial y tamaño de poro, así como disminuir el grado de cristalinidad y polimerización de la celulosa. La molienda es un pre-tratamiento que puede emplearse para alterar la estructura inicial por reducción de tamaño y grado de cristalinidad. En consecuencia hace más susceptible a la celulosa para la hidrólisis enzimática. Este proceso involucra un costo energético importante, presentando la desventaja de no poder eliminar a la lignina, cual puede restringir el acceso de las enzimas hacia la celulosa. Otro tipo de pre-tratamiento físico es la radiación, como por ejemplo, los procesos de haz de electrones y microondas. Los pre-tratamientos con radiación acondicionan apropiadamente las fibras para la degradación enzimática, pero en fibras frágiles, la celulosa puede ser degradada. El tratamiento con radiación puede también estar relacionado con la presencia de lignina residual en los hidrolizados. Por otra parte, estos métodos son caros y presentan dificultades en la aplicación industrial. Por último, la cavitación es un método físico de congelación y descongelación, aunque es un proceso caro por los costos energéticos. El calentamiento a bajas temperaturas (60-70°C por 5-30 minutos) ó altas temperaturas (180-200°C por 10 segundos) pueden mejorar la disrupción celular y lisis (Taherzadeh y Karimi, 2008).

### **II.2.2. Pre-tratamientos fisicoquímicos.**

Entre los pre-tratamientos fisicoquímicos, el empleo de vapor con o sin explosión (auto-hidrólisis) ha tenido mayor atención. En este pre-tratamiento el vapor de agua penetra hacia la pared celular causando la hidrólisis de la hemicelulosa y ocasionando la transformación de lignina, ya que el agua tiene propiedades ácidas a altas temperaturas favoreciendo la hidrólisis. Además, la celulosa es poco alterada durante la auto-hidrólisis por el alto grado de cristalinidad e inaccesibilidad de la zona microfibrilar (Fan y Ragauskas, 2012). En este proceso, la alta presión y temperatura (160 - 260°C) por algunos segundos o minutos (por ejemplo 30 segundos o 20 minutos) repentinamente someten el

material a una descompresión explosiva. Aunque el costo de energía es relativamente moderado, por el contrario favorece la pérdida de azúcares por formación de furfurales mediante los mismos mecanismos descritos para los pre-tratamientos ácidos. El uso de vapor con explosión y pre-tratamientos térmicos son ampliamente investigados para mejorar la producción de gas a partir de diferentes materiales, que combinan estos pre-tratamientos con la adición de algunas bases para incrementar su efectividad (Taherzadeh y Karimi, 2008).

Otro proceso de pre-tratamiento fisicoquímico alcalino es la explosión de fibras con amonio (AFEX por sus siglas en inglés). El amonio es un reactivo deseable para los pre-tratamientos, ya que (a) hincha el material lignocelulósico, (b) reacciona selectivamente para romper los enlaces éster entre la matriz carbohidrato-lignina, (c) no es corrosivo, (d) es fácil de recuperar y reciclar por su baja volatilidad (Fan y Ragauskas, 2012). En este pre-tratamiento, la biomasa es expuesta al amonio líquido a altas temperaturas (90-100°C) por un periodo (30 minutos), siguiendo una inmediata reducción de presión (Taherzadeh y Karimi, 2008). Esta combinación de amonio y efectos físicos conducen a una solubilización parcial de la hemicelulosa y disrupción de la pared celular, incrementando la accesibilidad enzimática hacia la celulosa y hemicelulosa. El AFEX promueve la remoción de los grupos acetilo desde la hemicelulosa con la consecuente formación de acetamida y ácido acético. Sin embargo, se ha reportado que el AFEX remueve menores cantidades de grupos acetilo comparado a otros pre-tratamientos. Durante el pre-tratamiento AFEX, el amonio causa una serie de reacciones de amonolisis (formación de amidas) e hidrólisis (formación de ácidos) en presencia de agua, rompiendo los enlaces éster entre la matriz lignina-carbohidratos a través de los enlaces ferulatos entre la arabinosa y cadenas de xilanos. De modo que la ruptura de los enlaces éster facilita la solubilización y remoción de lignina y oligómeros de la hemicelulosa, exponiendo de esta manera a la celulosa microfibrilar (Fan y Ragauskas, 2012). Una de las mayores ventajas es que no se forman productos inhibitorios, tal como los furanos durante la hidrólisis con ácidos diluidos o durante el pre-tratamiento de explosión con vapor.

Sin embargo, parte de los fragmentos fenólicos de la lignina y otros residuos de la pared celular pueden permanecer en la superficie celulósica. Sin embargo, AFEX es más efectivo para tratar biomasa que contienen poca lignina y el amonio puede ser reciclado después del pre-tratamiento para reducir los costos y proteger el medio ambiente (Taherzadeh y Karimi, 2008).

La cocción de material lignocelulósico en agua (por sus siglas en inglés LHW) es uno de los pre-tratamientos hidrotérmicos aplicados desde hace algunas décadas por ejemplo en la industria del papel. El agua bajo presión puede penetrar dentro de la biomasa, hidratando la celulosa, eliminando hemicelulosa y parte de lignina (Taherzadeh y Karimi, 2008). En este pre-tratamiento se solubiliza la hemicelulosa, ya que el agua a alta temperatura actúa como un ácido débil, liberando los iones hidronio, causando la despolimerización de la hemicelulosa actuando selectivamente sobre los enlaces glucosídicos, rompiendo enlaces O-acetil o residuos ácidos de la hemicelulosa para formar ácido acético y urónico (Fan y Ragauskas, 2012). La mayor ventaja es que no se requiere adicionar químicos y no requiere material resistente a la corrosión para los reactores del proceso. Además, no es necesaria la reducción del tamaño para el pre-tratamiento y requiere pocos químicos para la neutralización del hidrolizado producido, comparado a otros tipos de pre-tratamientos. En este proceso, los carbohidratos de la hemicelulosa son disueltos y pueden ser separados de las fracciones de lignina y celulosa insoluble. Este proceso puede aumentar la accesibilidad y área expuesta de la celulosa para una efectiva hidrólisis enzimática. La alta recuperación de pentosas y baja formación de inhibidores son las principales ventajas de LHW comparadas con explosión con vapor (Taherzadeh y Karimi, 2008). Aunque el furfural y el HMF pueden ser formados debido a la degradación de pentosas y hexosas, sin embargo, la cantidad de azúcares degradados es más baja que en los pre-tratamientos ácidos y no presenta una inhibición significativa sobre los procesos de fermentación. Para este pre-tratamiento la celulosa amorfa es más reactiva que la celulosa cristalina, porque la temperatura mínima requerida para la ruptura de los enlaces glucosídicos sobre la celulosa amorfa es de 150°C, mientras que para la porción cristalina es de 180°C (Fan y Ragauskas, 2012).

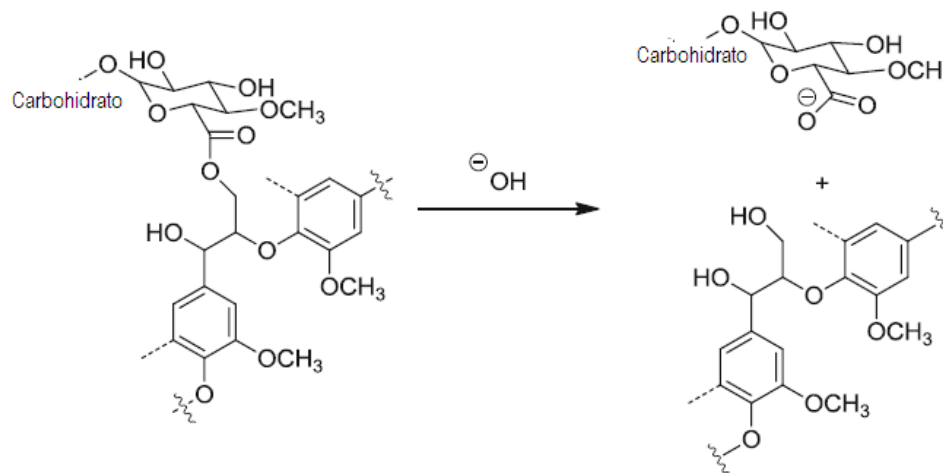
## **II.2.3. Pre-tratamientos químicos.**

### **II.2.3.1. Pre-tratamiento alcalino.**

Los pre-tratamientos alcalinos son procesos donde se realiza la aplicación de soluciones alcalinas como son NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o amonio para eliminar lignina y una parte de hemicelulosa, con el consecuente incremento de la accesibilidad de la enzima hacia la celulosa (Tahezadeh y Karimi, 2008). Los pre-tratamientos alcalinos se dividen en dos grupos: (a) pre-tratamientos que utilizan hidróxido de sodio o calcio y (b) pre-tratamientos que utilizan amonio. La eficiencia de los pre-tratamientos alcalinos depende del tiempo de reacción, concentración de álcali y temperatura de reacción. Sus ventajas son que no necesita de materiales especiales para la construcción de los reactores y permite reutilizar el álcali residual. Sin embargo, una limitación es que algunos álcalis incorporan sales dentro del material lignocelulósico durante el proceso de pre-tratamientos y otra limitación es el costo del sistema de reciclamiento del álcali residual (Fan y Ragauskas, 2012). El pre-tratamiento alcalino permite una mayor solubilidad de la lignina y digestibilidad de celulosa, mostrando una menor solubilización de celulosa y hemicelulosa que los procesos ácidos o hidrotermales. Pero puede promover posibles pérdidas de azúcares fermentables y producir compuestos inhibidores, además su eficiencia depende del contenido de lignina en la biomasa.

El mecanismo del pre-tratamiento se cree que involucra la saponificación de enlaces éster intermoleculares entre la lignina y hemicelulosa (Figura II.5.). Por consiguiente, la saponificación rompe los enlaces y expone la celulosa microfibrilar incrementando la digestibilidad enzimática de la celulosa. Los grupos acetil y varios ácidos urónicos substituidos son removidos por álcalis, incrementando así la accesibilidad de las enzimas hacia la celulosa y hemicelulosa (Fan y Ragauskas, 2012). El NaOH causa hinchamiento de la pared celular incrementando la superficie interna de la celulosa, disminuyendo el grado de polimerización y cristalinidad, provocando una disrupción de la estructura de lignina con el consecuente aumento de la digestibilidad de la biomasa. El

tratamiento con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  presenta costos más bajos y menores requerimientos de seguridad comparado con el  $\text{KOH}$  y el  $\text{NaOH}$ , remueve las sustancias amorfas (lignina) incrementado el índice de cristalinidad, eliminando grupos acetyl de las hemicelulosas, evitando impedimentos estéricos de accesibilidad de celulasas, reduciendo la adsorción de enzimas en sitios no productivos (Alvira et al., 2010). Además se puede agregar agentes oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a los pre-tratamientos alcalinos mejorando la remoción de lignina, no detectando en sus hidrolizados inhibidores como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), favoreciendo el proceso de fermentación.



**Figura II.5.** Saponificación de carbohidratos con álcalis (Fan y Ragauskas, 2012).



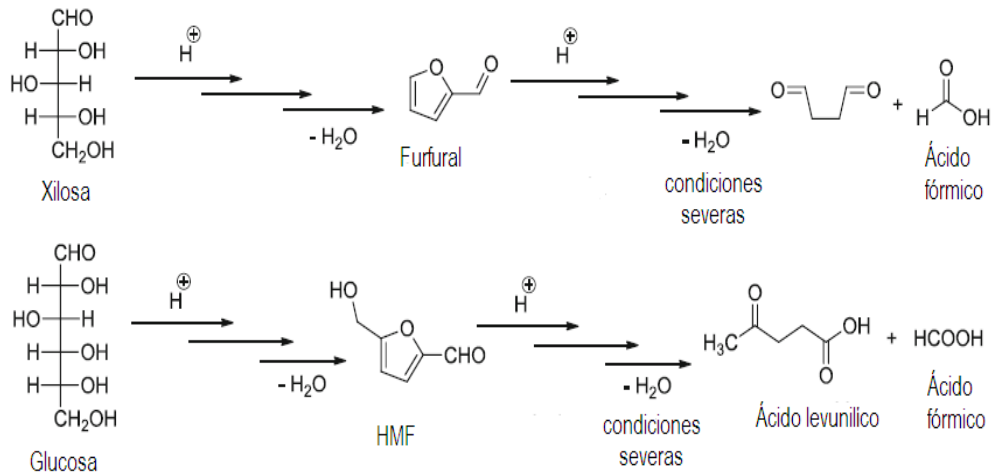
### II.2.3.2. Pre-tratamiento ácido.

El principal objetivo del pre-tratamiento ácido es solubilizar la fracción de hemicelulosa, convirtiendo la hemicelulosa en azúcares fermentables solubles haciendo más accesible la celulosa a enzimas. Los pre-tratamientos pueden utilizar ácidos concentrados ó diluidos, con altas temperaturas ( $>180^{\circ}\text{C}$ ) o bajas temperaturas ( $<120^{\circ}\text{C}$ ) durante tiempos cortos o prolongados de reacción (30 a 90 minutos). Dependiendo de la temperatura del proceso, la degradación de algunos azúcares puede formar furfural, HMF y compuestos aromáticos. Estos compuestos pueden afectar a los microorganismos en los procesos de fermentación. Los más altos rendimientos de hidrólisis en biomasa lignocelulósicas se han reportado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluido, aunque también han sido evaluados otros pre-tratamientos con ácido clorhídrico, nítrico y fosfórico. Los ácidos orgánicos como el maléico y el fumárico parecen ser una alternativa para mejorar la hidrólisis de celulosa, lo cual se ha demostrado en el pre-tratamiento de paja de trigo, encontrándose que el ácido maléico es más efectivo. Además, la cantidad de furfural formado con estos ácidos orgánicos es menor que con ácido sulfúrico (Alvira *et al.*, 2010). Sin embargo, el costo de los ácidos, los materiales especiales para construir los reactores y el procedimiento de neutralización, hacen este pre-tratamiento caro.

En primer término, la hidrólisis con ácidos diluidos se lleva a cabo sobre las hemicelulosas, obteniendo principalmente xilanos y glucomananos que son relativamente estables bajo condiciones ácidas. En general, bajo condiciones menos severas, los xilanos son acumulados en el licor en forma de xilosa; sin embargo bajo condiciones severas los xilanos pueden convertirse en furfural, ácido fórmico, acético y urónico (Figura II.6.). La hidrólisis de la celulosa y subsecuente solubilización de glucosa se realiza bajo condiciones más severas.

La reacción tiene lugar sobre la estructura fibrilar, desde la región amorfa y cristalina sobre la celulosa. El proceso consiste en dos pasos: primero, una rápida hidrólisis hacia la región amorfa y después un ataque más lento sobre la porción cristalina. Los subproductos indeseables que se pueden obtener a partir de la

hidrólisis de celulosa son 5-hidroximetilfural (HMF), ácido levulínico y fórmico (Fan y Ragauskas, 2012).



**Figura II.6.** Formación de inhibidores en los pre-tratamientos ácidos, para los procesos fermentativos (Fan y Ragauskas, 2012).

#### II.2.4. Hidrólisis enzimática.

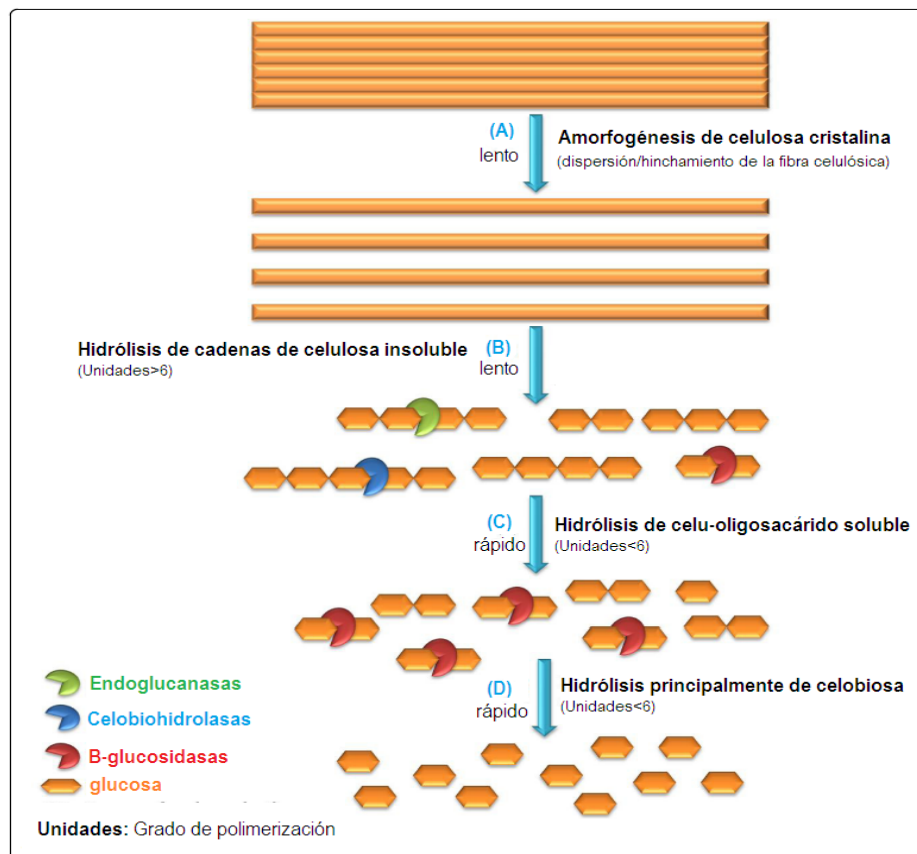
El continuo interés de utilizar las fuentes de biomasa para producir biocombustibles alternativos, ha llevado a que diferentes grupos de investigación evalúen la habilidad de las enzimas para degradar los sustratos lignocelulósicos para producir azúcares fermentables. Sin embargo, obtener una hidrólisis enzimática eficiente y completa utilizando una baja carga enzimática es un reto en los procesos de bio-conversión de biomasa lignocelulósica (Arantes y Saddler, 2010). La degradación de la biomasa celulósica es realizada por medio de una mezcla de enzimas hidrolíticas conocidas como celulasas. Las celulasas incluyen dos actividades enzimáticas, las endoglucanasas (EGs) y exoglucanasas (celobiohidrolasas, CBH), las cuales de forma sinérgica degradan la biomasa. La celobiosa y la glucosa son productos de las exoglucanasas, por lo que se requiere

la presencia de  $\beta$ -glucosidasas para romper los enlaces glucosídicos de la celobiosa para convertirla a glucosa (Mehdi D. *et al.*, 2010).

Además del pre-tratamiento seleccionado, otros factores pueden intervenir en la hidrólisis enzimática afectando la digestibilidad de la biomasa, tales como la combinación y composición del sustrato, la dosis y la eficiencia enzimática. Aunque la reducción de la severidad del pre-tratamiento puede minimizar los costos económicos, quizás incrementen la cantidad y tipos de enzimas necesarios para alcanzar una alta eficiencia de obtención de azúcares. El grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa son factores importantes en determinados grados de hidrólisis. Las endoglucanasas cortan el sitio interno de las cadenas de celulosa disminuyendo el grado de polimerización principalmente en las cadenas menos ordenadas. Uno de los factores que influyen debido a la naturaleza del sustrato es el grado de polimerización de lignina y hemicelulosa, las cuales dificultan el acceso de las celulasas, reduciendo la eficiencia de hidrólisis. La lignina afecta a la hidrólisis por medio de la formación de enlaces no productivos (adsorción reversible y/o irreversible de las enzimas en la lignina). Recientes investigaciones han mostrado que diversas celulasas son inhibidas, observando que las menos afectadas son las xilanasas y glucosidasas. Otro factor que debe tomarse en consideración son los tejidos de plantas (capa cerosa) y arboles (corteza) que limitan la penetración de enzimas, ya que algunos estudios demuestran que la accesibilidad llega a ser limitante para la bio-conversión (Alvira *et al.*, 2010).

De modo que Arantes y Saddler (2010) sugieren que las celulasas, inicialmente necesitan ser adsorbidas sobre la superficie de la celulosa insoluble antes de realizar la hidrólisis; de esta manera, se exponen una parte de las cadenas de celulosa en la zona microfibrilar, mientras otra permanece molecularmente sin cambios (amorfogénesis) ya que es estructuralmente impenetrable (Figura II.7a). De modo que parte de la red celulósica es accesible por las enzimas (endo- y exo-glucanasas), que promueven la fragmentación

produciendo celu-oligosacáridos solubles (moléculas celulósicas con un grado de polimerización <6 unidades) (Figura II.7b), los cuales son rápidamente hidrolizados principalmente a celobiosa (Figura II.7c). Estos mecanismos propuestos se basan en que los celu-oligosacáridos han sido determinados en solución (celobiosa como producto primario de hidrólisis). Una fuente de  $\beta$ -glucosidasas es usualmente agregada a las mezclas de celulasas comerciales para completar la hidrólisis de celobiosa a glucosa (Figura II.7d).



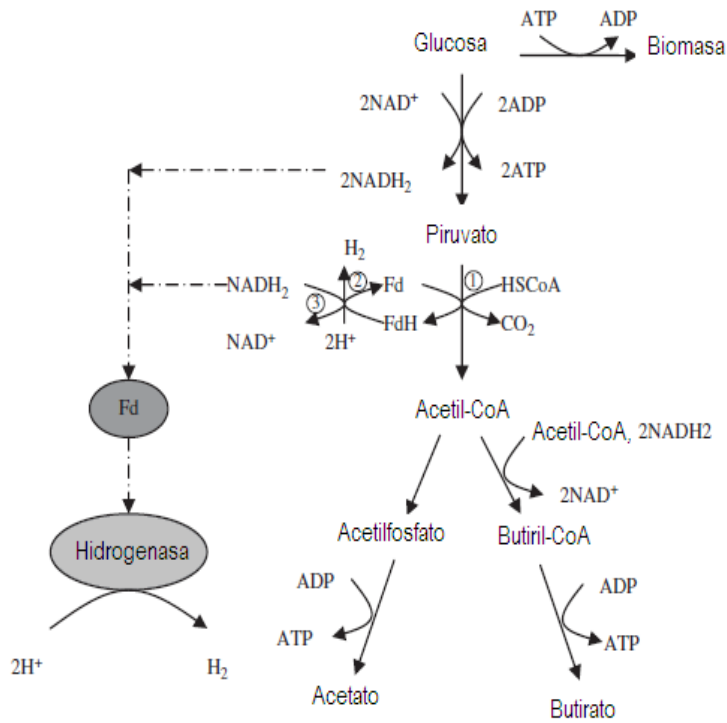
**Figura II.7.** Mecanismo propuesto de amorfogénesis/despolimerización de celulosa realizada por celulasas. Amorfogénesis toma lugar a nivel macromolecular por agentes no hidrolíticos (Arantes y Saddler, 2010).

### II.3. Metabolismo del proceso de fermentación para la producción de bio-hidrógeno.

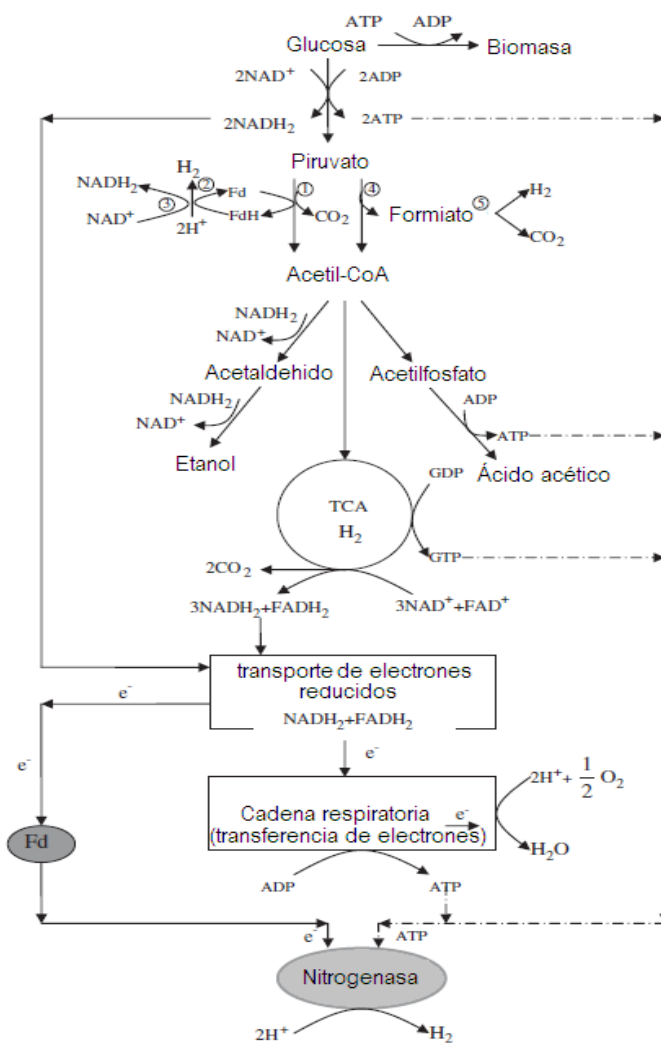
Desde una perspectiva de ingeniería, los procesos biotecnológicos ofrecen potenciales ventajas, ya que son baratos (microorganismos) y requieren una baja demanda energética en la operación de reactores (mesofilicos). Se han descrito cuatro vías para la producción biológica de bio-hidrógeno: (1) bio-fotólisis a partir de agua utilizando algas/cianobacterias, (2) foto-descomposición (foto-fermentación) de compuestos orgánicos utilizando bacterias fotosintéticas, (3) fermentación oscura utilizando bacterias anaerobias (o facultativas anaerobias) y (4) bio-electrohidrogenogénesis. El tercer método (fermentación oscura), presenta la producción de bio-hidrógeno más estable. Además, los sistemas anaerobios tienen ventajas sobre los procesos fotosintéticos, para empezar son simples, baratos y presentan mayores velocidades de producción de bio-hidrógeno (Hallenbeck *et al.*, 2009). La fermentación oscura involucra diversas rutas metabólicas, siendo el mayor problema la formación de diversos productos fermentativos (acetato, butirato, butanol, acetona etc.). En otras palabras, el crecimiento y sobrevivencia de los organismos conducen a la formación de los productos finales de fermentación, permitiendo la formación de ATP, así como de productos reducidos obtenidos por la oxidación del NADH, los cuales son necesarios para mantener el balance óxido-reducción (REDOX) en el proceso de fermentación (Hallenbeck *et al.*, 2010). Típicamente, las especies anaerobias (por ejemplo género *Clostridium*) generan gas en la fase de crecimiento, y en la fase estacionaria realizan la producción H<sub>2</sub> y ácidos grasos volátiles (AGV) (Hallenbeck *et al.*, 2009). Con referencia a lo anterior, existen dos clases de bacterias fermentativas para producir bio-hidrógeno, unas que son estrictamente anaerobias y otras facultativas anaerobias. Las bacterias *Clostridium* y *Enterobacter* son utilizados como inóculos para la producción fermentativa de bio-hidrógeno. Las especies *Clostridium* son Gram negativas, estrictamente anaerobias con forma de bastoncillos que pueden generar esporas, mientras que las *Enterobacter* son Gram negativas, facultativas anaerobias en forma de bastoncillos (Sinha y Pandey, 2011). La bacteria *Clostridium butyricum* es estrictamente anaerobia,

conocida como una clásica productora de ácidos grasos volátiles y que usualmente fermenta carbohidratos formando metabolitos como butirato, acetato, bióxido de carbono y bio-hidrógeno. Esta bacteria presenta dos vías para producir bio-hidrógeno (Figura II.8.), una conduce el piruvato hacia acetil-CoA,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , donde la conversión del piruvato es catalizado por las enzimas Piruvato: ferredoxina oxidoreductasa, una hidrogenasa y una NADH: ferredoxinaoxidoreductasa. En esta ruta, una parte de los electrones son transferidos a protones para producir bio-hidrógeno y  $\text{NAD}^+$  generando  $\text{NADH}_2$ . El  $\text{NADH}_2$  generado durante la glicólisis es utilizado para producir bio-hidrógeno en la segunda ruta metabólica. En esta segunda ruta metabólica los electrones derivados de la oxidación del sustrato, se transfieren hacia la ferredoxina (Fd) y entonces se produce bio-hidrógeno a partir de una hidrogenasa. En conclusión, el bio-hidrógeno producido por bacterias estrictamente anaerobias se obtiene principalmente por medio de las hidrogenasas (Xi Chen *et al.*, 2006).

Las bacterias anaerobias facultativas, utilizan  $\text{NADH}_2$  como reductor para la producción de 3-butanodiol, etanol y lactato a partir de piruvato, sin producir bio-hidrógeno. En la ruta metabólica de estas bacterias la conversión de acetil-CoA es catalizada por dos enzimas la piruvatoformalasa (PFL) y la piruvatodeshidrogenasa (PDH). Existen tres rutas metabólicas (Figura II.9.) capaces de producir bio-hidrógeno. Primero, a partir del piruvato hacia acetil-CoA, catalizada por PLF produciendo ácido fórmico, y al mismo tiempo por medio de la enzima formato hidrogenolasa sintetiza bio-hidrógeno. En la segunda ruta, los electrones generados en la síntesis del piruvato (catalizada por PDH) son transferidos a la ferredoxina y a los  $\text{H}^+$  generando  $\text{H}_2$  por medio de las hidrogenasas; mientras tanto los electrones restantes son transferidos al  $\text{NAD}^+$  para generar  $\text{NADH}_2$ . Por último, una porción de  $\text{NADH}_2$  transfiere electrones hacia las nitrogenasas para generar bio-hidrógeno y los electrones restantes son aceptados por el oxígeno en la cadena respiratoria para formar ATP (Xi-Chen *et al.*, 2006).



**Figura II.8.** Ruta metabólica de producción de bio-hidrógeno a partir de glucosa por *Clostridium butyricum* bajo condiciones anaerobias. (1) Piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR); (2) Hidrogenasa; (3) NADH: ferredoxina oxidoreductasa (Xi-Chen *et al.*, 2006).



**Figura II.9.** Ruta metabólica de producción de bio-hidrógeno a partir de glucosa por *Klebsiella pneumoniae* bajo condiciones facultativas. (1) Piruvato deshidrogenasa (PFDH); (2) Hydrogenasa; (3) NADH: ferredoxina oxidoreductasa; (4) Piruvato formatoliasa (Xi-Chen *et al.*, 2006).

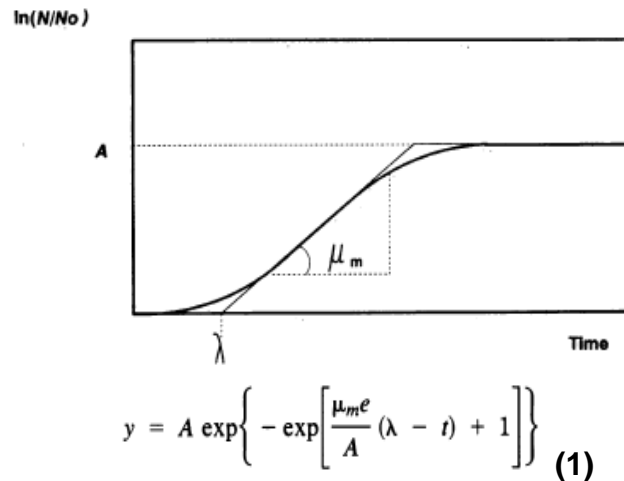


#### **II.4. Cinética de producción de bio-hidrógeno.**

La degradación de la materia orgánica en ambientes anaerobios se realiza por la cooperación de los microorganismos presentes en consorcios los cuales generan un proceso estable capaz de regular el proceso de fermentación. Inicialmente, las bacterias hidrolizan proteínas y azúcares. Posteriormente, las bacterias fermentativas forman ácidos orgánicos,  $H_2$  y  $CO_2$  a partir de moléculas monoméricas.

El acetato e  $H_2$  pueden ser utilizados y/o producidos por diferentes grupos de microorganismos. Así, el acetato puede ser generado durante la acetogénesis por medio de la reducción de  $CO_2$  con  $H_2$  por acetogenas autotróficas vía Wood-Ljungdahl, un proceso conocido como homoacetogénesis. Finalmente, para completar la degradación de materia orgánica, el consumo de ácidos orgánicos e  $H_2$  por metanogenas acetoclásticas/hidrogenotróficas producen  $CH_4$  y  $CO_2$ . Por lo tanto, para acumular  $H_2$  se requiere inhibir a los microorganismos que consumen  $H_2$  tales como las metanogenas hidrogenotróficas y acetogenas autotróficas. Sin embargo, en algunas investigaciones se ha observado consumo de  $H_2$  por acetogenas autotróficas durante la producción de  $H_2$  a partir de la fermentación de carbohidratos. Sin embargo, cuando este fenómeno se presenta, el crecimiento de las acetogenas autotróficas es limitado por la posible remoción de  $CO_2$ . En otras palabras, la inhibición y/o control del crecimiento de los microorganismos metanogénicos es posible por control bio-cinético, tratamientos térmicos y químicos. Algunos microorganismos tienen la capacidad de esporular bajo condiciones hostiles, así las esporas son metabólicamente latentes y resistentes a los choques térmicos, radiación, pH extremos y químicos tóxicos (Valdez y Poggi, 2009). En ambientes anaerobios, los principales microorganismos formadores de esporas son las bacterias productoras de hidrógeno. Por lo tanto, se busca eliminar a los microorganismos no formadores de esporas, principalmente metanogénicos en los inóculos para producir  $H_2$ . Además, la producción de bio-hidrógeno en los procesos de fermentación depende de las condiciones de temperatura, pH, formulación del medio mineral, tipos y concentración de ácidos

orgánicos producidos, tipos de sustratos, presión parcial de bio-hidrógeno y configuración de los reactores (Dávila-Vaquez *et al.*, 2008). La producción de bio-hidrógeno, así como el crecimiento de las bacterias productoras de bio-hidrógeno, y formación de metabolitos solubles, pueden ser descritos por los modelos cinéticos. Estos modelos permiten la predicción del crecimiento de los microorganismos y la formación de metabolitos. Las bacterias crecen regularmente mostrando una fase inicial (Figura II.10) de crecimiento desde un valor cero (tiempo lag,  $\lambda$ ), después acelerando su crecimiento a un valor máximo ( $\mu_m$ ) en un cierto tiempo (fase exponencial) y para terminar, la curva de crecimiento tiene una fase final donde la velocidad de crecimiento decrece y finalmente es cero [ $A = \ln(N_\infty/N_0)$ ]. Diferentes modelos de crecimiento son reportados (Gompertz, Richards, Stannard, Schnute, logístico y otros) que describen solamente el número de microorganismos y no incluyen el consumo de sustrato como el modelo de Monod. Pero el nivel de sustrato no es de interés en algunas aplicaciones, asumiendo que existe suficiente sustrato para alcanzar un número adecuado de microorganismos. Diferentes modelos describen el crecimiento de la curva sigmoideal los cuales incluyen parámetros matemáticos (a, b, c,...) que tiene un significado biológico (A,  $\mu_m$  y  $\lambda$ ). Todos los modelos de crecimiento se pueden expresar por medio de dichos parámetros matemáticos (ecuación 1).

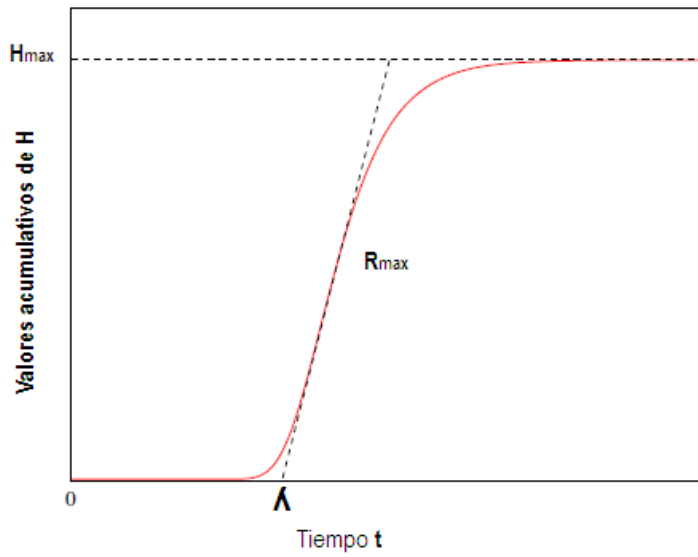


**Figura II.10.** Ecuación ajustada de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990).

El modelo cinético modificado de Gompertz desarrollado por Zwietering *et al.*, (1990) describe la degradación de sustrato, crecimiento de las bacterias productoras de bio-hidrógeno, producción de metabolitos (ácidos grasos volátiles y alcoholes) e bio-hidrógeno en los procesos fermentativos en lote (Wang y Wan, 2009). En consecuencia, en los ensayos en lote, el bio-hidrógeno y los ácidos grasos volátiles (AGVs) pueden ser producidos durante la fase exponencial y estacionaria. Sin embargo, diferentes autores muestran que la máxima producción se obtiene en la fase exponencial y decrece en la fase estacionaria debido a la producción de alcoholes (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008). La ecuación 2 describe una prueba en lote para la producción de bio-hidrógeno, donde **H** es el bio-hidrógeno total producido en función del tiempo transcurrido, **H<sub>max</sub>** es la producción máxima acumulada de bio-hidrógeno, **R<sub>max</sub>** es la velocidad máxima de producción de bio-hidrógeno, **e= 2.72**, **λ** es el tiempo de fase lag y **t** el tiempo de incubación (Cui *et al.*, 2010). En la prueba en lote, H se incrementa lentamente cuando se incrementa el tiempo de crecimiento desde 0 a λ, además la velocidad máxima de producción de bio-hidrógeno (**R<sub>max</sub>**) se incrementa rápidamente en la fase exponencial y finalmente alcanza un valor asintótico (**H<sub>max</sub>**) con un incremento en el tiempo de ensayo (Wang y Wan, 2009).

Una importante característica en la fermentación de hidrogeno es la velocidad de producción de bio-hidrógeno (VPH ó VHPR por sus siglas en inglés). Este parámetro debe reportarse en unidades estándares, el cual debe ser calculado tamaño del reactor. Significa entonces que en ensayos en lote, puede realizarse el cálculo dividiendo la velocidad máxima de producción de hidrógeno en el ensayo (**R<sub>max</sub>**) entre el volumen de trabajo del reactor, por tanto obteniéndose el volumen de bio-hidrógeno producido por unidad de volumen del reactor y por unidad de tiempo de operación (por ejemplo ml H<sub>2</sub>/L-h). Al igual otro parámetro importante a evaluar es el rendimiento molar de bio-hidrógeno producido (RMH o RMH por sus siglas en inglés); este puede calcularse dividiendo la producción máxima acumulada de bio-hidrógeno (**H<sub>max</sub>**, en unidad molar) entre

los moles de sustrato alimentados al reactor (mol H<sub>2</sub>/mol sustrato) o consumidos durante el proceso de fermentación.



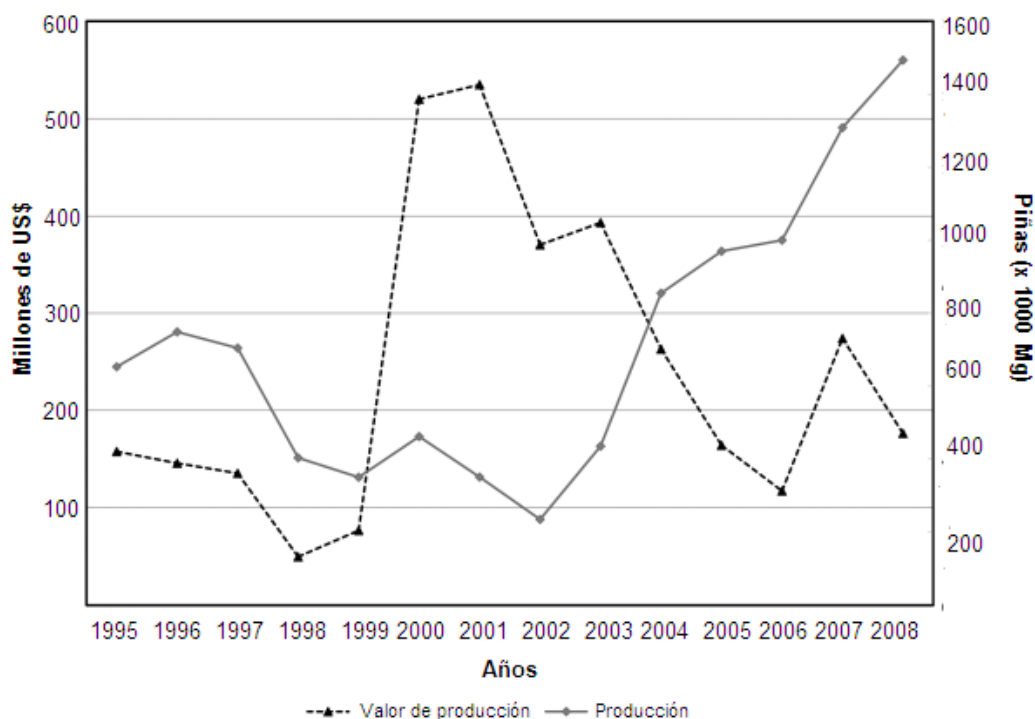
$$H = H_{\max} \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{\max} e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

**Figura II.11.** Ecuación ajustada de Gompertz para la producción de bio-hidrógeno (Wang y Wan, 2009).

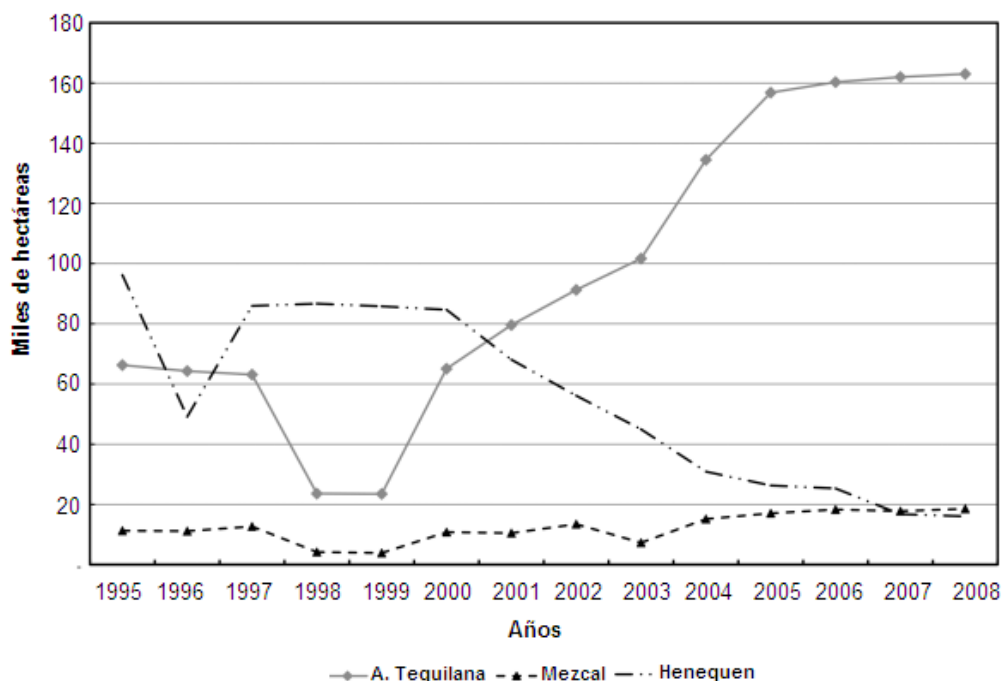
### III. Antecedentes

#### III.1. Bagazo de *Agave tequilana* Weber, como material lignocelulósico para la generación de bio-combustible.

Acordado para la protección del estatus geográfico para el tequila (Denominación de Origen; DOT), el tequila debe ser producido a partir de *A. tequilana* Weber Azul cultivado solamente en el estado de Jalisco y algunas regiones de los estados de Guanajuato, Nayarit, Michoacán y Tamaulipas. En el año 2008 el estado de Jalisco tenía 74% del total del área plantada y 84% del total de la producción de *A. tequilana* Weber en México, además existían 163 000 hectáreas plantadas con 3000 a 3300 plantas por hectárea, donde solamente 14 332 hectáreas fueron cosechadas produciendo 1 493 287 toneladas métricas (peso fresco) de piñas para la producción de tequila (Figura III.1), incrementado las áreas de plantación (Figura III.2) significativamente de 1999 a 2004 (Nuñez *et al.*, 2011).



**Figura III.1** Valores y niveles de producción de *Agave tequilana* Weber en México 1995–2008. Source: SIAP-SAGARPA (2010). Precios en 2007 y convertidos a US\$ utilizando la tasa de cambio de 2007 de MXN10.9 por US\$ 1 (Banco-de-México, 2010);(Nuñez *et al.*, 2011)



**Figura III.2.** Áreas plantadas de *Agave tequilana* Weber, mezcal feedstocks y henequén en cientos de hectáreas de 1995–2008. SIAPSAGARPA (2010). Nota: Área de henequén solamente corresponde a Yucatán. (Nuñez *et al.*, 2011).

Por otra parte, Hongjia *et al.*, (2012) reportó que la composición de carbohidratos puede variar con la especie de agave, regiones de cultivo, climas y edad de la planta. Por ejemplo para *A. americana* puede encontrarse 8% más de celulosa en pencas de agaves con 8 años de edad que en pencas de agaves más jóvenes (4 años de edad). Además en muestras de pencas de 4 especies de agaves (Tabla III.1) se encontró que contienen 50% de carbohidratos en peso seco, incluyendo azúcares libres y carbohidratos estructurales (glucosa, xilosa, galactosa y arabinosa). Pero el bagazo de la piña contiene más de 55% de azúcares estructurales totales. Sin embargo, el índice de cristalinidad para las piñas es baja comparadas con las pencas para la especie *A. americana*, indicando que contiene más celulosa amorfa que en sus pencas. Diferentes estudios sugieren que existe correlación entre la cristalinidad y digestibilidad enzimática, esperando que la velocidad de hidrólisis enzimática sea más rápida en la celulosa amorfa. Los agaves presentan una alta proporción de *p*-celulosa cristalina

sugiriendo que puede tener una alta digestibilidad enzimática comparada con materiales de madera. El bajo contenido de lignina y las características estructurales cristalinas sugieren que el bagazo de agave puede ser más fácilmente convertido en azúcares que los pastos o maderas.

**Tabla III.1.** Balance de masa del bagazo de agave en composición seca (%).

<b>Especies</b>	<b>Carbohidratos estructurales</b>	<b>K-lignina</b>	<b>Cr ±2</b>	<b>para ±6.3</b>	<b>Acc± 2.1</b>
Pencas de <i>A. americana</i>	45.0 ± 0.3	8.2 ± 0.3	54	37.7	6.4
Pencas <i>A. salmiana</i>	42.7 ± 1.3	9.8 ± 0.7	50	24.8	5.5
Pencas de <i>A. tequilana</i>	41.7 ± 0.3	11.9 ± 1.2	53	32.8	5.0
Piña de <i>A. americana</i>	39.7± 0.3	7.3 ± 0.9	46	26.0	8.9

<sup>a</sup>Datos reportados con valores medios de tres replicas; Cr: índice de cristalinidad; para: *p*-celulosa cristalina; Acc: superficie accesible a celulosa; K-lignina: determinación método Klason (Hongjia *et al.*, 2012).

### III.2. Hidrolizados de bagazo de agave.

Saucedo-Luna *et al.*, (2011) recientemente reportó pre-tratamientos ácidos para bagazo de agave (Tabla III.2). En estos tratamientos la hemicelulosa fue completamente hidrolizada, indicando que el bagazo de *Agave tequilana Weber* (BAT) después de la producción de tequila es un material conveniente para los procesos de sacarificación, obteniendo hasta 36.14% de los azúcares fermentables contenidos en la celulosa y hemicelulosa, presentando altos rendimientos de hidrólisis a 147°C y 2% (w/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dado que el bagazo proviene de un proceso de cocción para extraer los azúcares de las piñas para la producción de tequila, es posible que esta cocción previa tenga un papel importante para abrir la matriz lignocelulósica, facilitando la acción del ácido durante la hidrólisis.

En otro estudio, Saucedo-Luna *et al.*, (2010) investigó el sinergismo entre la temperatura, la concentración de ácido y el tiempo de reacción para llevar a cabo la hidrólisis, con el objetivo de lograr una eficiente hidrólisis del material celulósico evitando la descomposición de azúcares. Evaluando el perfil de composición de

monosacáridos a concentraciones de 1% de  $H_2SO_4$  y  $200^\circ C$ , observaron que las concentraciones de xilosa y glucosa alcanzaron un valor máximo y decrecieron al aumentar el tiempo de reacción, así sugiriendo la descomposición de la xilosa y la glucosa, conduciendo probablemente a la formación de furfural. En base a esto, se determinaron las condiciones óptimas de hidrólisis en un primer paso en lote por 10 min,  $150^\circ C$  y 2% w/v de  $H_2SO_4$ , alcanzando al término del proceso 60% de celulosa, 25% de lignina insoluble y no encontrando hemicelulosa. La concentración de azúcares fermentables fue de 25 g/l. En un segundo paso (2% w/v de  $H_2SO_4$ ,  $175^\circ C$  por 10 minutos) a temperatura más alta, obteniendo una concentración de azúcares fermentables de 14 g/l. En este último paso no incrementaron los tiempos de reacción porque se registró una mayor degradación de azúcares con formación de furfurales. Además Saucedo-Luna *et al.*, (2011) reportó que realizando la hidrólisis enzimática a partir de bagazo pre-tratado con ácido, así como utilizando una mezcla de celulasas/ $\beta$ -glucosidasas a partir de la mezcla comercial Celluclast 1.5 L (100unidades/g de sólidos totales) y  $\beta$ -glucosidasas de Novozyme 188 (80 unidades/g sólidos totales) obtuvieron hasta 41.02 g/l de azúcares fermentables.

Existe otro reporte en la literatura del empleo de la hidrólisis enzimática sobre los residuos de *Agave atrovirens* después de la producción de aguamiel (Hernández Salas *et al.*, 2009). En este trabajo se reportó la eficiencia de 5 diferentes tipos de enzimas comerciales para llevar a cabo la hidrólisis enzimática sobre los residuos lignocelulósicos de *A. atrovirens*. Los residuos de este agave que se generan durante la obtención de aguamiel, son de dos tipos: metzal (Mz, residuo obtenido al perforar la piña antes y durante la producción de aguamiel) y metzontete (Mt, residuo de pencas y piña obtenidas al término de la producción). Las condiciones empleadas en los procesos de hidrolisis se muestran en la Tabla III.2 así como las concentraciones de azucares fermentables obtenidas.



**Tablas III.2.** Tratamientos propuestos para residuos de *Agave tequilana* y *Agave atrovirens*.

Hidrólisis ácida				Hidrólisis enzimática				Referencias.
Solución	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	AF (g/l)	Carga %(w/w)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	AF (g/l)	
<sup>a</sup> 2% (w/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	147	25.8	8	72	40	37.80	Saucedo-Luna <i>et al.</i> , 2011.
<sup>a</sup> Primer paso en lote 2% (w/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	150	25					Saucedo-Luna <i>et al.</i> , 2010.
<sup>a</sup> Segundo paso en lote 2% (w/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	175	14					
<sup>1b</sup> 1.2% (v/v) HCl	240	121	<sup>c</sup> 24.82/ <sup>d</sup> 19.45					Hernández-Salas <i>et al.</i> , 2009.
<sup>1b,2b</sup> 2% (w/v) NaOH en autoclave	240	121		20	4	55	<sup>c</sup> 56.37/ <sup>d</sup> 28.44	

**Nota:** <sup>a</sup>*Agave tequilana* Weber, utilizando enzima de Celluclast; <sup>1b</sup>*Agave atrovirens*; <sup>2b</sup>hidrólisis enzimáticas, utilizando las marcas comerciales Viscozyme, Celluclast, Novozyme, Cellubrix y Pulpzyme; <sup>c</sup>*metzal*: material celulósico obtenidos antes y durante la producción de agua miel; <sup>d</sup>*metzontete*: biomasa de agave entero al término de la producción de agua miel. Carga: gramos de enzima/gramos de bagazo seco. AF: azúcares fermentables.

### **III.3. Producción de bio-combustibles a partir de residuos de *Agave tequilana* Weber.**

Durante la producción de tequila se generan en gran cantidad dos residuos, el bagazo y la vinaza. El bagazo, como ya se indicó, es un residuo sólido que se produce durante la extracción del jugo después que las piñas fueron cocidas. Las vinazas son residuos líquidos que se generan al final de la destilación. Por cada litro de tequila producido se generan 1.4 kg de bagazo y 10-12 l de vinazas. En algunas fábricas de tequila, el bagazo es convertido en composta que es utilizado en las plantaciones de agave. En contraste, aproximadamente 80% de las vinazas son descargadas directamente en los cuerpos de agua (ríos, lagos, arroyos y reservorios) ó directamente en el suelo sin recibir un adecuado tratamiento (López López *et al.*, 2010). Debido a que las vinazas tienen un contenido importante de fructuosa y glucosa, se ha investigado la posibilidad de aprovechar las vinazas para la producción de biogás (metano) y bio-hidrógeno.

Espinoza Escalante F. *et al.*, (2009) observaron que el pH, el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la temperatura tienen un fuerte impacto en el comportamiento metabólico microbiano en un reactor semi-continuo, reportando condiciones óptimas de 55°C para producir bio-hidrógeno y 35°C para metano.

En otro estudio utilizando vinazas, Méndez-Acosta *et al.*, (2010) experimentaron en un CSTR (pH de 6.5 a 7.0 y TRH fijo de 14 días), demostrando que es posible mantener una eliminación de 90 a 95% en DQO con una producción de 535 l de biogás por kg de DQO, generando 60% de metano.

Por otra parte, Buitrón y Carvajal (2010) utilizando un reactor secuencial en lote (SBR por sus siglas en inglés), encontraron que la producción de biogás y bio-hidrógeno es afectado por la concentración inicial de la alimentación del reactor, el TRH (12 y 24 h) e intervalos de temperatura (25 y 35°C). De los tres factores, el TRH demostró mayor influencia para la producción de bio-hidrógeno, observando que a cortos tiempos de retención (12 h) se alcanzó una mayor producción (50.5 ml H<sub>2</sub>/L-h). Mientras que el metano es producido simultáneamente con el bio-

hidrógeno con tiempos de retención largos, observando al igual inhibición a bajas temperaturas y altos TRH. Observando en estos experimentos solvento-génesis a bajas temperaturas.

**Tablas III.3.** Investigaciones del aprovechamiento de residuos de la industria del tequila para generación de gas e bio-hidrógeno.

Residuo	Gas	Tasa de producción	Referencia
Vinazas	Bio-hidrógeno	50.5 ml H <sub>2</sub> /l-h	Buitrón y Carvajal, 2010
	Metano	14 l/d	Méndez Acosta <i>et al.</i> , 2010
	Bio-hidrógeno	5.33 ml/l-h	Espinoza Escalante <i>et al.</i> , 2009
	Metano	1.77 ml/l-h	

Así que no se encontraron reportes de aprovechamiento del bagazo de agave para producir bio-hidrógeno y/o biogás. Sin embargo, es una materia prima considerada como un residuo que causa problemas para la industria tequilera y se estima que en 2008 la producción fue de 315 600 toneladas (López López *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, este residuo presenta un gran potencial para la generación de biogás y/o bio-hidrógeno.

En el presente trabajo se propone investigar la producción de azúcares fermentables a partir del bagazo de *Agave tequilana* Weber, empleando pre-tratamientos ácido y alcalinos así como el empleo de agentes oxidantes, seguidos por tratamientos enzimáticos. Así mismo, se evalúa la factibilidad de emplear los licores generados durante los pre-tratamientos y tratamientos enzimáticos para la producción de bio-hidrógeno.

#### **IV. Justificación.**

El incremento de las plantaciones de *Agave tequilana* Weber desde 1999 debido al crecimiento en la demanda de la industria del tequila, registrando hasta 16 000 hectáreas en 2008 (Nuñez *et al.*, 2011) y estimando una generación anual de bagazo de *Agave tequilana* Weber (BAT) en esta industria hasta de 105 000 toneladas (Saucedo-Luna *et al.*, 2011), donde menos del 50% de los azúcares y celulosa disponibles en el agave es utilizado durante la producción de tequila. El bagazo de *Agave tequilana* Weber es un residuo problemático, que potencialmente puede considerarse como una materia prima para la producción de bio-hidrógeno, ofreciendo una práctica compatible con los procesos de producción de la industria tequilera.

#### **V. Hipótesis.**

Los pre-tratamientos de bagazo de *Agave tequilana* Weber producirán licores con un alto contenido de azúcares (hexosas y pentosas) y una cantidad mínima de inhibidores (furfurales y fenoles) que permitirán una fermentación bacteriana adecuada para producir bio-hidrógeno.

#### **VI. Objetivos.**

##### **VI.1. Objetivo general.**

Evaluar el uso del bagazo de *Agave tequilana* Weber para producir bio-hidrógeno.

##### **VI.2. Objetivos específicos.**

- a) Evaluar el efecto de los pre-tratamientos químicos (ácido, alcalino, y agentes oxidantes) sobre la remoción de fibras sobre el bagazo.
- b) Seleccionar los pre-tratamientos químicos más adecuados para el tratamiento enzimático.
- c) Evaluar la factibilidad de producir bio-hidrógeno a partir de los licores obtenidos en un reactor en continuo (CSTR por sus siglas en inglés)

## **VII. Materiales y Métodos.**

### **VII.1. Bagazo de *Agave tequilana* Weber.**

El Bagazo de *Agave tequilana* Weber cocido (BAT) fue colectado en la tequilera La Herradura, procedente de piñas de agaves con edad de entre 7 y 8 años. El BAT fue secado por exposición solar, homogeneizado y cortado en trozos de 2 a 4 cm de largo. Por último fue secado por 12 horas a 60°C en un horno de extracción forzada previo a los pre-tratamientos químicos y tratamientos enzimáticos.

### **VII.2. Pre-tratamientos químicos y tratamientos enzimáticos.**

#### **VII.2.1. Pre-tratamiento ácido.**

El pre-tratamiento ácido fue realizado suspendiendo 5% (w/v) de bagazo de agave en una solución al 2% (v/v) de HCl por 2 horas y 90°C. Al final de la hidrólisis, el licor fue filtrado para separar los residuos de fibras; finalmente esta fibra fue lavada hasta alcanzar un pH de 7. Posteriormente las fibras fueron secadas por 12 horas a 60°C para utilizarlos en los siguientes pre-tratamientos y/o tratamientos.

#### **VII.2.2. Pre-tratamientos alcalinos combinados con agentes oxidantes.**

Después del pre-tratamiento ácido (Hac) se realizaron pre-tratamientos alcalinos combinados con agentes oxidantes. Las hidrólisis se efectuaron con KOH/NaClO<sub>2</sub> (T1) y NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T2). El pre-tratamiento con KOH/NaClO<sub>2</sub> se adaptó de Zuluaga *et al.*, (2009). En el primer paso, el bagazo de agave pre-tratado (Hac) fue suspendido al 4% (w/v) en una solución al 5% (w/v) de KOH por 14 horas a temperatura ambiente; paso siguiente se filtro y posteriormente la fibra filtrada se resuspendió en 1% (w/v) de NaClO<sub>2</sub> por 1 hora a 70°C; finalmente se repitió el primer paso, después de filtrar bajo las mismas condiciones. El pre-tratamiento con NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue adaptado de Curreli *et al.*, (2002). Inicialmente el

bagazo de agave se suspendió (4% w/v) en una solución al 1% (w/v) de NaOH por 24 horas a temperatura ambiente; posteriormente se agregó sin filtrar 0.3% (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se dejó por 24 horas.

### **VII.2.3. Pre-tratamientos independientes de álcalis y agentes oxidantes.**

Para analizar el efecto independientemente de los álcalis y oxidantes sobre el bagazo pre-tratado con solución ácida (Hac) se realizaron los pre-tratamientos T3, T4, T5 y T6. Para todos estos pre-tratamientos el bagazo de agave fue suspendido al 4% (w/v). El pre-tratamiento T3 se realizó con una solución al 5% (w/v) de KOH por 14 horas a temperatura ambiente, mientras que el pre-tratamiento T4 se realizó con una solución de 1% (w/v) de NaClO<sub>2</sub> por 1 hora y 70°C. De la misma manera, se realizó un pre-tratamiento con 1% (w/v) de NaOH por 24 horas a temperatura ambiente (T5) y otro con 0.3% (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas a temperatura ambiente (T6).

### **VII.2.4. Pre-tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Al igual que en los pre-tratamientos descritos anteriormente, el bagazo de agave fue suspendido al 4% (w/v); posteriormente se realizaron las hidrólisis con una solución al 0.3% (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 12 horas a temperatura ambiente, utilizando bagazo sin pre-tratamiento ácido (T7) y con pre-tratamiento ácido (T8). De igual forma se realizaron otros pre-tratamientos en donde se cambió la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1% w/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para T9 y 0.3% w/v para T10).

### **VII.2.5. Pre-tratamientos con activación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

La activación del peróxido fue adaptado de Kubelka *et al.*, (1992). El pre-tratamiento (T12) se realizó con 0.1% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionando 25 ppm de NaMoO<sub>4</sub>. Como paso final se ajustó la solución a un pH de 5 y se realizó el pre-tratamiento por 5 horas (adaptado de Eckert R.C. 1982).

### VII.2.6. Tratamientos enzimáticos.

Al término de todos los pre-tratamientos las fibras fueron filtradas y lavadas hasta alcanzar aproximadamente pH de 7. Después las fibras se colocaron en un horno por 12 horas a 60°C para su posterior tratamiento enzimático. El bagazo pre-tratado se suspendió a 4% (w/v) en solución 50 mM de citrato (solución buffer de citratos) ajustando a pH 4.5. Las hidrólisis fueron realizadas con las enzimas comerciales Celluclast 1.5 L ó Viscozyme (Novozyme). En todos los tratamientos enzimáticos se aplicó la concentración de 1 gramo de enzima por gramo de bagazo en solución buffer de citratos, realizando las hidrólisis por 10 horas a 45°C.

### VII.3. Determinación de actividad enzimática.

El análisis de las actividades enzimáticas fue realizado por medio del método desarrollado por Adney y Baker (2008) y las características que presentó cada marca comercial se presentan en la Tabla VII.1.

**Tabla VII.1.** Características del Celluclast y Viscozyme.

Enzima	PFU/ml <sup>a</sup>	Enzima declarada	Tipo de actividad
Celluclast	82.2	Beta-glucanasa (endo-1,4)	Celulasas
Viscozyme	11.2	Beta-glucanasa (endo-1,3(4)-)	Xilanasas, celulasas y hemicelulasas

<sup>a</sup>Método de Adney y Baker (2008). **PFU:** Actividad enzimática de celulasa total expresada en unidades de papel filtro. PFU es la intercepción calculada en unidades de papel filtro, donde 2.0 mg de azúcares reducidos como glucosa es obtenido a partir de 50 mg de papel filtro bio-degradado por celulasas (4% de conversión) en 60 minutos (IUPAC).

En las hidrólisis enzimáticas se utilizó 1 gramo de enzima por gramo de bagazo. La densidad de cada mezcla enzimática es 1.22 g/ml para Celluclast y 1.21 g/ml en Viscozyme. Entonces se utilizó 0.82 ml de enzima por cada gramo de bagazo pre-tratado o sin pre-tratamiento para las dos mezclas enzimáticas. Por lo tanto, esto representó 82.2 PFU/ gramo de bagazo para Celluclast y 11.2

PFU/gramos de bagazo para Viscozyme. Estos valores se utilizaron en todos los experimentos.

#### VII.4. Estrategia experimental.

La estrategia experimental consistió en 9 etapas, las cuales se describen en la siguiente tabla.

**Tabla VII.2a.** Estrategia experimental por etapas de pre-tratamientos y tratamientos de bagazo.

<b>Etapas</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Pre-tratamientos y tratamientos*</b>
<b>Experimento 1</b>	Evaluar la remoción de fibras presentes en el bagazo empleando pre-tratamientos secuenciales ácido-alcalino/oxidante.	T1 y T2
<b>Experimento 2</b>	Evaluar la remoción de fibras presentes en el bagazo utilizando pre-tratamientos secuenciales ácido/ alcalino y ácido/oxidante independientes.	T3,T4,T5 yT6
<b>Experimento 3</b>	Evaluar el efecto del pre-tratamiento ácido en la obtención de azúcares en el hidrolizado enzimático, empleando tratamiento secuencial H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /enzimático.	T7 y T8
<b>Experimento 4</b>	Evaluar el efecto de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la remoción de fibras del bagazo.	T9, T10 y T11
<b>Experimento 5</b>	Evaluar el efecto de la hemicelulosa residual sobre la acción enzimática de las celulasas.	T10/C y T10/V.
<b>Experimento 6</b>	Analizar el efecto de designificación del pre-tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> acomplejado con molibdato sobre el bagazo de agave cocido.	T12
<b>Experimento 7</b>	Evaluar el efecto de los pre-tratamientos T10 y T12 sobre las hidrólisis enzimáticas utilizando la mezcla enzimática Viscozyme.	T10/V, T12/V y T13/V.
<b>Experimento 8</b>	Diseñar un tratamiento que ayude a eliminar el mayor porcentaje posible de lignina y hemicelulosa para facilitar el ataque enzimático por medio de celulasas.	T14/1, T14/2, T14/C,T14/V y T16/V.
<b>Experimento 9</b>	Evaluar la susceptibilidad del bagazo sin pre-tratamiento al ataque enzimático utilizando la mezcla comercial Celluclast (tratamiento T15/C).	T15/C

\*Claves de pre-tratamientos y tratamientos propuestos referirse ala tabla VII.2b.



**Tabla VII.2b.** Clave de identificación de pre-tratamientos y tratamientos para bagazo de agave.

<b>Clave</b>	<b>Descripción del pre-tratamiento o tratamiento</b>
<b>Hac</b>	Pre-tratamiento ácido en una solución al 2% (v/v) de HCl por 2 horas y 90°C.
<b>T1</b>	Hidrólisis con KOH/NaClO <sub>2</sub> ; 5% (w/v) de KOH por 14 horas a temperatura ambiente; la fibra filtrada se resuspende en 1% (w/v) de NaClO <sub>2</sub> por 1 hora a 70°C.
<b>T2</b>	Hidrólisis con NaOH/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; solución al 1% (w/v) de NaOH por 24 horas a temperatura ambiente; posteriormente se agregó sin filtrar 0.3% (w/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y se dejó por 24 horas.
<b>T3</b>	Pre-tratamiento con una solución al 5% (w/v) de KOH por 14 horas a temperatura ambiente.
<b>T4</b>	Pre-tratamiento con una solución de 1% (w/v) de NaClO <sub>2</sub> por 1 hora y 70°C.
<b>T5</b>	Pre-tratamiento con 1% (w/v) de NaOH por 24 horas a temperatura ambiente.
<b>T6</b>	Pre-tratamiento con 0.3% (w/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 24 horas a temperatura ambiente.
<b>T7</b>	Pre-tratamiento con una solución al 0.3% (w/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 12 horas a temperatura ambiente, utilizando bagazo sin pre-tratamiento ácido.
<b>T7/C</b>	Tratamiento con Celluclast a partir de T7.
<b>T8</b>	Pre-tratamiento con una solución al 0.3% (w/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 12 horas a temperatura ambiente, utilizando bagazo con pre-tratamiento ácido.
<b>T8/C</b>	Tratamiento con Celluclast a partir de T8.
<b>T9</b>	Pre-tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.05% w/v de bagazo sin pre-tratamiento ácido.
<b>T9/C</b>	Tratamiento con Celluclast a partir de T9.
<b>T10</b>	Pre-tratamientos con 0.1% w/v de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de bagazo sin pre-tratamiento ácido.
<b>T10/C</b>	Tratamiento con Celluclast a partir de T10.
<b>T10/V</b>	Tratamiento con Viscozyme a partir de T10.
<b>T11</b>	Pre-tratamiento con 0.3% w/v de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de bagazo sin pre-tratamiento ácido.
<b>T12</b>	Pre-tratamiento con 0.1% (w/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> adicionando 25 ppm de NaMoO <sub>4</sub> .
<b>T12/V</b>	Tratamiento con Viscozyme del bagazo sometido al pre-tratamiento T12.
<b>T13/V</b>	Tratamiento con Viscozyme con bagazo sin ningún pre-tratamiento.
<b>T14/1</b>	Primer paso, pre-tratamiento con 0.1% (w/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / 25 ppm de NaMoO <sub>4</sub> .
<b>T14/2</b>	Segundo paso, pre-tratamiento con ácido con 2% v/v de HCl por 2 horas y 90°C a partir del bagazo pre-tratado T14/1.
<b>T14/C</b>	Tratamiento con Celluclast a partir T14/2.
<b>T14/V</b>	Tratamiento con Viscozyme a partir de T14/2.
<b>T15/C</b>	Tratamiento con Celluclast a partir de material sin pre-tratamiento.
<b>T16/V</b>	Tratamiento con Viscozyme a partir de material sin pre-tratamiento.

### VII.5. Prueba estadística Kruskal-Wallis.

Es un método basado en prueba de intervalos para comparar  $k$  muestras independientes donde  $k \geq 2$ . La prueba consiste en comparar  $k$  muestras aleatorias obtenidas de cada una de las  $k$  posibles poblaciones. Las suposiciones para la prueba son que todas las muestras son muestras aleatorias de sus respectivas poblaciones y las muestras son independientes. Para un análisis de varianza con  $k \leq 3$  tratamientos y tamaños de muestras menores o iguales que 5, la regla de decisión es rechazar  $H_0$  a un nivel de significancia de  $\alpha$  si  $\alpha = P(T \geq T_0) < \alpha$ . Cuando el número de tratamientos es mayor de 3 ó los tamaños de muestras son mayores que cinco, la regla de decisión es rechazar  $H_0$  si  $T_0 \geq X^2_{\alpha, (k-1)}$  (Ramírez y López, 1993). La prueba considera el siguiente juego de hipótesis:

**$H_0$ :** Los tratamientos independientes son iguales.

**$H_1$ :** Al menos un tratamiento independiente es distinto.

## **VII.6. Cinéticas de producción de bio-hidrógeno.**

### **VII. 6.1. Inoculo.**

El inoculo para la producción de bio-hidrógeno fue obtenido de un reactor CSTR para producir metano a partir de vinazas de la industria tequilera (Reactor piloto, CUCEI, Universidad de Guadalajara). El lodo granular fue tratado térmicamente en dos pasos, primero fue expuesto de 60 a 70°C en una hornilla hasta sequedad total y por último tratado a 105°C por 6 horas. Después de secado se pulverizo el lodo en un mortero.

### **VII.6.2. Ensayos en lote para la producción de bio-hidrógeno.**

Los ensayos en lote para producir bio-hidrógeno, se realizaron por triplicados a partir de los licores obtenidos del experimento 8 (T14/1, T14/2, T14/C, T14/V, T15/C y T16/V). Todos los ensayos se efectuaron en botellas serológicas de 120 ml, utilizando un volumen de trabajo de 80 ml, conteniendo 4.5 g SSV/L y medio mineral. Los licores se disolvieron al 50% (v/v) con el medio mineral, ajustando a pH inicial de 7.5. Para finalizar, las botellas se purgaron con nitrógeno por 40 segundos y se colocaron en un agitador orbital horizontal a 150 rpm y 35°C. La composición del medio mineral fue (g/l):  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 4.5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 11.9;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.125;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.015;  $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.025;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.005;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.075.

### **VII.6.3. Ensayos en lote para la producción de bio-hidrógeno de controles para los hidrolizados enzimáticos.**

Para evaluar la producción de bio-hidrógeno a partir de los hidrolizados enzimáticos (T14/C, T14/V, T15/C y T16/V) se incluyeron controles. Para los licores enzimáticos obtenidos a partir de Celluclast (T14/C y T15/C) o Viscozyme (T14/V y T16/V) se incluyeron dos controles. El primero contenía medio mineral más la mezcla comercial Celluclast (Control Celluclast) ó Viscozyme (Control Viscozyme). Las mezclas Viscozyme ó Celluclast estaban diluidas en solución buffer de citratos (50 mM de citratos) a las proporciones que se utilizaron en las hidrólisis enzimáticas con bagazo de agave. El segundo control contenía uno de los estabilizantes, como son sorbitol para Celluclast (Control sorbitol) y sacarosa para Viscozyme (Control sacarosa). La sacarosa y sorbitol fueron diluidos en solución buffer de citratos más el medio mineral a las proporciones que pueden estar presentes en los hidrolizados enzimáticos.

### **VII.6.4. Cuantificación de gas.**

La medición de la producción de gas se realizó por medio de una bureta invertida de 250 ml. El volumen de gas producido se cuantifico sumando el espacio de cabeza obtenido por el desplazamiento de agua acidificada (pH 2.0) por el gas producido y liberado dentro de la bureta desde las botellas serológicas.

### **VII.6.5. Análisis de la cinética de producción.**

Para calcular la producción máxima acumulada de bio-hidrógeno durante el experimento se utilizó la ecuación modificada de Gompertz (3), ajustando la ecuación con el software KaleidaGrap 4.0. Esta ecuación es reportada como un modelo que representa la producción de gas (Zwietering *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2010).

$$H = H_{\max} \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{\max} e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Donde **H** es el total de bio-hidrógeno producido (ml) en el tiempo de ensayo, **H<sub>max</sub>** es la producción máxima acumulada de bio-hidrógeno (ml), **R<sub>max</sub>** es la velocidad máxima de producción de bio-hidrógeno (ml/h), **e** = 2.72, **λ** es el tiempo de fase lag (h) y **t** el tiempo de incubación (Cui *et al.*, 2010).

### VII.6.6. Balance de electrones equivalentes.

El balance de electrones equivalente (**e<sup>-</sup>eq**) se realizó a través de la ecuación 4 modificada propuesta por Carrillo Reyes J. *et al.*, (2012).

$$e^{-}eq(DQO_i) = e^{-}eq(\text{metabolitos}) + e^{-}eq(\text{gas}) + e^{-}eq(\text{glucosa residual}) + e^{-}eq(N.D.) \quad (4)$$

donde **e<sup>-</sup>eq(DQO<sub>i</sub>)**= e<sup>-</sup>eq correspondientes a la DQO en la alimentación (considerando 8 g DQO/e<sup>-</sup>eq); **e<sup>-</sup>eq (metabolitos)**= e<sup>-</sup>eq de cada metabolito producido y determinado; **e<sup>-</sup>eq(gas)**= e<sup>-</sup>eq de H<sub>2</sub> y/o CH<sub>4</sub> producidos; **e<sup>-</sup>eq(glucosa residual)**= e<sup>-</sup>eq de glucosa residual; **e<sup>-</sup>eq(N.D.)**= e<sup>-</sup>eq de productos no determinados, se obtiene como resultado de la diferencia de **e<sup>-</sup>eq(DQO<sub>i</sub>)** y los otros determinados (**e<sup>-</sup>eq de metabolitos + e<sup>-</sup>eq de glucosa residual**). El balance de electrones se realizó a partir de las reacciones de la tabla VIII.3 y es reportado en porcentajes.

**Tabla VII.3.** Estequiometrias para el balance de electrones equivalentes.

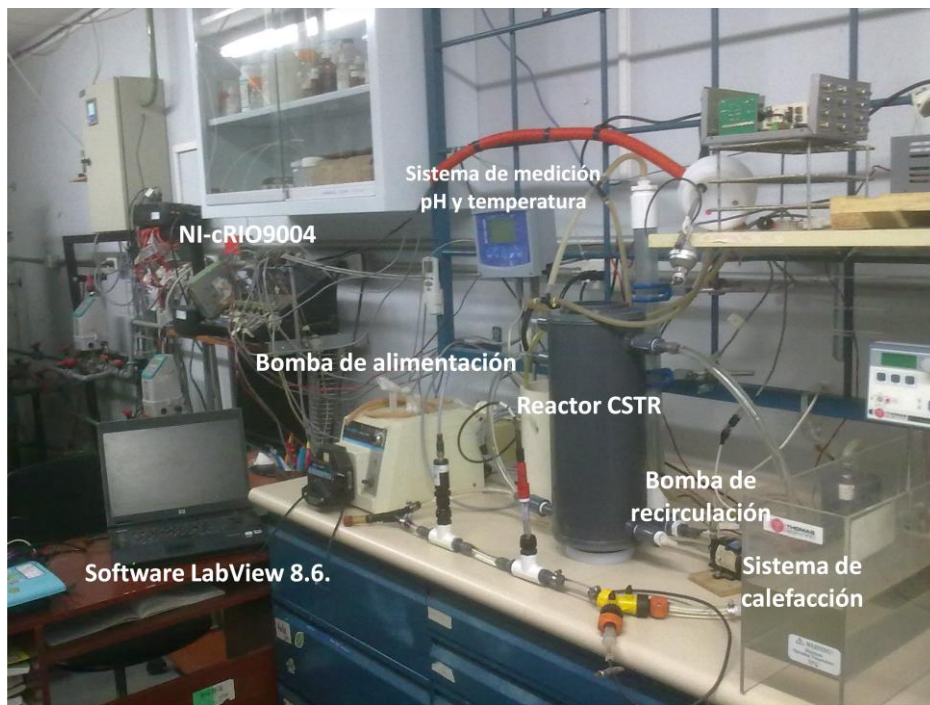
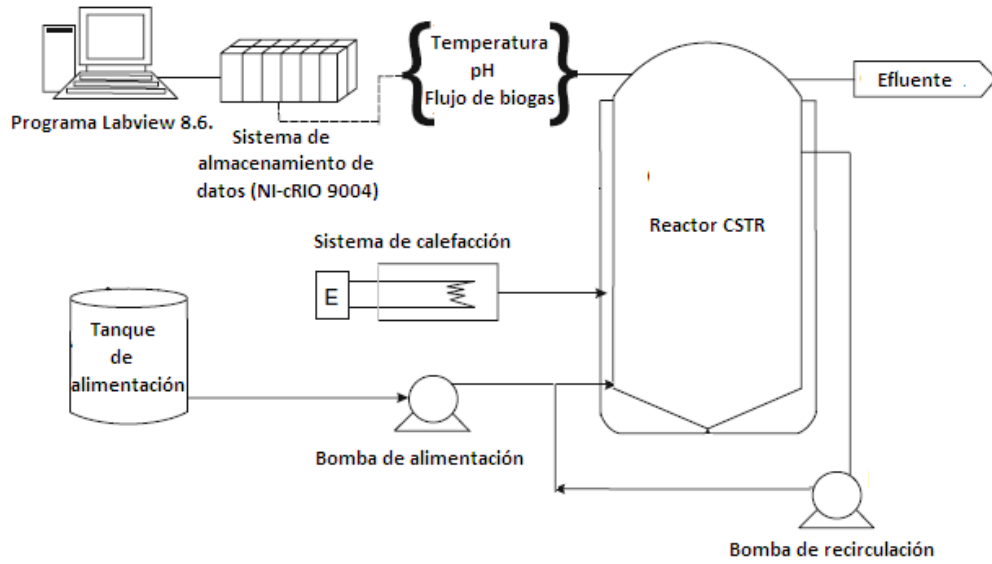
<b>Glucosa</b>	$(1/4)CO_2 + H^+ + e^- = (1/24)C_6H_{12}O_6 + 1/4 H_2O$
<b>Acetato</b>	$(1/8)CO_2 + (1/8)HCO_3^- + H^+ + e^- = (1/8)CH_3COO^- + (3/8)H_2O$
<b>Butirato</b>	$(1/5)CO_2 + (1/20)HCO_3^- + H^+ + e^- = (1/20)CH_3CH_2CH_2COO^- + (7/20)H_2O$
<b>Etanol</b>	$(1/6)CO_2 + H^+ + e^- = (1/12)CH_3CH_2OH + (1/4)H_2O$
<b>Propionato</b>	$(1/7)CO_2 + (1/14)HCO_3^- + H^+ + e^- = (1/14)CH_3CH_2COO^- + (5/14)H_2O$
<b>Lactato</b>	$(1/6)CO_2 + (1/12)HCO_3^- + H^+ + e^- = (1/12)CH_3CHOHCOO^- + (1/3)H_2O$
<b>H<sub>2</sub></b>	$H^+ + e^- = (1/2)H_2$

**Fuente:** Hyung-Sool y Rittmann, 2009.

## **VII.7. Producción de bio-hidrógeno en un reactor CSTR.**

### **VII.7.1. Condiciones de operación.**

El reactor fue inoculado con 4.5 gSSV/L (ver sección VII.6.1.). La producción de bio-hidrógeno se realizó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  en un reactor en continuo (CSTR) con mezclado hidráulico, fabricado de policloruro de vinilo (PVC) con un volumen de trabajo de 3 litros. El pH se ajustó a 5.0, agregando una solución 2N de NaOH a través de una bomba dosificadora (Grunfos Alldos DDC) y la alimentación se realizó con una bomba peristáltica (Masterflex Model 77200-60). El proceso fue instrumentado y automatizado. De modo que el monitoreo y control continuo de pH, temperatura, presión, flujo de gas y alimentación se ejecutó por medio de la programación del software Labview 8.6. y un equipo National Instruments cRIO 9004, permitiendo la adquisición y almacenamiento continuo de datos a través de tarjetas analógicas y digitales.



**Figura VII.1.** Diagrama del proceso en CSTR.  
(Adaptado de Méndez-Acosta *et al.*, 2010).

### VII.7.2. Estrategia experimental.

Se diseñó una estrategia de arranque y otra de evaluación utilizando solamente hidrolizado enzimático del tratamiento T15/C (hidrolizado enzimático de bagazo de agave cocido, sin pre-tratamiento con la mezcla comercial Celluclast) para la producción de bio-hidrógeno en un reactor en continuo CSTR (por sus siglas en inglés). Previo al inicio de las fases de operación, para aclimatar el inóculo, primero se operó en lote con 5 g DQO/L de hidrolizado enzimático con el inóculo por 12 horas. Los detalles de las diferentes fases de operación se muestran en la Tabla VII.3.

**Tabla VII.4.** Estrategia experimental de operación del reactor CSTR.

Etapa	Fases de operación	Tiempo de operación (h)	TRH (h)	Carga orgánica (g/l-h)		Concentración alimentación (g/l)			
				DQO	AT	Hidrolizado enzimático		Glucosa	
						DQO	AT	DQO	AT
Arranque	I	48	6	0.83	0.24	5	1.44	0	0
	II	72	24	0.42	0.27	5	1.44	5	5
Evaluación	III	240	12	0.84	0.54	5	1.44	5	5
	IV	240	24	0.42	0.27	5	1.44	5	5
	V	240	24	0.93	0.27	22.30	6.44	0	0
	VI	240	12	1.86	0.54	22.30	6.44	0	0

**Nota:** DQO: Demanda química de oxígeno y AT: Azúcares totales.

### VII.7.3. Alimentación del reactor

El reactor fue alimentado con hidrolizado enzimático (T15/C) a las concentraciones requeridas por cada fase de operación. Este hidrolizado tenía una concentración inicial de  $37 \pm 3$ g DQO/L y  $10 \pm 3$  g/l de azúcares totales. Para alimentación el hidrolizado fue mezclado con la solución mineral descrita en la sección VII.6.2.



## **VII.8. Métodos analíticos.**

### **VII.8.1. Determinación de azúcares reductores (AR), totales (AT) y demanda química de oxígeno (DQO).**

Estos métodos se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Aquamate UV/VIS a sus respectivas longitudes de onda. Los azúcares reductores se determinaron por el método (DNS) del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). Mientras que los azúcares totales se analizaron por el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y por último la demanda química de oxígeno (DQO) por medio del Standard Methods (APHA, 1998). Para estos métodos, las muestras se determinaron por triplicados y los cálculos de concentración se realizaron a partir de curvas patrón con soluciones de glucosa previamente preparadas.

### **VII.8.2. Determinación de hemicelulosa, celulosa y lignina.**

La determinación se realizó en un equipo analizador de fibras semi-automático (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA) basado en la metodología reportado por Van Soest *et al.*, (1991). En este método se pueden determinar los constituyentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina). En el esquema de Van Soest, se obtienen varios residuos durante el análisis; el primero llamado fibra detergente neutra (FDN), que se obtiene al tratar las fibra con una solución de sulfato lauril sódico a pH neutro. En este procedimiento se eliminan materiales solubilizados por el detergente empleado. La fibra residual se trata con una solución de bromuro de cetil trimetil amonio a pH ácido obteniéndose la fracción de fibra detergente ácida (FDA), en la cual se ha solubilizando la hemicelulosa, obteniendo un desecho (fibra tratada) constituido principalmente de celulosa, lignina, cutina y cenizas (principalmente sílice). En el paso siguiente se realizó un tratamiento del desecho insoluble en FDA con el procedimiento de lignina detergente ácida (LDA) utilizando ácido sulfúrico al 72% disolviendo la celulosa. Finalmente por calcinación del desecho insoluble en LDA se determinó la fracción de lignina cruda.

### **VII.8.3. Determinación de furfurales y fenoles.**

Los compuestos furfurales y fenoles fueron determinados por HPLC por medio de una columna 4.6 x 150 mm 5- micron (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies). La fase móvil estaba compuesta de 8% (v/v) de acetonitrilo aforado con agua. Las condiciones de operación fueron 0.8 ml/min de fase móvil y 40°C. Las muestras y estándares fueron filtrados por medio de una membrana Durapore (Millipore) de 0.22 µm y ajustados a pH de 4.4 antes de su inyección.

### **VII.8.4. Determinación de composición de gas.**

Para determinar la composición de gas (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) se utilizó un cromatógrafo de gases (AGILENT Technologies 6890N) con detector de conductividad térmica (TCD) y columna capilar de 10'x 1/8" x 0.085" Havesep D (Alltech, Deerfield, Illinois USA). Las condiciones de operación fueron 250°C para el puerto de inyección, 60°C en horno, 250°C en el detector (TCD), manteniendo un flujo de 12 ml/min de nitrógeno como gas acarreador.

### **VII.8.5. Determinación de ácidos grasos volátiles (AGVs).**

Las muestras fueron pre-tratadas. Primero se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. Paso siguiente se realizaron diluciones en casos necesarios y finalmente fueron filtradas por medio de una membrana Durapore (Millipore) de 0.22 µm. Las determinaciones se realizaron en un sistema de electroforesis capilar (Agilent 1600A) a través de una columna capilar de 50µm x 80.5 cm x 72 cm (Agilent) y detector de diodo a una longitud de onda de detección de 350 nm. Las condiciones de operación fueron a 20°C y 30 kV de voltaje. Mientras que para los ácidos grasos volátiles (AGVs) provenientes de la operación del reactor CSTR fueron determinados utilizando un HPLC Watters 600 acoplado a un detector 2410-IR.

## **VIII. Resultados y discusión.**

### **VIII.1 Composición del bagazo.**

El análisis de fibras del bagazo mostró que contenían  $22.56 \pm 1.77\%$  w/w de hemicelulosa,  $44.19 \pm 5.66\%$  w/w de celulosa,  $14.86 \pm 4.17\%$  w/w de lignina y  $18.39 \pm 5.21\%$  de compuestos solubles. Esta composición es parecida a la reportada por Saucedo-Luna *et al.*, (2011), ( $20 \pm 1\%$ , w/w de hemicelulosa,  $42 \pm 2\%$  w/w de celulosa,  $15 \pm 1\%$ , w/w de lignina y  $20 \pm 3\%$ , w/w de otros sólidos).

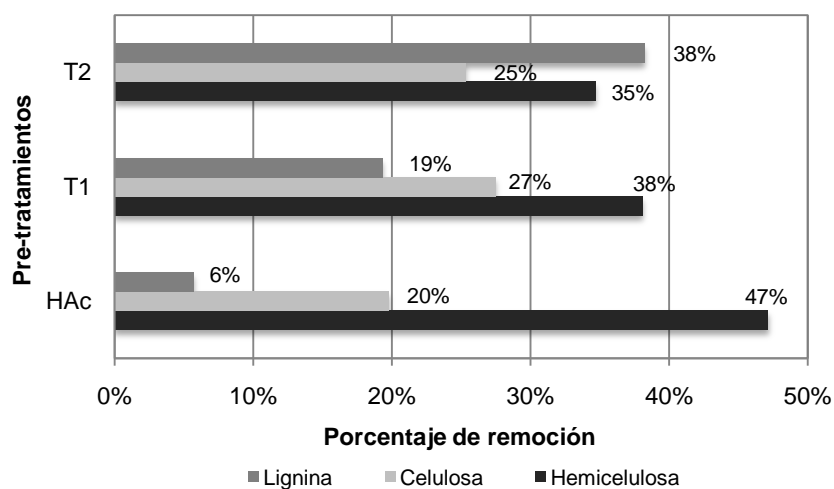
### **VIII.2. Pre-tratamientos.**

Los tratamientos para solubilizar los azúcares presentes en las fibras del bagazo fueron diseñados siguiendo, en la medida de lo posible, los principios propuestos por Taherzadeh y Karimi, (2008) quienes consideran que para alcanzar un tratamiento ideal, debe buscarse minimizar la pérdida de celulosa y hemicelulosa para su posterior hidrólisis enzimática, evitar la formación de posibles inhibidores para la hidrólisis enzimática, consumir menos químicos y utilizar los más baratos, reducir los costos de materiales de construcción de los reactores donde se realizaran los tratamientos, minimizar la demanda de energía y producir menos residuos.

#### **VIII.2.1. Experimento 1: Pre-tratamiento secuencial ácido-alcalino-enzimático.**

El primer grupo de tratamientos evaluó el uso de pre-tratamientos secuenciales ácido-alcalino-enzimático empleados previamente en paja de trigo (Gómez-Tovar *et al.*, 2012; Arreola-Vargas *et al.*, aceptado; Arreola-Vargas *et al.*, revisión). Para acondicionar el bagazo de agave para su posterior tratamiento enzimático se realizó un pre-tratamiento ácido (Hac) con el objetivo de solubilizar la fracción de hemicelulosa (Alvira *et al.*, 2010). Se empleó un pre-tratamiento ácido suave ( $90^{\circ}\text{C}$  y  $2\%$  v/v de HCl, por 2 horas) reportado por Gómez-Tovar *et*

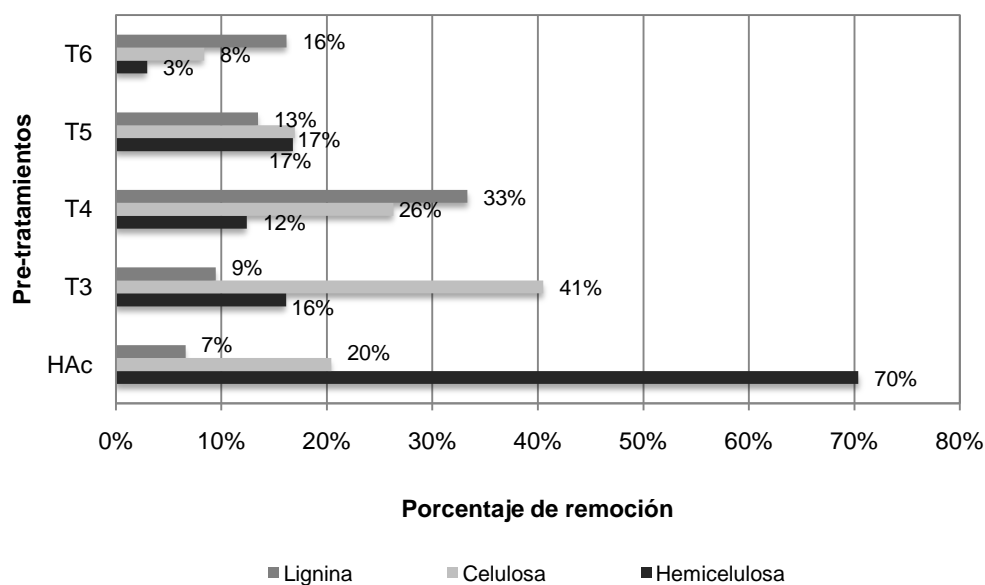
*al.*, (2012). Se obtuvo una remoción de 50-70% de hemicelulosa y 5-8% de lignina (Figura VIII.1.). Durante este pre-tratamiento se observó la formación de compuestos inhibidores en los licores (0.88 ppm de hidroximetilfurfural y 0.06 ppm de furfural). Debido a la baja remoción de lignina se aplicaron otros pre-tratamientos adicionales. Se ha descrito que los pre-tratamientos alcalinos combinados con oxidantes son efectivos para remover lignina (Alvira *et al.*, 2010). En la Figura VIII.1. se muestran los resultados del contenido de fibras después de los pre-tratamientos alcalinos/oxidantes sobre bagazos pre-tratados con ácido (Hac). Estos pre-tratamientos incluyeron hidrólisis con KOH/NaClO<sub>2</sub> (T1) y NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T2) reportados por Gómez-Tovar *et al.*, (2012); Arreola-Vargas *et al.*, (aceptado). Para el tratamiento con KOH/NaClO<sub>2</sub> puedo observarse una solubilidad del 27% de celulosa y 38% de hemicelulosa con una remoción de 19% de lignina, mientras que para el tratamiento con NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se solubilizó 35% de hemicelulosa y 25% de celulosa, pero alcanzando una mayor remoción de lignina de 38%. Estos pre-tratamientos alcalinos/oxidantes para bagazo de agave pre-tratado con ácido, no produjeron compuestos inhibidores (furfurales y fenólicos, datos no mostrados). A pesar que estos pre-tratamientos presentaron una mejor remoción de lignina no minimizaron la pérdida de celulosa y hemicelulosa para su posterior tratamiento enzimático (Taherzadeh y Karimi, 2008).



**Figura VIII.1.** Porcentajes de remoción de fibras en pre-tratamiento ácido y alcalinos/oxidantes. **HAc:** Pre-tratamiento ácido, **T1:** KOH/NaClO<sub>2</sub>, **T2:** NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### VIII.2.2. Experimento 2: Pre-tratamientos con álcalis y agentes oxidantes individuales para remoción de lignina.

Para investigar la contribución de cada álcali (KOH o NaOH) u oxidante ( $\text{NaClO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a la solubilización o pérdida de celulosa observada en los pre-tratamientos T1 y T2, se evaluaron pre-tratamientos que incluyeron el pre-tratamiento ácido seguido del pre-tratamiento con el álcali o el agente oxidante individual (Figura VIII.2). El pre-tratamiento con KOH (T3) presentó la mayor pérdida de celulosa (41%) y el pre-tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (T6) presentó la menor pérdida de celulosa (8%). Aunque el pre-tratamiento con  $\text{NaClO}_2$  (T4) permitió una considerable remoción de lignina (33%), sin embargo produjo una pérdida considerable de celulosa (26%). Los licores obtenidos a partir de estos pre-tratamientos no presentaron compuestos inhibidores (furfurales ó fenólicos, datos no mostrados).

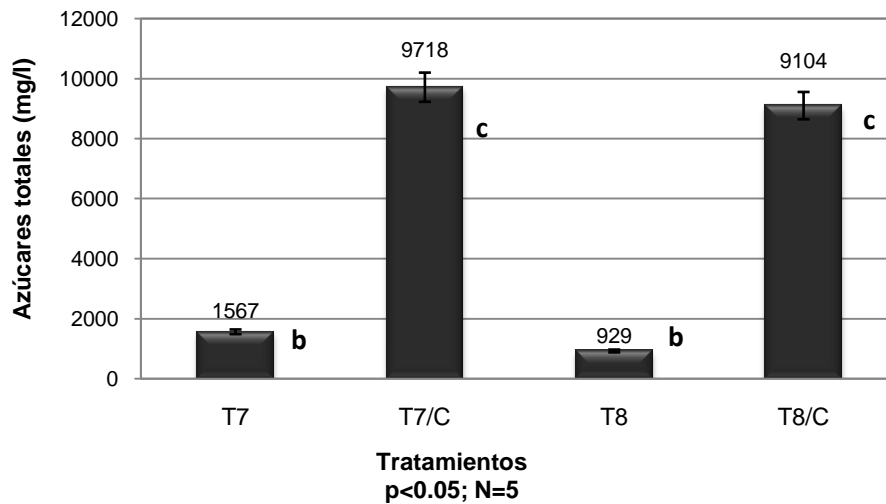
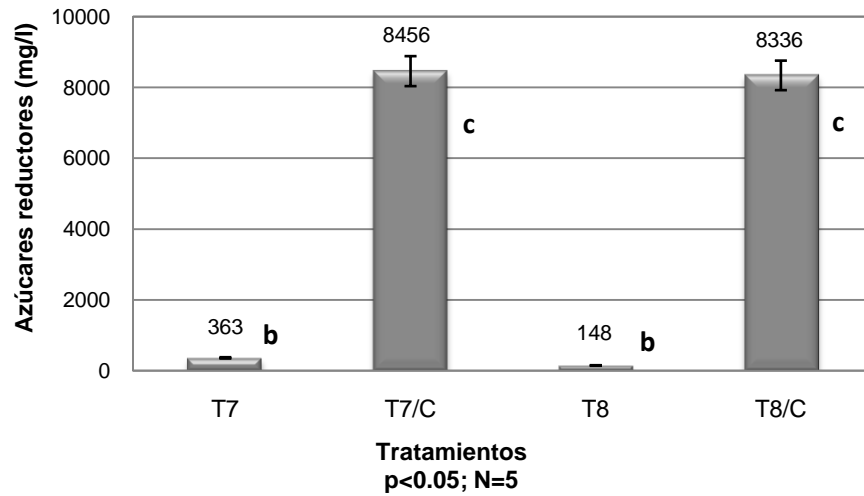


**Figura VIII.2.** Porcentajes de remoción de fibras en pre-tratamientos con álcalis y oxidantes individuales. **HAc:** Pre-tratamiento ácido, **T3:** KOH, **T4:**  $\text{NaClO}_2$ , **T5:** NaOH y **T6:**  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

De lo anterior se deduce que el pre-tratamiento con  $H_2O_2$  (T6), presentó varias ventajas: (1) una baja destrucción de celulosa; (2) no formó inhibidores (datos no mostrados); (3) requirió de una baja demanda energética; (4) el licor generado no fue especialmente ácido ( $pH \sim 4.5$ ) y (5) presentó una concentración relativamente baja de DQO (1539 mg/l). Los dos últimos puntos sugieren que el licor residual producido por el tratamiento con  $H_2O_2$  podría ser neutralizado y posteriormente tratado por medio de digestión convencional anaerobia. Una desventaja fue que la remoción de lignina fue baja (6%)

### **VIII.2.3. Experimento 3: Pre-tratamiento con $H_2O_2$ de bagazo con y sin hidrólisis ácida.**

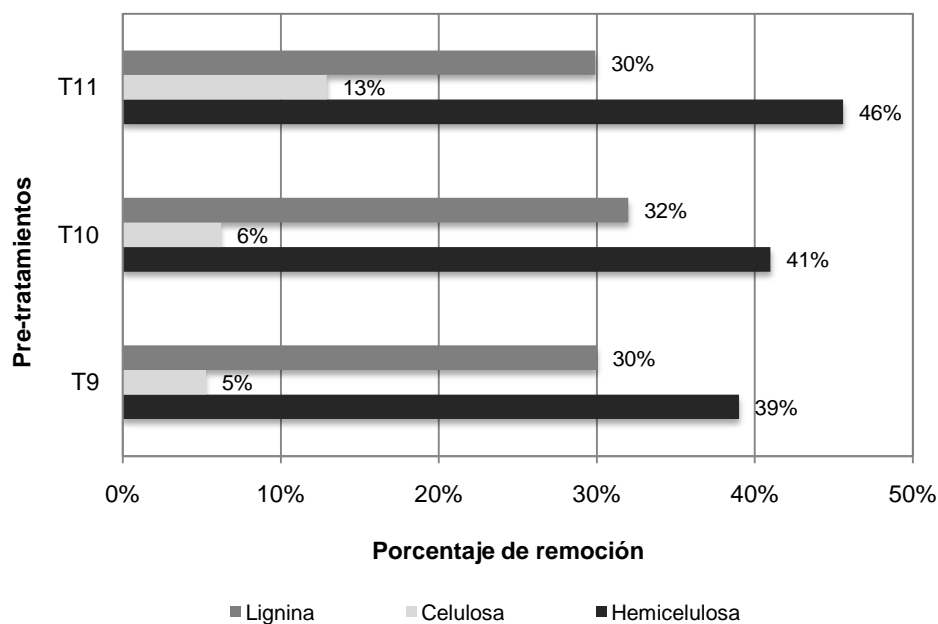
Aunque el pre-tratamiento ácido (Hac) remueve un porcentaje importante de hemicelulosa, produce un licor ácido ( $pH < 2$ ) y requiere una mayor demanda energética ( $90^\circ C$ ). Además los licores ácidos no son adecuados para la producción de bio-hidrógeno (Arreola-Vargas *et al.*, 2013; aceptado). Debido a lo anterior, la eliminación del pre-tratamiento ácido antes del pre-tratamiento con  $H_2O_2$  fue una alternativa importante que se evaluó. Se realizaron dos pre-tratamientos secuenciales, el primero con bagazo sin pre-tratamiento ácido (T7) y el segundo con bagazo pre-tratado con ácido (T8), ambos seguidos por el pre-tratamiento con 0.3% (w/v) de  $H_2O_2$  y posteriormente por el tratamiento enzimático (T7/C y T8/C), utilizando la preparación enzimática comercial Celluclast (Novozyme). Debido a la importancia de eliminar el tratamiento ácido, se decidió comparar estadísticamente las concentraciones de azúcares reductores (AR) y totales (AT), obtenidos después del tratamiento enzimático de las fibras con y sin pre-tratamiento ácido, por medio de una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis que fue realizada con 5 repeticiones. De modo que se encontró que entre los tratamientos enzimáticos no se observaron diferencias significativas entre concentraciones de AR y AT obtenidos a partir de fibras sin (T7) y con (T8) pre-tratamiento ácido (Figura 3). Por lo tanto, no es necesario aplicar el pre-tratamiento ácido (Hac) para acondicionar el bagazo para el pre-tratamiento con 0.3% (w/v) de  $H_2O_2$  y posterior tratamiento enzimático.



**Figura VIII.3.** Prueba estadística para comparar la producción de azúcares entre tratamientos T7 y T8. **T7:** 0.3 % (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin pre-tratamiento ácido, **T8:** 0.3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con pre-tratamiento ácido, **T7/C:** Tratamiento con Celluclast a partir de T7 y **T8/C:** Tratamiento con Celluclast a partir de T8. Prueba Kruskal-Wallis: Azúcares reductores (AR); H (3, N=20)=16.235, p = 0.001; azúcares totales (AT) H (7, N= 40) =35.22732, p =.00001.

#### VIII.2.4. Experimento 4: Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la pérdida de hemicelulosa y celulosa.

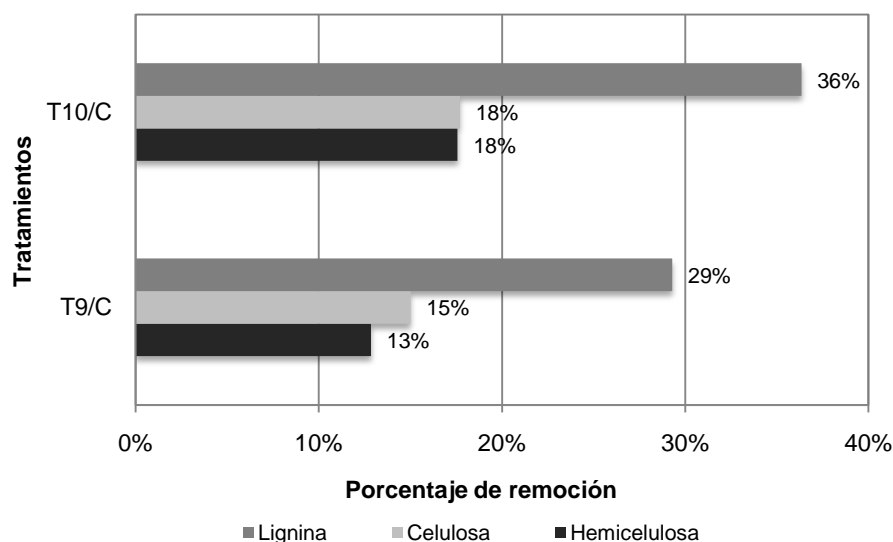
Debido a la pérdida de celulosa y hemicelulosa observada en el pre-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se procedió a evaluar si la disminución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podía ayudar a disminuir dichas pérdidas. Con este fin, se realizaron tres pre-tratamientos secuenciales con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir de bagazo sin pre-tratamiento ácido. Las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ensayadas fueron 0.05%, 0.1% y 0.3 % (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para T9, T10 y T11 respectivamente, seguidos por el tratamiento enzimáticos utilizando Celluclast.



**Figura VIII.4.** Porcentaje de remoción de fibras en tratamientos con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **T9:** 0.05% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **T10:** 0.1 % (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y **T11:** 0.3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



En la Figura VIII.4 puede observarse que los tratamientos con 0.05% y 0.1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T9 y T10) presentaron una remoción de celulosa y hemicelulosa ligeramente menores que con 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo tanto, utilizando una concentración menor o igual a 0.1 % (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se disminuye ligeramente la pérdida de celulosa y hemicelulosa. En los tratamientos enzimáticos posteriores al tratamiento con peróxido T9/C (fibra pre-tratada con 0.05% w/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y T10/C (fibra pre-tratada con 0.1% w/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se observó una remoción semejante de celulosa (15 y 18% respectivamente; Figura VIII.5). Lo anterior podría ser debido a que después de los pre-tratamientos previos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T9 y T10) las fibras presentaron cantidades similares de hemicelulosa remanente (61% para T9 y 59 % para T10; porcentajes calculadas a partir la Figura VIII.4), la cual podría limitarla accesibilidad de las celulasas hacia la celulosa. Por otra parte, también se observó una remoción importante de lignina durante el tratamiento con Celluclast de las fibras pre-tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura VIII.5.). Esta remoción de lignina probablemente se debió al ataque inespecífico de las celulasas sobre la matriz lignocelulósica del bagazo. Este efecto se discute más adelante.



**Figura VIII.5.** Porcentaje de remoción sobre bagazo pre-tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la hidrólisis enzimática. **T9/C:** Tratamiento Celluclast de T9 y **T10/C:** Tratamiento Celluclast de T10.

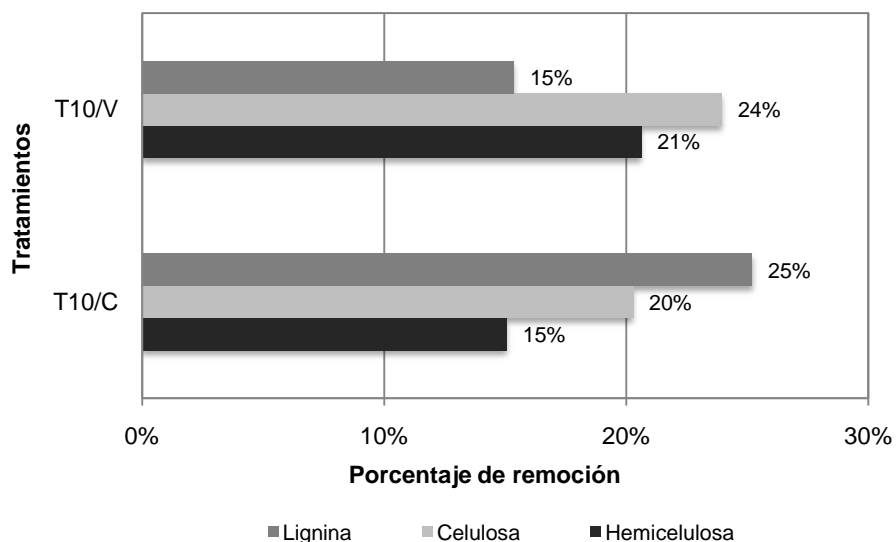
### **VIII.2.5. Experimento 5: Remoción enzimática de hemicelulosa empleando la mezcla comercial Viscozyme.**

El objetivo de este experimento fue comprobar si la remoción de la hemicelulosa residual facilitaría la acción de las celulasas. Dado que el empleo de una hidrólisis ácida fue descartada en el experimento 3, se optó por emplear una preparación enzimática comercial que incluyen hemicelulasas. Se acondicionó el bagazo con 0.1 % w/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pre-tratamiento T10) y posteriormente se realizaron dos hidrólisis enzimáticas, la primera utilizando una mezcla comercial de enzimas con actividad de hemicelulasas y celulasas (Viscozyme, Novozymes, T10/V) y la segunda con una mezcla comercial únicamente con actividad de celulasas (Celluclast, Novozymes, T10/C). Se analizó la remoción de las fibras del bagazo (Figura VIII.6.) y la concentración de azúcares en los respectivos hidrolizados enzimáticos (Figura VIII.7.).

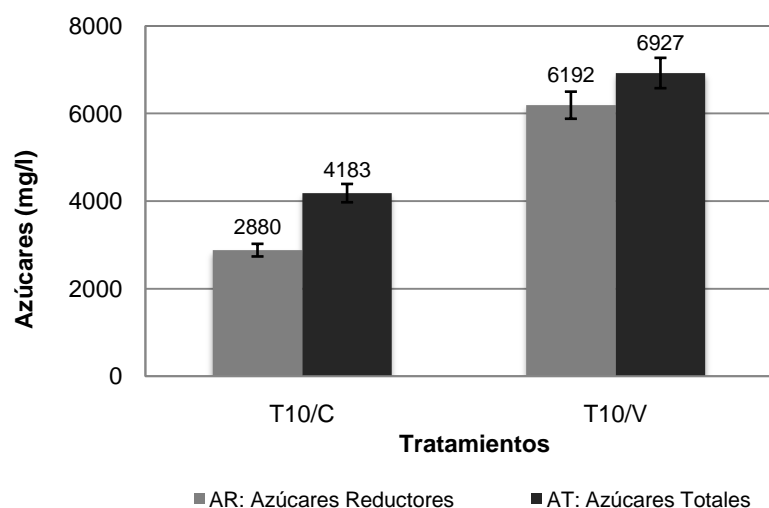
Los tratamientos enzimáticos (T10/C y T10/V), presentaron pequeñas diferencias en la remoción de celulosa y hemicelulosa (Figura VIII.6.). En el tratamiento con Celluclast (T10/C) se observó una remoción de 20% de celulosa y 15% de hemicelulosa aproximadamente, mientras que con Viscozyme (T10/V) se removió un porcentaje ligeramente mayor, 24% celulosa y 21% de hemicelulosa. Estos datos indicaron que la remoción enzimática de hemicelulosa con Viscozyme no fue muy efectiva y además, que dicha remoción no facilitó la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Por otra parte, se observó una remoción total de carbohidratos (celulosa más hemicelulosa) ligeramente mayor con Viscozyme (45%) que con Celluclast (35%). Esto se reflejó en mayores concentraciones de azúcares reductores (AR) y totales (AT) obtenidos con Viscozyme (Figura VIII.7.). Sin embargo, las concentraciones de azúcares observadas con Viscozyme fueron alrededor del doble de las concentraciones obtenidas con Celluclast, lo cual no es consistente con la modesta diferencia en remoción total de carbohidratos mencionada anteriormente. Esta discrepancia puede en parte ser explicada si se considera que

durante la hidrólisis enzimática ambas enzimas mostraron capacidad para remover lignina de forma inespecífica (Figura VIII.6.). Los productos de degradación enzimática de la lignina pudieron interferir en la determinación de azúcares reductores y totales, dando valores sobrestimados de las concentraciones de azúcares. Probablemente este ataque enzimático inespecífico sobre la lignina se debe a la desnaturalización de la lignina durante el proceso de cocción de la piña de agave, lo que permite el ataque inespecífico de las celulasas y hemicelulasas. Un indicio de que esto es posible, es la observación de que las enzimas celulolíticas se pueden adsorber reversible y/o irreversiblemente a la lignina de acuerdo a lo reportado por Wang *et al.*, (2012). Sin embargo, no se encontró en la literatura evidencia de que esta adsorción sobre la lignina cause su hidrólisis.



**Figura VIII.6.** Efecto de dos tipos de preparaciones enzimáticas (Celluclast y Viscozyme) sobre la remoción de fibras de bagazo pre-tratado con 0.1 % (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **T10/C:** Tratamiento con Celluclast y **T10/V:** Tratamiento con Viscozyme.

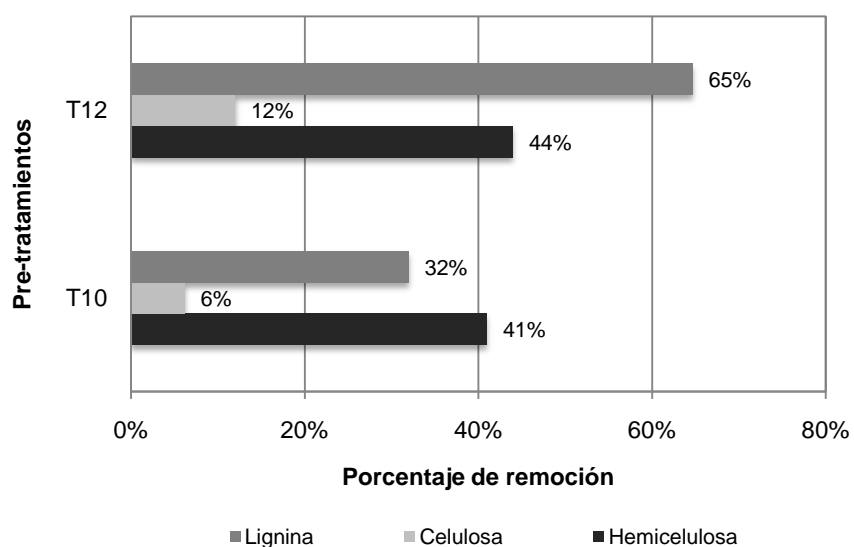


**Figura VIII.7.** Concentración de azúcares producidos durante los tratamientos enzimáticos (Celluclast y Viscozyme) del bagazo pre-tratado con 0.1 % (w/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **T10/C:** Tratamiento con Celluclast y **T10/V:** Tratamiento con Viscozyme.

### VIII.2.6. Experimento 6: Incremento de la remoción de lignina por medio de la activación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con molibdato.

Dado que los porcentajes de remoción de polisacáridos totales durante los tratamientos enzimáticos fueron modestos (35% con Celluclast y 45% para Viscozyme) se buscó incrementar la remoción de lignina, antes del tratamiento enzimático, para facilitar la acción de las celulasas y hemicelulasas. Con este objetivo, se encontró en la literatura que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> complejoado con molibdeno tiene la capacidad de degradar selectivamente a la lignina (deslignificación) con poca o nula degradación de carbohidratos Kubelka *et al.*, (1992) reportó la habilidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> complejoado con molibdato (formando óxidos de molibdato) para deslignificar las pulpas para la producción de papel. Este efecto catalítico fue atribuido a la habilidad del molibdato para formar complejos di-peroxo bajo condiciones ácidas (Suchys-Demetris, 2001).

En este experimento se comparó el efecto de un pre-tratamiento utilizando solamente 0.1% (w/v) de  $H_2O_2$  (T10) contra un pre-tratamiento con la misma concentración de  $H_2O_2$  pero acompañado con molibdato (T12). Comparando los pre-tratamientos aplicados con  $H_2O_2$  y  $H_2O_2$ /molibdato (T10 y T12 respectivamente), el pre-tratamiento con  $H_2O_2$ /molibdato fue más eficiente para remover lignina (65%) que el pre-tratamiento con solo  $H_2O_2$  (32%) (Figura VIII.8.), pero presentó una remoción ligeramente mayor de celulosa (12%, T12 vs. 6% T10) y de hemicelulosa (44%, T12 vs. 41%, T10). Este experimento confirmó el efecto que tiene el peróxido complejo con molibdato reportado para la industria papelera (Kubelka *et al.*, 1992), ya que permitió una mayor remoción de lignina del bagazo, sin afectar de forma importante la remoción de la celulosa, aunque removió de forma importante a la hemicelulosa.



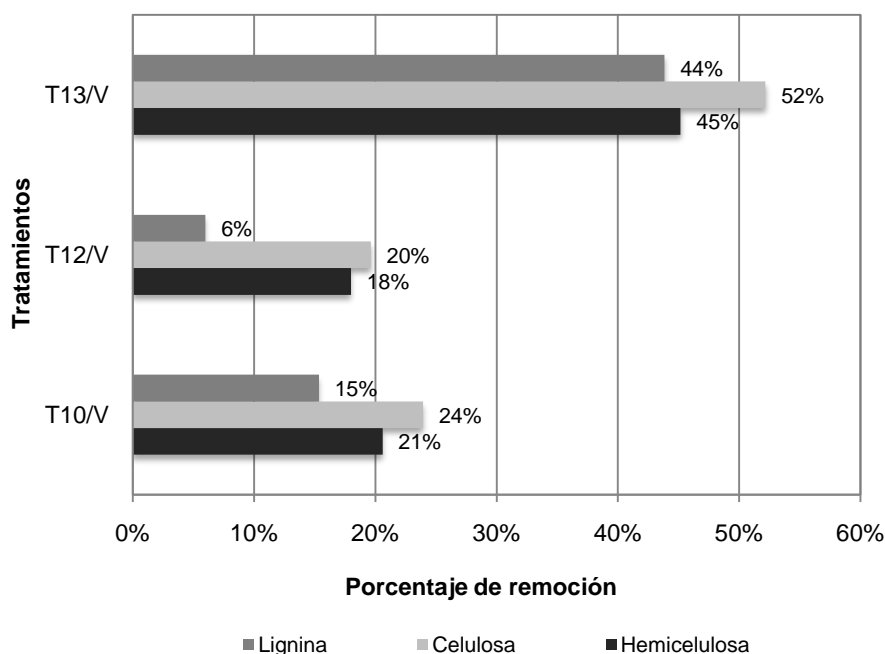
**Figura VIII.8.** Porcentaje de remoción de fibras durante el pre-tratamiento del bagazo de agave con  $H_2O_2$  y  $H_2O_2/NaMoO_4$ . **T10:** 0.1% (w/v)  $H_2O_2$  y **T12:** 0.1% (w/v)  $H_2O_2/25$  ppm  $NaMoO_4$ .

### **VIII.2.7. Experimento 7: Hidrólisis enzimática con la mezcla comercial Viscozyme de bagazo pre-tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato.**

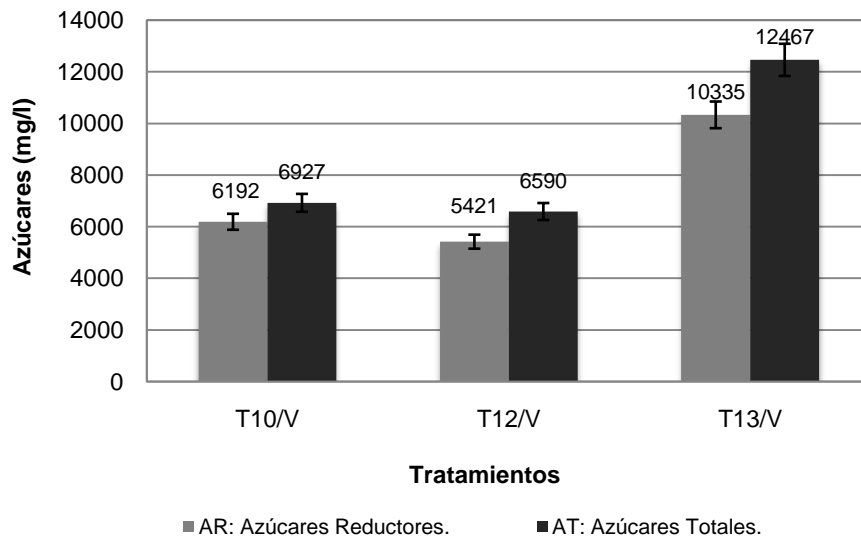
Dado que se encontró en el experimento 6 que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato (T12) removi6 en mayor grado la lignina (Figura VIII.8.), se procedi6 a evaluar si esta mayor remoci6n de lignina se reflejaba en una mayor solubilizaci6n de la celulosa durante el tratamiento enzimático. Para evaluar esto se procedi6 a realizar la hidrólisis enzimática del bagazo pre-tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato empleando Viscozyme (T12/V). En estos experimentos solo se utiliz6 la mezcla comercial Viscozyme, ya que en el experimento 5 se encontr6 que dicha enzima hidroliz6 ligeramente mäs a la hemicelulosa y celulosa, en comparaci6n con el Celluclast (Figura VIII.6.) y ademäs produjo una mayor concentraci6n de azúcares (reductores y totales) en los licores del hidrolizado (Figura VIII.7.).

Se incluy6 un control que consisti6 en la hidrólisis enzimática a partir de bagazo pre-tratado solamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T10/V). Tambi6n se realiz6 otro control que consisti6 en la hidrólisis enzimática del bagazo sin ningú pre-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T13/V). Este control se realiz6 para evaluar la capacidad del Vizcozyme para solubilizar a la hemicelulosa y celulosa presentes en el bagazo sin ningú pre-tratamiento. En la Figura VIII.9. se observa que la remoci6n de celulosa y hemicelulosa durante la hidrólisis enzimática es aproximadamente igual tanto para el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (T10/V) como para el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato (T12/V), a pesar de que las fibras remanentes en el bagazo despu6s de los pre-tratamientos T10 (pre-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y T12 (pre-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato) presentaban diferentes porcentajes de lignina remanente (68% para T10 y 35% sobre T12). Los porcentajes de lignina remanente indicados se calcularon a partir de los datos de la Figura VIII.8. Lo anterior mostr6 claramente que no existieron diferencias importantes en la remoci6n enzimática de celulosa y hemicelulosa a partir de fibras de bagazo con diferente contenido de lignina. Sin embargo, se observ6 una mayor remoci6n de hemicelulosa y celulosa cuando se emple6 bagazo sin pre-tratamiento (Figura VIII.9., T13/V). Una posible explicaci6n

de la menor efectividad de la hidrólisis enzimática sobre el bagazo pre-tratado con  $H_2O_2$  o con  $H_2O_2$ /molibdato sería la presencia de compuestos fenólicos remanentes en el bagazo pre-tratado, generados durante la hidrólisis de la lignina los cuales se han reportado como inhibidores de la actividad enzimática (Tejirian y Xu, 2011). En la Figura VIII.10. se observa que la solubilización de los azúcares (reductores y totales) durante la hidrólisis enzimática también fue muy similar en el tratamiento enzimático a partir de bagazo pre-tratado con  $H_2O_2$  (T10/V) y  $H_2O_2$ /molibdato (T12/V). Mientras que en la hidrólisis enzimática del bagazo sin pre-tratamiento (T13/V) presentó una mayor concentración de azúcares (reductores y totales). Estos resultados indicaron que probablemente el uso del  $H_2O_2$  para acondicionar el bagazo antes de la hidrólisis enzimática no era necesario, lo cual se evaluó como parte del siguiente experimento.



**Figura VIII.9.** Porcentaje de remoción enzimática de fibras del bagazo pre-tratado con  $H_2O_2$  y con  $H_2O_2$ /molibdato. **T10/V:** Tratamiento con Viscozyme del bagazo sometido al pre-tratamiento T10 ( $H_2O_2$ ). **T12/V:** Tratamiento con Viscozyme del bagazo sometido al pre-tratamiento T12 ( $H_2O_2$ /molibdato) y **T13/V:** Bagazo sin pre-tratamiento



**Figura VIII.10.** Concentración de azúcares producidos durante la hidrólisis enzimática del bagazo pre-tratado con  $H_2O_2$  o con  $H_2O_2$ /molibdato. **T10/V:** Tratamiento con Viscozyme del bagazo sometido al pre-tratamiento T10 ( $H_2O_2$ ). **T12/V:** Tratamiento con Viscozyme del bagazo sometido al pre-tratamiento T12 ( $H_2O_2$ /molibdato) y **T13/V:** Tratamiento con Viscozyme con bagazo sin ningún pre-tratamiento.

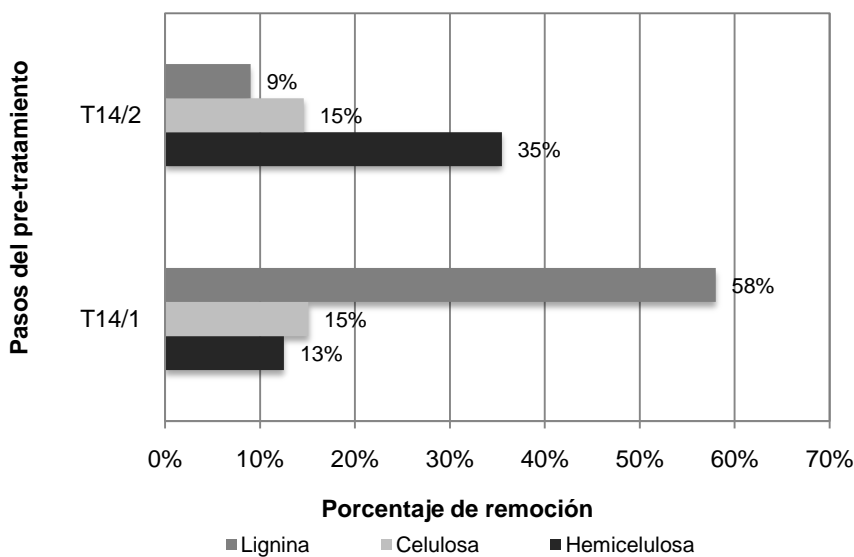
### VIII.2.8. Experimento 8: Hidrólisis enzimática con la mezcla comercial Viscozyme de bagazo sin y con pre-tratamiento secuencial ( $H_2O_2$ /molibdato-HCl).

En un último experimento para evaluar si la remoción de hemicelulosa y de lignina permitían obtener una fibra de celulosa más susceptible al ataque de las celulasas, se diseñó un tren de tratamiento, basado en los resultados de pre-tratamientos anteriormente probados. El tratamiento secuencial (T14) incluyó tres pasos, los cuales se describen a continuación. Primero, se realizó un pre-tratamiento con la activación del peróxido con molibdato (condiciones iguales a T12) para eliminar el mayor porcentaje posible de lignina. En el segundo pre-tratamiento (T14/2), se utilizaron las condiciones del pre-tratamiento ácido del experimento 1 (2% de HCl, 90°C y 2 horas), para remover el mayor porcentaje posible de hemicelulosa. Aunque el uso de la hidrólisis ácida se había descartado



anteriormente, esta hidrólisis mostró ser más efectiva que la hemicelulasa para remover la hemicelulosa. Por último se realizó un tratamiento enzimático utilizando Viscozyme (T14/V). Paralelamente se realizó un tratamiento control con la finalidad de evaluar si era necesario el tren de pre-tratamiento T14/1 – T14/2. Para esto, se incluyó una hidrólisis enzimática con Viscozyme del bagazo sin ningún pre-tratamiento previo. A este control se le denominó T16/V.

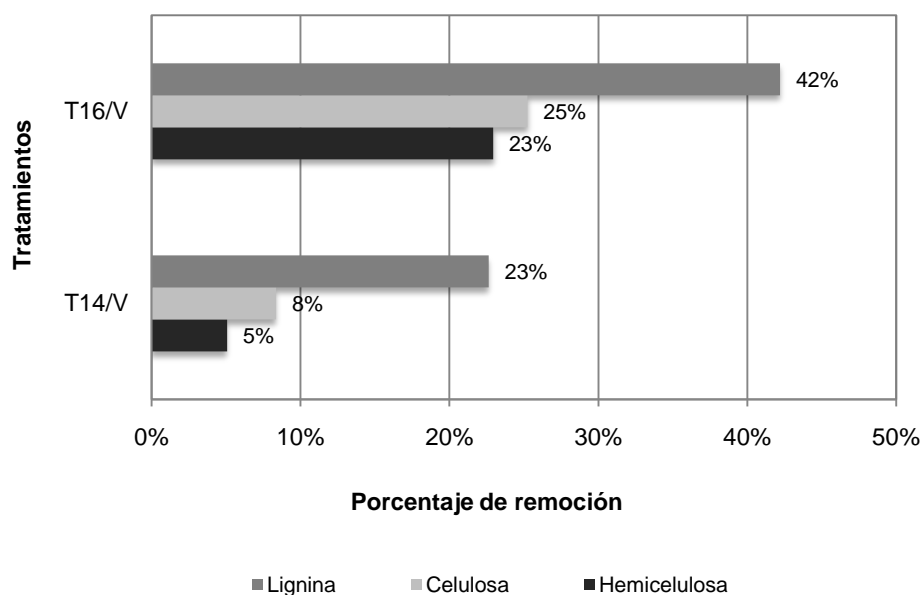
En la Figura VIII.11. se puede observar que en el primer pre-tratamiento (T14/1) se presentó una remoción importante de lignina (58%) como era de esperarse. En el segundo pre-tratamiento (T14/2) se alcanzó una buena remoción del 35% de hemicelulosa. Sin embargo, un inconveniente de estos dos pre-tratamientos fue que en cada uno de ellos se observó 15% de remoción de celulosa.



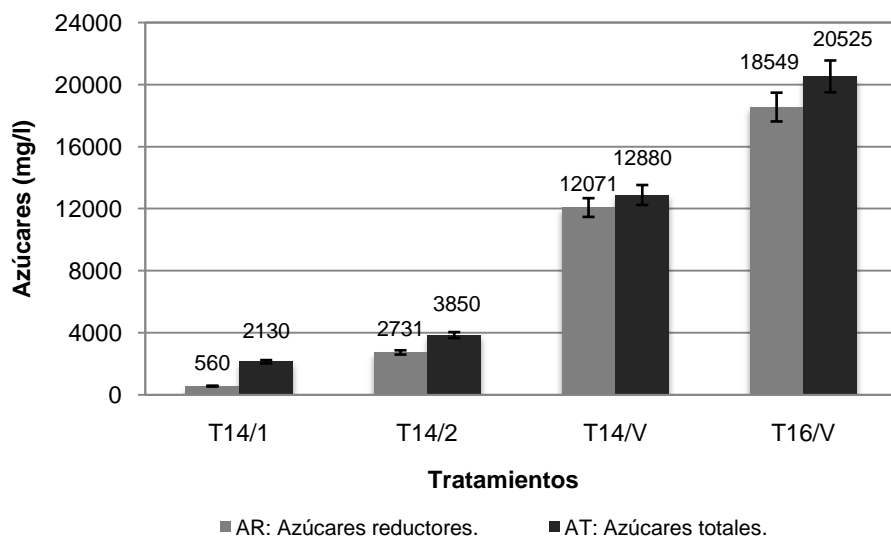
**Figura VIII.11.** Porcentaje de remoción de fibras durante el pre-tratamiento del bagazo de agave con  $H_2O_2/NaMoO_4$  seguido de HCl. **T14/1:** Primer paso, pre-tratamiento con 0.1% (w/v)  $H_2O_2/25$  ppm de  $NaMoO_4$  y **T14/2:** Segundo paso, pre-tratamiento ácido con 2% v/v de HCl.

Durante la hidrólisis enzimática con Viscozyme (Figura VIII.12.) se observó que la remoción de celulosa y hemicelulosa fue mayor en el bagazo sin pre-tratamiento (25% y 23%) que en el bagazo pre-tratado (8% y 5% respectivamente). La mayor remoción de celulosa y hemicelulosa observada en el control T16/V confirmó la observación hecha en el control del experimento 7 (T13/V), la cual indicaba que no era necesario acondicionar las fibras con  $H_2O_2$  para obtener una buena solubilización de los azúcares presentes en el bagazo. El control del experimento 8 (T16/V) también indicó que no fue necesaria la hidrólisis ácida ni el tratamiento con  $H_2O_2$ /molilbato para acondicionar el bagazo. Como ya se mencionó, esta mayor susceptibilidad del bagazo al ataque enzimático puede deberse a la cocción de las piñas del agave, como primer paso en el proceso de obtención del tequila. Este proceso de cocción puede abrir la matriz de la pared celular haciendo más accesible las enzimas hacia los carbohidratos. Por otra parte, durante el pre-tratamiento del bagazo para remover lignina, se pudieron haber liberado compuestos fenólicos, los cuales como ya se mencionó pueden presentar un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática (Tejirian y Xu, 2011).

Las mayores concentraciones de azúcares reductores y totales se registraron en el hidrolizado del tratamiento control (T16/V) lo cual fue consistente con la mejor remoción de celulosa y hemicelulosa observada. Por otra parte, en los dos pre-tratamientos (T14/1 y T14/2) se presentaron las menores concentraciones de azúcares (Figura VIII.13.).



**Figura VIII.12.** Porcentaje de remoción enzimática de fibras del bagazo de agave pre-tratadas con  $H_2O_2/NaMoO_4$  seguido de HCl. **T14/V:** Tratamiento con Viscozyme a partir de T14/2 y **T16/V:** Tratamiento con Viscozyme a partir de material sin pre-tratamiento.

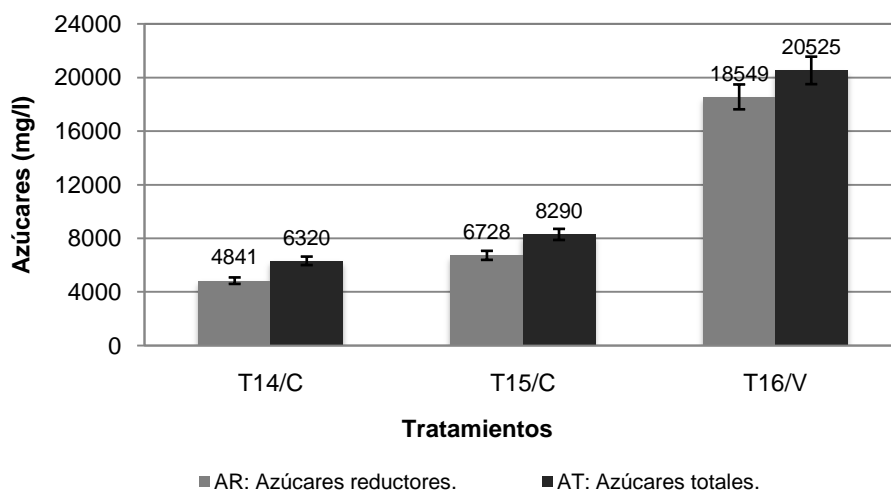


**Figura VIII.13.** Concentración de azúcares de los pre-tratamientos con  $H_2O_2/NaMoO_4$ , HCl y las hidrólisis enzimáticas subsecuentes. **T14/1:** Primer paso, pre-tratamiento con 0.1% (w/v)  $H_2O_2/25$  ppm de  $NaMoO_4$ , **T14/2:** Segundo paso, pre-tratamiento ácido con 2% de HCl, **T14/V:** Tratamiento con Viscozyme a partir de T14/2 y **T16/V:** Tratamiento con Viscozyme a partir de material sin pre-tratamiento.

### **VIII.2.9. Experimento 9: Hidrólisis enzimática con la mezcla comercial Celluclast de bagazo sin y con pre-tratamiento secuencial ( $H_2O_2$ /molibdato-HCl).**

En el experimento 8 se encontró que el bagazo sin pre-tratamiento era susceptible a la hidrólisis enzimática con Viscozyme. En el experimento 9 se evaluó si el bagazo sin pre-tratamiento con  $H_2O_2$  presentaba la misma susceptibilidad al ataque enzimático utilizando la mezcla comercial Celluclast (tratamiento T15/C). Además, también se evaluó el tratamiento enzimático con Celluclast (T14/C) sobre el bagazo pre-tratado con  $H_2O_2$ /molibdato seguido de una hidrólisis acida (T14/1, T14/2, experimento 8).

La Figura VIII.14. muestra los resultados de concentración de azúcares obtenidas de los dos experimentos descritos anteriormente. En dicha Figura también se muestran, con propósitos de comparación, las concentraciones de azúcares obtenidas durante el tratamiento con Viscozyme del bagazo sin pre-tratar (datos del experimento 8). Se observaron concentraciones mayores de azúcares en la hidrólisis con Celluclast del bagazo sin pre-tratamiento (T15/C) que las alcanzadas con el bagazo pre-tratado (T14/C). Sin embargo, si se comparan las concentraciones de azúcares obtenidos a partir del material sin pre-tratar hidrolizado con Celluclast (T15/C) con las obtenidas a partir del material sin pre-tratar hidrolizado con Viscozyme (T16/V) del experimento 8, se observan mayores concentraciones de azúcares en los licores de la hidrólisis con Viscozyme. Este experimento confirmó que el proceso de cocción hace más susceptible al bagazo al ataque enzimático, por lo que no se requiere un pre-tratamiento, y que la enzima que presentó mayor eficiencia de hidrólisis para la obtención de azúcares es la mezcla comercial Viscozyme.



**Figura VIII.14.** Comparación de la concentración de azúcares obtenidas durante la hidrólisis enzimática con Celluclast y Viscozyme, utilizando material sin pre-tratamiento (T/15C y T16V) y con pre-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Mo seguido de HCl (T14/C). **T14/C:** Tratamiento con Celluclast a partir del bagazo pre-tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Mo seguido de HCl **T15/C:** Tratamiento con Celluclast a partir de material sin pre-tratamiento y **T16/V:** Tratamiento con

### VIII.3. Pruebas de producción de bio-hidrógeno.

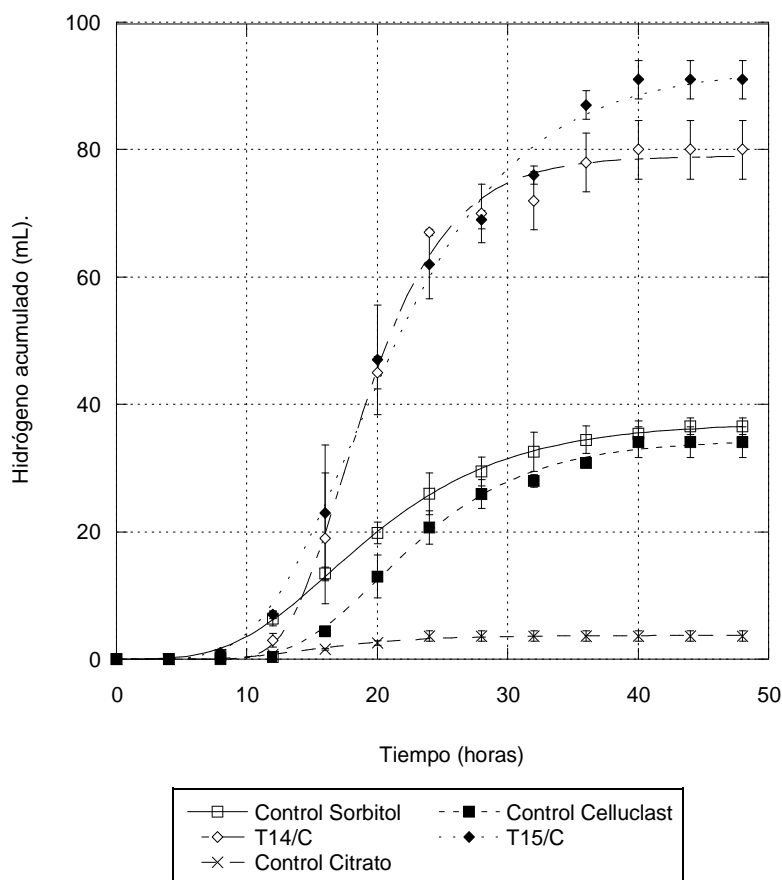
#### VIII.3.1. Cinética de producción.

Dado que las concentraciones de azúcares fueron más altas en los licores de los hidrolizados enzimáticos de los experimentos 8 y 9 (T14/C, T14/V, T15/C y T16/V), se esperaba que la producción de bio-hidrógeno ocurriera sin problema. Sin embargo, no era claro si el hidrolizado de los pre-tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato (T14/1) y el hidrolizado ácido (T14/2) podrían producir bio-hidrógeno. Debido a lo anterior, se realizaron ensayos en lote para evaluar la factibilidad de producir bio-hidrógeno a partir de los licores anteriormente mencionados. Se encontró que los licores obtenidos durante los pre-tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato y con HCl no produjeron bio-hidrógeno bajo las condiciones empleadas. Esto probablemente se debió a la presencia de compuestos que

inhibieron la actividad enzimática (furfurales en el pre-tratamiento con HCl y compuestos fenólicos en el pre-tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/molibdato). Por el contrario, se observó producción de bio-hidrógeno a partir de los licores obtenidos de los tratamientos enzimáticos. Los datos de las cinéticas de producción de bio-hidrógeno se muestran en las Figuras VIII.15. y VIII.16., mientras que los parámetros obtenidos con el ajuste de la ecuación de Gompertz se muestran en la Tabla VIII.1. En todos los hidrolizados enzimáticos (T14/C, T14/V, T15/C y T16/V) se obtuvo una  $R^2 > 0.98$ . Los valores de  $H_{max}$  en ml para los controles, también fueron calculados con la ecuación de Gompertz.

Con respecto a los licores obtenidos durante las hidrólisis enzimática con Celluclast, la producción de bio-hidrógeno más alta se obtuvo a partir del hidrolizado del bagazo sin pre-tratamiento (T15/C) alcanzando una producción máxima acumulada de bio-hidrógeno ( $H_{max}$ ) de 92.66 ml, mientras que para el hidrolizado del bagazo pre-tratado (T14/C) se obtuvo una  $H_{max}$  de 78.98 ml. Esta diferencia es consistente con la diferencia observada en la concentración de azúcares en ambos hidrolizados enzimáticos (Figura VIII.14.). Las producciones máximas acumuladas ( $H_{max}$ ) de los controles fueron de 34.43 ml para Control Celluclast, 37.08 ml para Control Sorbitol y 3.76 ml el Control Citratos. Los anteriores datos indican que la solución buffer de citratos contribuyó aproximadamente con un 10% a la producción de bio-hidrógeno observada en el Control Celluclast, mientras que el 90% del bio-hidrógeno producido por el Control Celluclast provino del sorbitol, es decir 31 ml ( $34.43 \times 0.9$ ). Sin embargo la producción de bio-hidrógeno en el Control Sorbitol fue de 37.08 ml. Esta discrepancia probablemente se debe a inexactitudes en la realización de las diluciones. Por lo tanto en la producción de bio-hidrógeno del Control Celluclast, existe una contribución importante de bio-hidrógeno producido por sorbitol y a partir de la solución buffer de citratos. Considerando el valor de  $H_{max}$  de 37.08 ml del Control Celluclast, entonces dicha contribución representaría el 40.0% de bio-hidrógeno producido a partir del hidrolizado enzimático del bagazo sin pre-

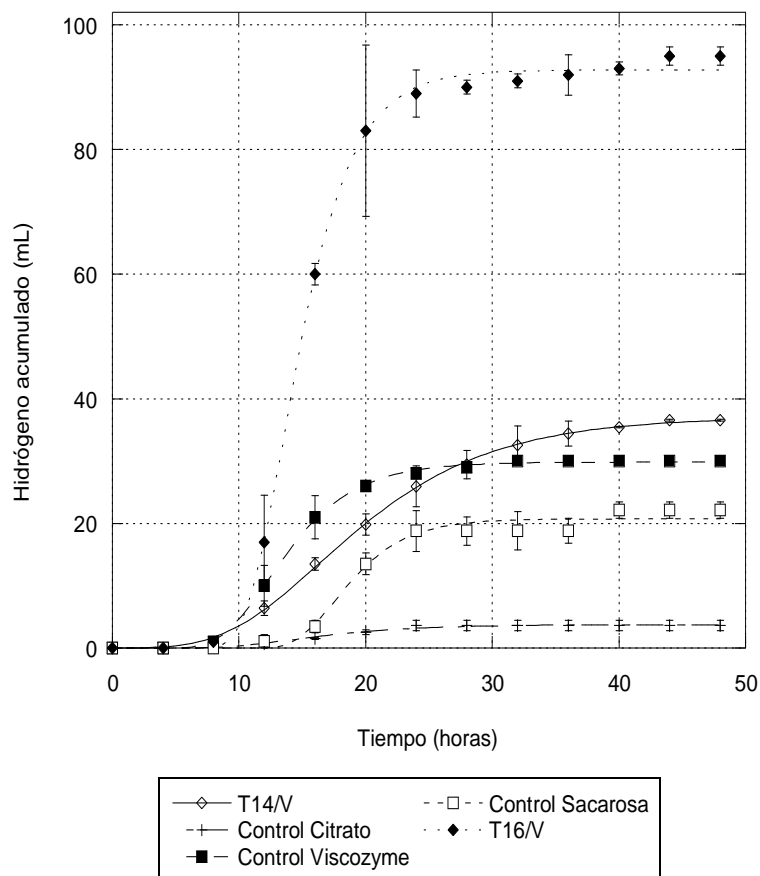
tratamiento (T15/C). Mientras que constituiría el 46.9% de bio-hidrógeno producido a partir del hidrolizado de bagazo pre-tratado (T14/C).



**Figura VIII.15.** Cinética de producción de bio-hidrógeno a partir de los hidrolizados enzimáticos obtenidos con Celluclast. **T14/C:** Tratamiento con Celluclast del bagazo con pre-tratamiento ( $H_2O_2/Mo$  seguido de  $HCl$ ) y **T15/C:** Tratamiento con Celluclast a partir del bagazo sin pre-tratamiento.

En cuanto a los licores obtenidos durante las hidrólisis enzimáticas con Viscozyme, se observó una mayor producción de bio-hidrógeno utilizando el hidrolizado del bagazo sin pre-tratar (T16/V) que a partir del hidrolizado del bagazo pre-tratado (T14/V) ( $H_{max}$ : 92.77 ml vs 37.08 ml respectivamente). Esta diferencia es consistente con la diferencia observada en las concentraciones de azúcares (Figura VIII.13.). Las producciones máximas acumuladas ( $H_{max}$ ) en los controles fueron de 29.86 ml para el Control Viscozyme, 20.76 ml en Control Sacarosa y

3.76 ml para el Control Citrato. Los valores anteriores indican que en el Control Viscozyme, el citrato proporcionó 12.60% de la producción de bio-hidrógeno, mientras que el 69.52% vendría de la sacarosa. La suma de las contribuciones del citrato y de la sacarosa no ajustan al 100%, esto probablemente se debió a inexactitudes al preparar las soluciones. Por lo tanto la preparación enzimática Viscozyme tiene una contribución importante en la producción de bio-hidrógeno. En el caso del hidrolizado del bagazo sin pre-tratamiento la contribución fue del 32.2%, mientras que para el hidrolizado del bagazo pre-tratado la contribución fue del 80%.



**Figura VIII.16.** Cinética de producción de bio-hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con Viscozyme. **T14/V**: Tratamiento con Viscozyme a partir de bagazo pre-tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Mo seguido de HCl y **T16/V**: Tratamiento con Viscozyme a partir de bagazo sin pre-tratamiento.



En el proceso de fermentación, la velocidad volumétrica de producción de bio-hidrógeno (VVPH) es un importante factor que permite evaluar el potencial de aplicación para producir bio-hidrógeno en los sistemas (Davila-Vazquez *et al.*, 2008). En este estudio el mejor potencial de VVPH se observó utilizando el hidrolizado enzimático T16/V (142.48 ml H<sub>2</sub>/l-h), seguido por el hidrolizado T14/C (83.70 ml H<sub>2</sub>/l-h). Pero el hidrolizado enzimático T14/C presentó el mayor rendimiento molar de bio-hidrógeno (2.41 mol H<sub>2</sub>/mol sustrato). Este rendimiento molar se calculó en base a la concentración de azúcares reductores (medido como glucosa) en los hidrolizados enzimáticos. Es necesario resaltar el hecho de que los valores de H<sub>max</sub> para los hidrolizados tienen una contribución importante proveniente de la producción de bio-hidrógeno a partir de las preparaciones enzimáticas comerciales. Por lo tanto, para obtener valores más cercanos a la realidad, se sustrajeron los valores de H<sub>max</sub> de la preparación enzimática del H<sub>max</sub> de los hidrolizados, permitiendo así calcular los valores de rendimiento molar de producción de bio-hidrógeno (RMH) corregido, los cuales se muestran en la Tabla VIII.1. en la columna RMH<sub>corr</sub>.

Considerando el uso del bagazo sin pre-tratamiento y en base a los valores de RMH<sub>corr</sub> y los valores de VVPH, es claro que la hidrólisis enzimática con Celluclast presentó mayor rendimiento molar (1.31 moles de H<sub>2</sub>/mol de sustrato) y una velocidad de producción de bio-hidrógeno razonable (60.3 ml H<sub>2</sub>/l-h), en comparación de la hidrólisis con Viscozyme que presentó una VVPH más alta (142.48 ml H<sub>2</sub>/l-h) pero un rendimiento molar muy bajo (0.52). Debido a lo anterior, pudiera ser una mejor alternativa el uso del Celluclast para hidrolizar el bagazo sin pre-tratamiento. Sin embargo, se requiere realizar un estudio para optimizar las concentraciones de ambas enzimas para emplearlas a una concentración que permita obtener la máxima cantidad de azúcares y repetir los ensayos de producción en lote.

Por otra parte, el inóculo presentó mayores tiempos de aclimatación (valores de  $\lambda$ , Tabla VIII.1.) fermentando los hidrolizados obtenidos a partir de Celluclast (10 a 13 horas) que utilizando los hidrolizados a partir de Viscozyme (8 a 10 horas).

**Tabla VIII.1.** Resultados del modelo de Gompertz para hidrolizados con Viscozyme y Celluclast.

Sustrato	$H_{max}$ (ml)	$\lambda$ (h)	VVPH (ml H <sub>2</sub> /l-h)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol sustrato)	RMH <sub>corr</sub> (mol H <sub>2</sub> /mol sustrato)
T14/C	78.98	13.09	83.70	2.41	1.36
T15/C	92.66	10.97	60.03	2.08	1.31
T14/V	37.08	8.88	22.73	0.47	0.09
T16/V	92.77	10.56	142.48	0.76	0.52

**Nota:**  $H_{max}$ : Producción máxima acumulada (ml);  $\lambda$ : Fase lag; VVPH: Velocidad volumétrica de producción de bio-hidrógeno; RMH: Rendimiento molar de bio-hidrógeno; RMH<sub>corr</sub>: Rendimiento molar corregido.

### VIII.3.2. Productos metabólicos.

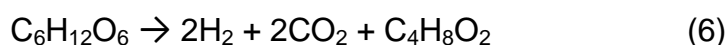
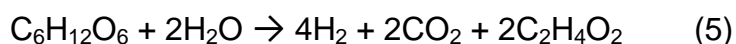
Los principales metabolitos que se formaron en el proceso de fermentación para producir bio-hidrógeno fueron acetato, butirato, propionato y etanol (Tabla VIII.2.).

**Tabla VIII.2.** Metabolitos producidos durante la producción de bio-hidrógeno a partir del hidrolizado enzimático durante los ensayos en lote.

Muestra	Concentración (mg/l)			
	Acetato	Propionato	Butirato	Etanol
T14/C	2842±0.71	749±0.65	2595±0.20	17±0.01
T15/C	2443±0.39	1661±0.40	1760±0.22	270±0.08
T14/V	2588±0.58	1187±0.14	2433±1.13	10±0.01
T16/V	3079±0.50	792±0.70	1993±0.14	160±0.05
Control Celluclast	1215±0.16	769±0.03		459±0.04
Control Viscozyme	1712±0.23	1022±0.0.13		42±0.04

Los metabolitos con mayores concentraciones al término de cada ensayo fueron acetato y butirato. El acetato y butirato constituyeron entre 80 a 87% del total de productos en los ensayos utilizando los hidrolizados T14/C, T14V y T16/V.

Sin embargo solamente 68.52% para T15/C, 61.67% en control Viscozyme y 49.73% para control Celluclast. En general, la producción de estos dos ácidos grasos favorecen la producción de bio-hidrógeno de acuerdo a las ecuaciones 5 y 6. Sin embargo, en todos los ensayos, el acetato representó aproximadamente el 50% del total de ácidos grasos determinados. Lo anterior indica que la producción de bio-hidrógeno fue principalmente a través de una fermentación vía acetogénesis.



**Fuente:** Fangkum y Reungsang, 2011.

### **VIII.3.3. Balance de electrones equivalentes a partir de la demanda química de oxígeno (DQO).**

Considerando el análisis de los metabolitos producidos, se realizó el balance de electrones equivalentes a partir de la demanda química de oxígeno (DQO). En los ensayos no se detectó  $\text{CH}_4$ . De esta forma se identificó que del 50 al 70 % de los e-eq se encontraron en los productos solubles de los hidrolizados enzimáticos (T14/C, T14/V, T15/C y T16/V), mientras que solo el 22.44% se encontró en los productos solubles del control Celluclast y 35.11% en el caso del control Viscozyme. En la Figura VIII.17, se muestra el balance de electrones por porcentajes individuales de cada producto soluble identificado. En dicha Figura se puede observar que el mayor porcentaje de e-eq se encontró en el acetato y el butirato.

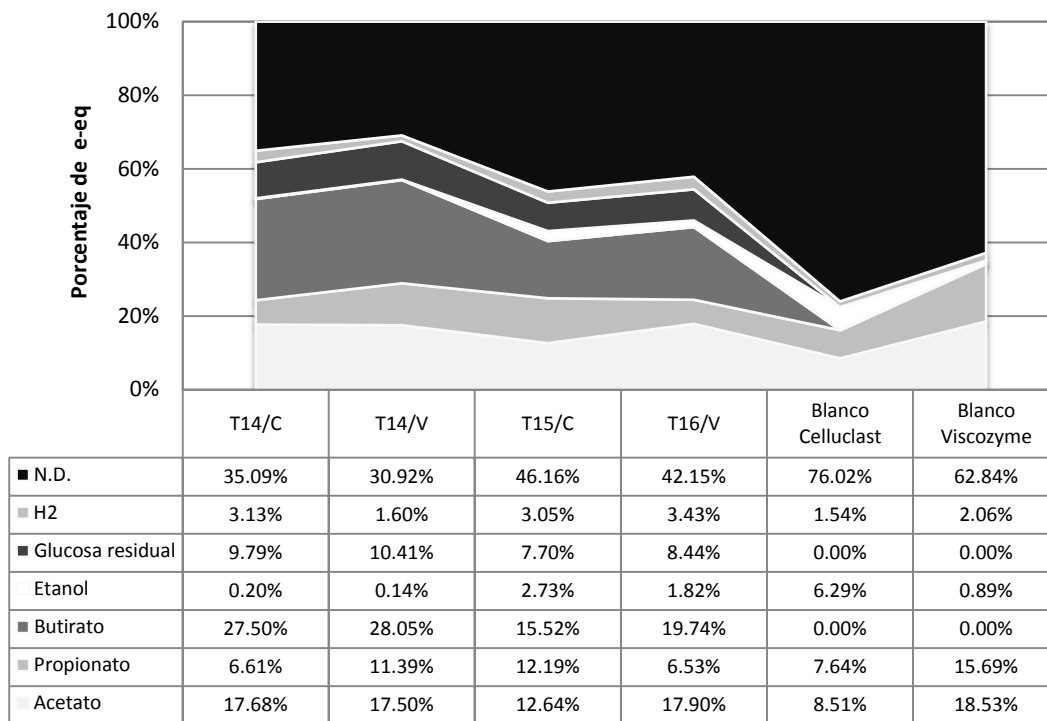
También se observa, que un mayor porcentaje de e-eq se encontró en el butirato producido en los hidrolizados obtenidos con bagazo pre-tratado (27.50% para T14/C y 28.05% en T14/V) en comparación con los hidrolizados obtenidos sin pre-tratamiento (15.52% para T15/C y 19.74% en T16/V). Sin embargo, en los

controles Celluclast y Viscozyme no se identificó butirato. En cuanto al acetato, se encontró un mayor porcentaje de e-eq producido en los hidrolizados enzimáticos (T14/C, T14/V, T15/C y T16/V) y en el control Viscozyme, pero un menor porcentaje en el control Celluclast.

Los mayores porcentajes de e-eq en el H<sub>2</sub> se obtuvieron utilizando los hidrolizados enzimáticos sin pre-tratamiento (3.05% para T15/C y 3.43% en T16/V) y T14/C (3.13%) que es un hidrolizado enzimático obtenido a partir de bagazo pre-tratado utilizando la preparación comercial Celluclast. En los tres casos, se encontraron altos porcentajes de e-eq en el acetato y en el butirato, lo cual es consistente con los mayores porcentajes de e-eq en el H<sub>2</sub>.

Los menores porcentajes de e-eq en el H<sub>2</sub> fueron para el control Celluclast, T14/V y control Viscozyme (1.54%, 1.6% y 2.06% respectivamente). Hay que resaltar el hecho de que el control Celluclast presentó el mayor porcentaje de e-eq en el etanol (6.29%). Así mismo el control Viscozyme presentó un porcentaje alto de e-eq de propionato. En ambos casos, el porcentaje alto de e-eq encontrado en el etanol o en el propionato explican parcialmente los bajos porcentajes de e-eq encontrados en el H<sub>2</sub>. En contraste, el bajo porcentaje de e-eq en el H<sub>2</sub> producido por el hidrolizado T14/V está asociado a altos porcentajes de e-eq de butirato y acetato. Sin embargo, también está asociado con el mayor porcentaje de e-eq en la glucosa residual (10.41%) y en el propionato (11.39%). Esto último podría explicar parcialmente el bajo porcentaje de e-eq en el H<sub>2</sub>.

Los productos no identificados (N.D.) incluyen biomasa, exopolímeros y otros metabolitos no cuantificados tales como valerato, caproato, butanol y propanol (Carrillo-Reyes *et al.*, 2012). Por lo tanto, el balance de electrones equivalentes muestra que los mayores rendimientos de H<sub>2</sub> se relacionan a altos porcentajes de acetato y butirato y a menores porcentajes de propionato, etanol y/o glucosa residual en los hidrolizados enzimáticos.



**Figura VIII.17.** Balance de electrones equivalentes en la cinética de producción de bio-hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos.

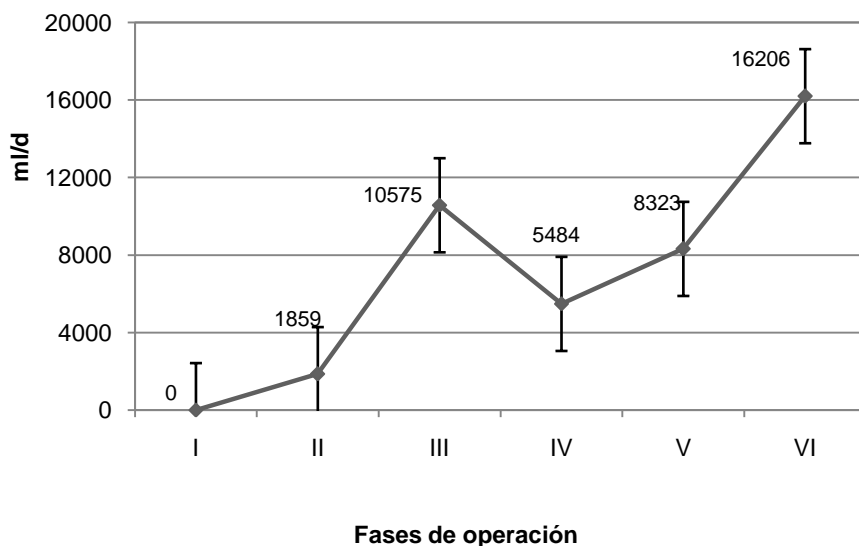
#### **VIII.4. Producción de bio-hidrógeno en un reactor CSTR.**

Basado en los resultados obtenidos en los ensayos en lote, se procedió a evaluar la factibilidad de producir bio-hidrógeno en un proceso en continuo. Para esto se decidió usar el hidrolizado enzimático (producido con Celluclast) del bagazo de agave sin pre-tratamiento. Como se mencionó en la sección anterior, el hidrolizado enzimático con Celluclast presentó un mayor rendimiento molar y una VVPH razonable, en comparación al hidrolizado enzimático con Viscozyme que presentó una VVPH más alta pero un rendimiento molar muy bajo. Adicionalmente, la enzima comercial Viscozyme no se encontró disponible comercialmente en volúmenes grandes, por lo que el uso de las presentaciones en pequeños volúmenes resultaba muy costosa.

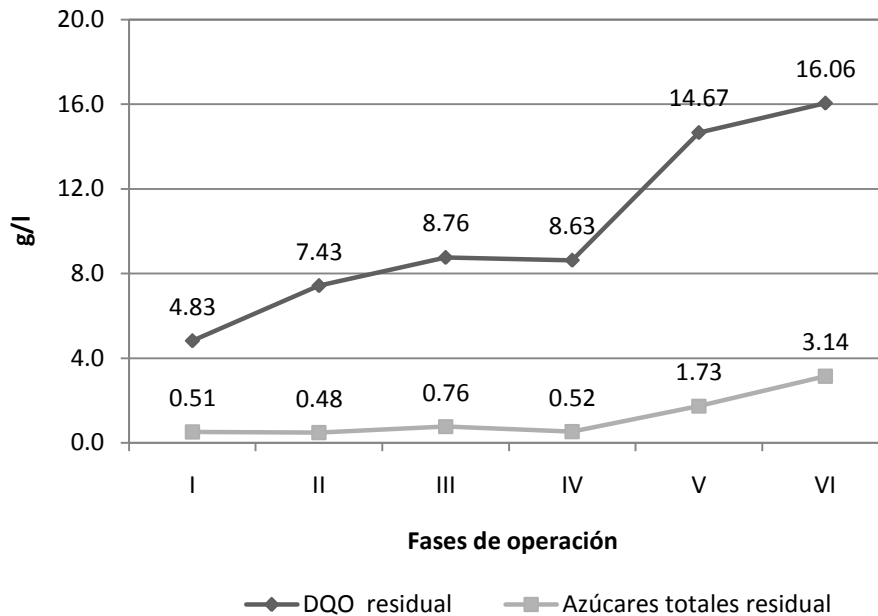
El tipo de reactor se eligió basado en los reportes del empleo de reactores completamente agitados (CSTR) para seleccionar poblaciones bacterianas productoras de bio-hidrógeno, libres de producción de metano, a partir de inóculos metanogénicos pre-tratados con choque térmico (Kyung-Won J. *et al.*, 2011; Kuan-Yeow *et al.*, 2011). La selección de las poblaciones bacterianas productoras de bio-hidrógeno se logra empleando tiempos de retención hidráulicos (TRH) cortos, así permitiendo en el reactor, retener los microorganismos productores de bio-hidrógeno mientras se realiza un lavado de los microorganismos productores de metano. El estudio de factibilidad de producir bio-hidrógeno se dividió en dos etapas, el arranque del proceso y la evaluación de la producción de bio-hidrógeno. La Tabla VIII.3. muestra las diferentes fases de dichas etapas, mostrando las cargas orgánicas y las concentraciones de azúcares totales y de DQO de la alimentación.

### VIII.4.1. Etapa de arranque.

Para la etapa de arranque, en la primera fase se realizó un lavado (wash out) con un TRH de 6 horas para seleccionar los microorganismos hidrogénicos y eliminarlos microorganismos metanogénicos del inóculo. En la fase II, con el objetivo de crecer la biomasa seleccionada se agregaron 5 g DQO/l de glucosa mezclado con 5 g DQO/l de hidrolizado enzimático y se aumentó el TRH a 24 horas. En la fase II se observó una pequeña producción de gas de 1849 ml/d (Figura VIII.18.). Aunque la tasa de carga de azúcares totales (AT) es parecido entre las dos primeras fases (fase I, 0.24 g AT/l-h y fase II, 0.27 g AT/l-h), por el contrario fue diferente a la carga orgánica en DQO (fase I, 0.83 g DQO/l-h y fase II, 0.42 g DQO/l-h). Puesto que en la primera fase no se observó producción de gas (Figura VIII.18.), este efecto pudo deberse a que los microorganismos estaban adaptándose al nuevo ambiente. Lo anterior se reflejó en una baja degradación de azúcares totales de solo el 64.25% en la fase I, mientras que para la fase II fue de 92.56% (Figura VIII.19).



**Figura VIII.18.** Producción de gas en los experimentos en CSTR a partir de hidrolizados enzimáticos



**Figura VIII.19.** Concentración residual del sustrato en los experimentos en CSTR.

#### VIII.4.2. Etapa de evaluación.

En la fase III, se mantuvieron las mismas condiciones de alimentación de la fase anterior (fase II) pero se redujo el TRH a 12 horas, para terminar de seleccionar los microorganismos productores de bio-hidrógeno (acidogénicos). Debido a esto, se incrementó la carga orgánica a 0.84 g DQO/l-h y 0.54 g azúcares totales/l-h. Se observó un incremento del volumen de gas producido (10575 ml/d) con 39% de bio-hidrógeno en el gas (Figura VIII.20.). Considerando que aumentar la densidad celular puede incrementar la velocidad de producción de bio-hidrógeno y puede ser benéfico para superar los efectos de toxicidad por compuestos inhibidores derivados de los hidrolizados lignocelulósicos (Nanqui *et al.*, 2009), se decidió para la fase IV aumentar el TRH a 24 horas manteniendo las mismas condiciones de alimentación que en la fase anterior (hidrolizado enzimático más glucosa), con el objetivo de retener una mayor cantidad de biomasa, para preparar el reactor para el cambio de alimentación en las dos siguientes fases (solamente hidrolizado enzimático). Por tanto, en esta fase se observó la disminución de producción de gas (5484 ml/d), ya que se redujo la



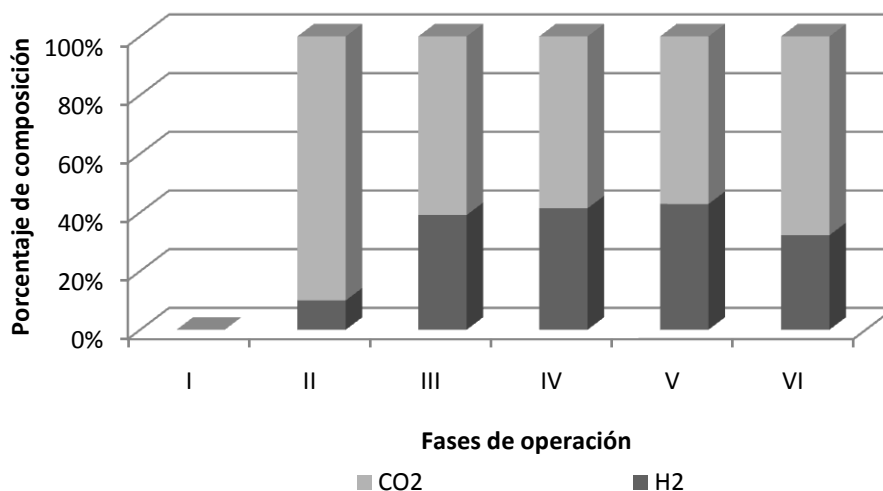
carga orgánica (0.42 g DQO/l-h y/o 0.27 g AT/l-h), pero aumentó ligeramente el porcentaje de bio-hidrógeno en la composición de gas (41%).

Para las siguientes fases (V y VI) se eliminó la glucosa de la alimentación. De modo que para la fase V se mantuvo el TRH en 24 horas y la misma carga en azúcares totales (0.27 g AT/l-h) de la fase IV, pero alimentando solo hidrolizado enzimático, lo que provocó un aumento de la carga orgánica en DQO (0.93 g DQO/l-h). En consecuencia se observó un incremento en la producción de gas (8,323 ml/d) y también aumentó ligeramente el porcentaje de composición de bio-hidrógeno (44%). Una vez que se alcanzó el estado estable y se observó una aclimatación de la biomasa al hidrolizado enzimático, en la fase VI se incrementó la carga orgánica (1.86 g DQO/l-h y 0.54 g AT/l-h) disminuyendo el TRH a 12 horas. Este cambio de carga orgánica se reflejó en una mayor producción de gas (16206 ml/d), aunque con un menor porcentaje de bio-hidrógeno (32%), el cual fue el más bajo de todas las fases de evaluación (fase III a VI). El método de selección de los microorganismos acidogénicos (TRH 6, 24 y 12 horas) fueron adecuadas ya que no se registró producción de metano (Figura VIII.20.).

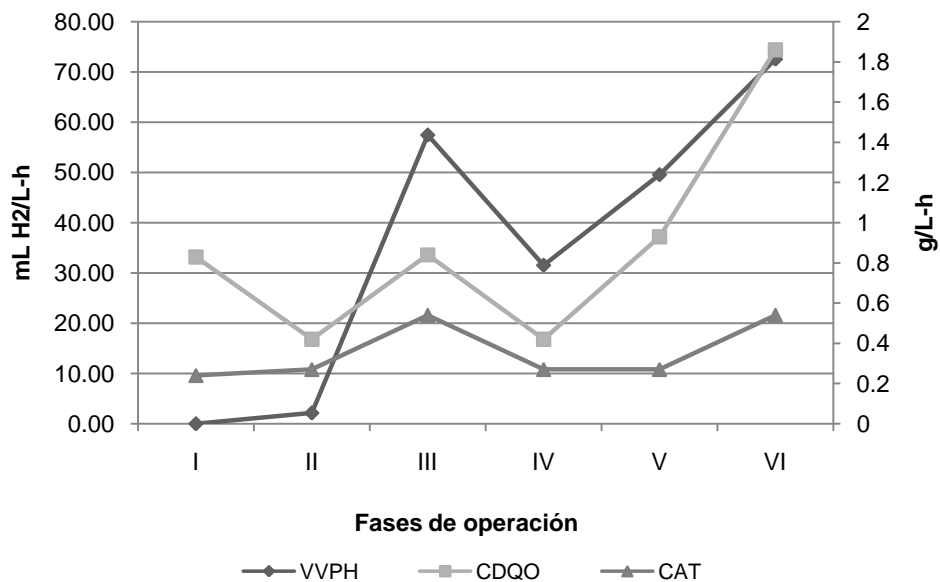
Es importante analizar el cambio realizado de la fase IV a V en la alimentación del reactor, así que se mantuvo el mismo TRH de 24 horas, pero se sustituyó 5 g/l glucosa de la alimentación de la fase IV por 5 g/l de azúcares totales a partir del hidrolizado enzimático en la fase V, es decir, se mantuvo la misma carga orgánica con azúcares totales (0.27 g/l-h) pero se incrementó la carga en DQO de 0.42 a 0.93 g DQO/l-h (Tabla VIII.3.). Este cambio se reflejó en la VVPH y RMH (31.54 ml H<sub>2</sub>/l-h y 0.36 mol H<sub>2</sub>/mol de sustrato de la fase IV a 49.56 ml H<sub>2</sub>/l-h y 0.74 mol de H<sub>2</sub>/l-h en la fase V). De modo que el incremento en VVPH y RMH se encuentra relacionado al incremento de la carga en DQO (Figura VIII.21. y VIII.22.). Por lo tanto, en el hidrolizado enzimático pueden existir otros compuestos de los cuales se produjeron bio-hidrógeno, ya que también se observó una disminución en porcentaje de degradación de azúcares totales de 91.85% de la fase IV a 73.16% en la fase V. Uno de estos compuestos puede ser el sorbitol, ya que es un estabilizante de la mezcla enzimática (Celluclast), y en los

ensayos en lote se determinó su contribución a la producción de bio-hidrógeno (Tabla VIII.1.y Figura VIII.15.), pero también se puede considerar la contribución de otros compuestos presentes en el hidrolizado, que pueden ser derivados del ataque inespecífico de la enzima sobre la lignina. Debido a lo anterior, es probable que los rendimientos molares (RMH) calculados estén sobre valorados.

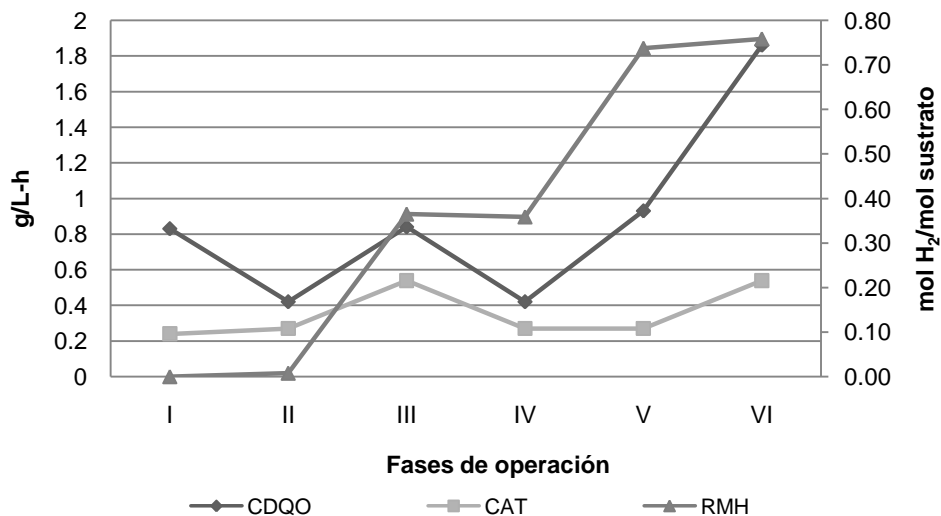
Comparando los intervalos de producción de bio-hidrógeno obtenidos con los reportados por Arreola-Vargas., (2013; aceptado) a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica (4.6-81.4 ml H<sub>2</sub>/l-h y 0.38-1.70 mol H<sub>2</sub>/mol de azúcares), el hidrolizado enzimático fue un sustrato adecuado para producir bio-hidrógeno a una TRH de 12 horas, ya que se registró una VVPH de 72.55 ml H<sub>2</sub>/l-h y un rendimiento molar de 0.76 mol H<sub>2</sub>/mol sustrato, moles de sustrato en base a los azúcares totales consumidos. (Figura VIII.21. y VIII.22.). Sin embargo, con sustratos modelos, por ejemplo glucosa, se han alcanzado mayores rendimientos (1.03-2.79 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa; 170-1270 ml H<sub>2</sub>/l-h) (Kyung-Won, 2011).



**Figura VIII.20.** Composición de gas en los experimentos en CSTR.



**Figura VIII.21.** Velocidades de producción de bio-hidrógeno en el reactor. **VVPH:** Velocidad de producción de bio-hidrógeno, **CDQO:** Carga orgánica por DQO y **CAT:** Carga orgánica por azúcares totales.



**Figura VIII.22.** Rendimiento molar de producción de bio-hidrógeno en el reactor. **RMH:** Rendimiento molar de producción de bio-hidrógeno. **CDQO:** Carga orgánica por DQO y **CAT:** Carga orgánica por azúcares totales.

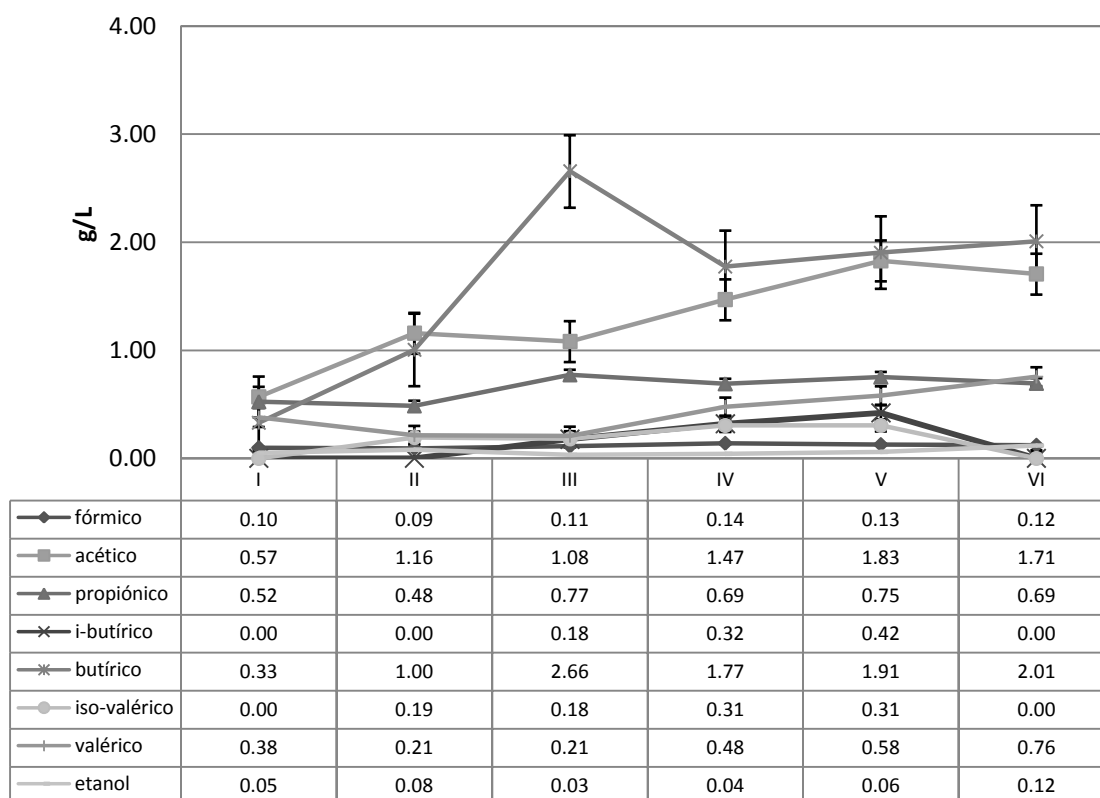
Es importante señalar que el hidrolizado enzimático contenía algunos ácidos grasos volátiles (AGVs) que contribuyeron a las concentraciones iniciales en la alimentación. Estos ácidos incluían al fórmico ( $0.08 \pm 0.02$  g/l), acético ( $0.41 \pm 0.02$  g/l), propiónico ( $0.5 \pm 0.05$  g/l), butírico ( $0.30 \pm 0.06$  g/l) y etanol ( $0.01 \pm 0.002$  g/l). Las concentraciones indicadas entre paréntesis corresponden a las concentraciones esperadas en la alimentación, considerando que el hidrolizado enzimático se diluyó en medio mineral para preparar la alimentación. Para todas las fases, los ácidos grasos volátiles (AGVs) producidos más predominantes fueron ácido acético y butírico (Figura VIII.23.). Considerando el mismo tipo de alimentación (glucosa más hidrolizada enzimática) en la fase III y IV, se observó un incremento en la concentración de butírico a TRH de 12 horas, mientras que a TRH de 24 horas se incrementó la concentración de acético. En tanto que en el reactor alimentado solo con hidrolizado enzimático se observó que en la fase V a TRH de 24 horas se incrementó la concentración de acético y a menor TRH de 12 horas en la fase VI este disminuyó. Estos AGVs son reportados por diferentes autores como los metabolitos indicadores de una eficiente producción de bio-hidrógeno. Además, basados en el equilibrio de NADH/NAD<sup>+</sup> la ruta metabólica acetato-butirato puede ser inducida a pH entre 5 y 7.5 (Kyung -Won *et al.*, 2011) lo cual pudo ocurrir en el presente trabajo ya que el reactor se operó a un pH de 5.

El ácido fórmico y propiónico presentaron pocas variaciones entre las fases ya que en parte fueron proporcionados en la alimentación. Sin embargo, la presencia de ácido propiónico puede explicar el bajo rendimiento observado en las fases de operación. De acuerdo a la estequiometría a partir de glucosa, rendimientos más altos de bio-hidrógeno pueden producirse a partir de la producción de acetato y butirato, mientras que la producción de bio-hidrógeno no está asociada a la producción de propionato (Tenca A. *et al.*, 2011).

Utilizando el hidrolizado enzimático producido con Celluclast a las cargas orgánicas y TRH de operación en las fases V y VI, no se observaron altas concentraciones de metabolitos (acetato: 6.01 g/l; propionato: 7.41 g/l; butirato:

8.81 g/l y etanol: 4.61 g/l) como las reportadas en la literatura (Bo-Wang *et al.*, 2008) que pudieran inhibir o minimizar la producción de bio-hidrógeno. Al igual, las concentraciones de metabolitos en la alimentación fueron menores a las reportadas que causan inhibición. Al parecer, otros compuestos no determinados en el hidrolizado enzimático tampoco afectaron la producción de bio-hidrógeno, los cuales (compuestos aromáticos, alcoholes y terpenos) se han reportado como posibles inhibidores de procesos de fermentación (Nanqi Ren *et al.*, 2009).

Otro hecho importante es que en el reactor se observó la formación de gránulos a partir de la fase III (Figura VIII.24). Este efecto se ha reportado recientemente en operación de reactores CSTR. Se cree que los cationes divalentes por ejemplo  $Ca^{+2}/Mg^{+2}/Fe^{+2}$  y polímeros extracelulares son fundamentales en la formación de estos gránulos (Kyung Won J. *et al.*, 2011).



**Figura VIII.23.** Concentración de metabolitos producidos en el reactor.



**Figura VIII.24.** Formación de biomasa y gránulos en el reactor.

## IX. Conclusiones.

1. Aunque se encontraron pre-tratamientos efectivos del bagazo de *Agave tequilana* Weber para remover hemicelulosa (HCl diluido) y lignina (péroxido-molibdato), estos pre-tratamientos no mejoraron el proceso de producción de bio-hidrógeno. De hecho, se observó una mayor producción de bio-hidrógeno a partir de la hidrólisis enzimática de las fibras sin pre-tratamiento. Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo fue refutada.
2. La preparación enzimática Viscozyme fue más efectiva para solubilizar azúcares reductores que la preparación enzimática Celluclast a partir del bagazo sin pre-tratar.
3. Los pre-tratamientos enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana* Weber produjeron licores con contenido adecuado de azúcares y una cantidad mínima de inhibidores (furfurales y fenoles) que permitieron una fermentación adecuada para producir bio-hidrógeno en ensayos en lote.
4. En los ensayos en lote, se encontró que los estabilizantes presentes en las preparaciones enzimáticas (sorbitol para Celluclast y sacarosa para Viscozyme) contribuyeron de manera importante a la producción de bio-hidrógeno.
5. La estrategia de selección y aclimatación de los microorganismos acidogénicos empleada para arrancar un reactor CSTR fue apropiada, ya que no se registró producción de metano en el reactor durante el tiempo que duró el experimento.
6. Además de los azúcares totales, en el hidrolizado enzimático pueden existir otros compuesto los cuales produjeron bio-hidrógeno, ya que es evidente que al incrementar la carga orgánica en DQO se observó una disminución en el porcentaje de degradación de azúcares totales asociado a un incremento en el rendimiento molar y velocidad de producción de bio-hidrógeno. Uno de estos compuestos puede ser el estabilizante sorbitol de la mezcla enzimática Celluclast. Por lo tanto los rendimientos molares (RMH) calculados podrían estar sobre valorados.

## X. Perspectivas.

1. En los ensayos en lote de producción de bio-hidrógeno, se encontró que el uso de Celluclast es más adecuado. Sin embargo, se requiere realizar un estudio de optimización de la hidrólisis enzimática para el Celluclast y la Viscozyme, teniendo como criterios de optimización la VVPH y el RMH.
2. Es necesario evaluar el desempeño de la producción de biohidrógeno en CSTR a altas cargas orgánicas, para determinar los valores máximos de VVPH y RMH.
3. En la operación del reactor se observó la generación de espuma a bajos tiempo de retención hidráulica (TRH). Es necesario agregar antiespumante para resolver problemas en la operación del reactor. Sin embargo, se debe evaluar en pruebas en lote, si el antiespumante tiene alguna contribución en la producción de bio-hidrógeno.
4. El proceso de cocción de las piñas de agave durante la fabricación del tequila pareciera ser suficiente para acondicionar las fibras para la hidrólisis enzimática, ya que los mayores porcentajes de producción de bio-hidrógeno se obtuvieron a partir de hidrolizados sin pre-tratamiento. Sin embargo, se observó un ataque enzimático inespecífico sobre la lignina. Dada la estructura química de la lignina (alcoholes hidroxinamil tales como: *p*-coumaril, coniferil y sinafil; unidades genéricas de lignina como son: *p*-hidroxifenil, guaiacil y sirengil), es de suponerse que dicha hidrólisis inespecífica genera compuestos de tipo fenólico que pudieran afectar negativamente el proceso de producción de bio-hidrógeno vía fermentación. Estos compuestos podrían ser la causa de los bajos rendimientos y velocidades de producción de bio-hidrógeno observadas en este trabajo y en otros estudios con hidrolizados de materiales lignocelulósicos reportados en la literatura. Por lo tanto, es necesario investigar la naturaleza química de dichos compuestos fenólicos, ya que actualmente la presencia de compuestos fenólicos en los hidrolizados es evaluada por medio de la presencia de siringaldehído y vainillina, los cuales pudieran no ser representativos de los compuestos generados por la hidrólisis enzimática



inespecífica. También es necesario investigar si dichos compuestos de degradación de la lignina tienen un efecto inhibitorio sobre el proceso de producción de bio-hidrógeno.

5. Durante el proceso de jima del *Agave tequilana* Weber se genera una cantidad considerable de hojas de agave (penca) el cual es un residuo lignocelulósico que no tiene un manejo adecuado. Es importante investigar el contenido de hemicelulosa y celulosa en la penca para determinar el potencial de producción de bio-hidrógeno. También es importante investigar si un pre-tratamiento térmico seguido de una hidrólisis enzimática permitirían una sacarificación adecuada para la producción de bio-hidrógeno.

## **XI. Bibliografía.**

**Adney B. and Baker J.** Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory.

**APHA**, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, Washington, DC.

**Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M. J**, 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: Review. *Bioresource Technology* 101, 4851-4861.

**Arantes V. and Saddler J. N.** 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3:4.

**Arreola-Vargas J. Alatríste-Mondragón F, Razo-Flores E. and Celis L. B.** Oat straw sugar solubilization and hydrogen production from hydrolysates: role of hydrolysate constituents. *Process Biochemistry* (en revision).

**Arreola-Vargas J, Celis L. B, Buitrón G, Razo-Flores E.** Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: performance and microbial population analysis". *International Journal of Hydrogen Energy* (aceptado)

**Arriaga S, Rosas I, Alatríste-Mondragón F, Razo-Flores E.** 2011. Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*.(36) 3442-3449.

**Bo-Wang, Wei W, Jianlong W.** 2008. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* (33) 7013 – 7019.

**Buitrón G. and Carvajal C.** 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology* (101) 9071–9077.

**Carrillo-Reyes J, Celis L. B, Alatríste-Mondragón F, Razo-Flores E.** 2012. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy* (37) 5591-5601.

- Cui M, Zhuliang Y, Xiaohua Z, Liling W, Jianquan S.** 2010. Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* (35) 4041 – 4047.
- Curreli N, Agelli M, Pisu B, Rescigno A, Sanjust E, Rinaldi A.** 2002. Complete and efficient enzymatic hydrolysis of pretreated wheat Straw. *Process Biochemistry* (37), 937-941.
- Das D. and Veziroglu T. N.** 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* (26) 13-28.
- Davila-Vazquez G, Arriaga S, Alatraste-Mondragón F, de León-Rodríguez A, Rosales-Colunga L. M. and Razo-Flores E.** 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7:27–45.
- Doherty W. O.S Mousavioun P, Fellows C. M.** 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products* (33) 259–276.
- Dubois M, Gilles K. A, Hamilton J. K, Rebers, P.A y Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:3:350-356.
- Dufey A. y Stange D,** Estudio regional sobre la economía de los bio-combustibles en 2010: temas clave para los países de América Latina y el Caribe, *Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL)*.
- Eckert R.C.** 1982. Delignification and Bleaching Process and Solution for Lignocellulosic. Pulp with Peroxide in the Presence of Metal Additives. Canadian patent 1, 129, 161.
- Espinoza-Escalante F. M, Pelayo-Ortíz C, Navarro-Corona J, González-García Y, Bories A, Gutiérrez Pulido H.** 2009. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass and Bioenergy* (33)14–20.
- Fan H. and Ragauskas A.** 2012. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Research* 5:1043–1066.
- Fangkum A. and Reungsang A.** 2011. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* (36) 8687-8696.
- Garcia-Moya E, Romero-Manzanares A. and Nobel P. S.** 2011. Highlights for Agave Productivity, *GCB Bioenergy* (3) 4–14.

- Gomez-Tovar F, Celis L. B, Razo-Flores E, Alatraste-Mondragón F.** 2012. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresource Technology* 116:3372-378
- Guang-Li C., Nan-Qi R, Ai-Jie W., Wan-Qian G., Ji-Fei X, Bing-Feng L.** 2010. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy* (35) 13475 – 13480.
- Hisham H, Nakhla G, Hesham M. N, Elbeshbishy E, Baghchehsarae B.** 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy* (35) 81 – 92.
- 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) 1238–1245.
- Hallenbeck P. C, Dipankar Ghosh M. T, Skonieczny V. Y.** 2009. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian Journal of Microbiology* 49:48–59.
- Hongjia L, Foston M. B, Kumar R, Reichel S, Xiadi G, Fan H, Ragauskas A. J. and Wyman C. E.** 2012. Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fastgrowing, drought-tolerant biofuels feedstock. *RSC Advances* 2, 4951–4958.
- Hyung-Sool L, Rittmann B. E.** 2009. Evaluation of Metabolism Using Stoichiometry in Fermentative Biohydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102, No. 3, February 15.
- Koljonen K, Österberg M, Kleen M, Fuhrmann A, Stenius P.** 2004. Precipitation of lignin and extractives on kraft pulp: effect on surface chemistry, surface morphology and paper strength. *Cellulose* 11, 209–224.
- Kuan-Yeow S, Duu-Jong L, Jo-Shu C.** 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology* (102) 8524–8533
- Kubelka, V, Francis R.C. and Dence C.W.** 1992. Delignification with Acidic Hydrogen Peroxide Activated by Molybdate. *Journal of Pulp and Paper Science* 18 (3) J108-114
- Kyung-Won J, Dong-Hoon K, Sang-Hyoun K, Hang-Sik S.** 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology* (102) 8612–8620.

- Mehdi D, Miranda M, Kam T. L, Canquan M. and Wensheng Q.** 2010. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(4): 302–309.
- Méndez-Acosta H. O, Snell-Castro R, Alcaraz-González V, González-Álvarez V. y Pelayo-Ortiz C.** 2010. Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type Digester. *Biodegradation* 21:357–363.
- Miller, G. L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Nanqi R, Aijie W, Guangli C, Jifei X, Lingfang G.** 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* (27) 1051–1060.
- Nasirian N, Morteza A, Saeid M. and Widmann R.** 2010. Continuous fermentative hydrogen production under various process conditions. *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.8, 968-972.*
- Núñez Héctor M, Rodríguez L. F. and Khanna M.** 2011. Agave for tequila and biofuels: an economic assessment and potential opportunities, *GCB Bioenergy* (3) 43–57.
- Ortiz M. L.** 2009. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina Orinoquia. *Sistema de Información Científica, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.* (13) 137–144.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Fachuang L, Kim H, Schatz P. F., Marita J. M, Hatfield R. D, Ralph S. A, Christensen J. H. and Boerjan W.** 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* 3: 29–60.
- Ramírez-Guzmán M. E. y Quito-López T.** Métodos estadísticos no paramétricos, aplicación del paquete estadístico spss en la solución de problemas. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección de Difusión Cultural.
- Saucedo-Luna J, Castro-Montoya A. J, Rico J. L. and Campos-García J.** 2010. OPTIMIZATION OF ACID HYDROLYSIS OF BAGASSE FROM Agave tequilana Weber, *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 9, No. 1; 91-97.
- Saucedo-Luna J, Castro-Montoya A. J, Martínez-Pacheco M. M, Sosa-Aguirre C. R. and Campos-García J.** 2011. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* Weber bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:725–732.

- Scheller H. V. and Ulvskov P.** 2010. Hemicelluloses. *Annual Review in Plant Biology* 61:263–89.
- Sinha P. and Pandey A.** 2011. Review, An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* (36) 7460-7478.
- Sims R. E. H, Mabee W, Saddler J. N. and Taylor M.** 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology* (101)1570–1580.
- Smith K. A. and Searchinger T. D.** 2012. Crop-based biofuels and associated environmental concerns. *GCB Bioenergy* (4) 479–484.
- Smook, G. A,** 2002. Handbook for Pulp and Paper Technologies, 3rd ed. Angus Wilde, Publications Inc., Vancouver, BC.
- Spear, S. K, Holbrey J. D, Roger R.D.** 2002. *Journal American of the Chemical Society* 124, 4874.
- Stanislav V. V, Baxter D, Andersen L. K., Vassileva C. G., Morgan T. J.** An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel* 94 (2012) 1–33.
- Swatloski R. P, Rogers D, Holbery J. D.,** 2003. WO 2003,029,329.
- Taherzadeh M. J. and Karimi K.** 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal Molecular Science*, 9, 1621-1651.
- Tejirian A. and Xu F.** 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology* (48) 239–247.
- Tenca A, Schievano A, Lonati S, Malagutti L, Oberti RAdani, F.** 2011. Looking for practical tools to achieve next-future applicability of dark fermentation to produce bio-hydrogen from organic materials in Continuously Stirred Tank Reactors. *Bioresource Technology* (102) 7910–7916
- Torres C. I, Marcus A. K. and Rittmann B. E.** Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s00253-007-1198-z.
- Valery B. A, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin D. B.** 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* (29) 675–685.

- Valenzuela Ana.** 2011. A new agenda for blue agave landraces: food, energy and tequila, Review. *GCB Bioenergy* (3)15–24.
- Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo H. M.** 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (13) 1000–1013.
- Van Ginkel S., Sung S, Lay J.J.** 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology* (35) 4726–4730.
- Van Soest P.J, Roberston J. B, Lewis B. A.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Wang J. and Wan W.** 2009. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* (34) 3313 – 3323.
- Wang Q. Q, Zhu J. Y, Hunt C. G, Zhan H. Y.** 2012. Kinetics of Adsorption, Desorption, and Re-Adsorption of a Commercial Endoglucanase in Lignocellulosic Suspensions. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 109, No. 8.
- Xi Chen A, Yaqin S, Zhi Long X, Xiaohui L, Daijia Z.** 2006. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* (31) 539 – 549.
- Xin M. G, Trably E, Latrille E, Carrere H, Steyer J. P.** 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* (35) 10660-10673.
- Xuebing Z, Zhang L, and Liu D.** 2012. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining* 6:465–482.
- Zhang, T, Fang Liu H.** 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management* (69),149–156.
- Zuluaga R, Putaux J. L, Cruz J, Velez J, Mondragon I, Ganan P.** 2009. Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate Polymers* 76, 51-59
- Zwietering M. H, Jongenburger I, Rombouts F. M, and Van't Riet K.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, June, p. 1875-1881.