



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

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados  
de bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul:  
Efecto del procesamiento de la piña y de la  
sacarificación del bagazo**

Tesis que presenta

**Irma López Gutiérrez**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Ambientales**

**Director de la Tesis:  
Dr. Felipe Alatraste Mondragón**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2015



IPICYT

## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de Agave tequilana Weber var. azul: Efecto del procesamiento de la piña y de la sacarificación del bagazo*" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Irma López Gutiérrez** y aprobada el **deciséis de diciembre del dos mil quince** 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 Alatríste Mondragón**

Director de la tesis

**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta**

Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Elías Razo Flores**

Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Gustavo Dávila Vázquez**

Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Jorge Arreola Vargas**

Miembro del Comité Tutorial



## **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-296778) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El análisis de furfurales y fenoles se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología, Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) y el análisis por difracción de rayos X se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

Además se agradece al Comité de Becas del Instituto Potosino de Investigación de Científica y Tecnológica, A. C. por el apoyo económico otorgado para la asistencia al II International Symposium on Agave y al XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

El autor realizó una estancia en los laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (Unidad de Tecnología Ambiental). Bajo la supervisión del Dr. Gustavo Dávila Vázquez.



# 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 029 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 16 días del mes de diciembre del año 2015, se reunió a las 12:00 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>UdG</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>
<b>Dr. Jorge Arreola Vargas</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UdG</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Irma López Gutiérrez**

sobre la Tesis intitulada:

***Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de Agave tequilana Weber var. azul: Efecto del procesamiento de la piña y de la sacarificación del bagazo***

que se desarrolló bajo la dirección de

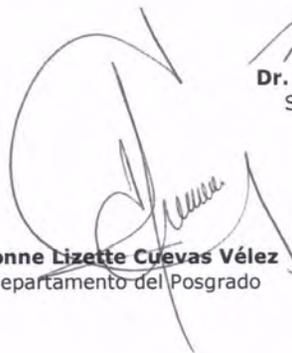
**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 14:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes de diciembre de 2015.



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



**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



*Dedicado para toda mi familia, especialmente para mi mamá una gran  
luchadora de la vida y para Marisol y Marichuy.*

*“Gracias por todo su amor y apoyo incondicional”*

## Agradecimientos

Al Dr. Felipe Alatríste Mondragón por permitirme desarrollar este proyecto de investigación bajo su asesoría, por todo su apoyo y valiosos comentarios que me permitieron crecer en mi formación profesional y en lo personal.

Al Dr. Gustavo Dávila Vázquez por su asesoría y gran disposición para realizar en los laboratorios del CIATEJ la remoción de fenoles presentes en hidrolizados de bagazo de agave.

Al Dr. Elías Razo Flores por permitirme formar parte del grupo de trabajo de hidrógeno y poder enriquecer mi formación profesional y proyecto de investigación.

Al Dr. Hugo O. Méndez Acosta y al Dr. Jorge Arreola Vargas por su gran disposición para formar parte del comité tutorial, por sus críticas y aportaciones para revisar y mejorar este proyecto de investigación.

Al Dr. Miguel Avalos Borja por la asesoría técnica para obtener el índice de cristalinidad en las fibras de *A. tequilana*.

A la Dra. Angélica Aguilar, a la QFB Elizabeth Cortes Cedillo, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, a la M. en C. Dulce Partida Gutiérrez, y al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar por su gran disponibilidad, ayuda y apoyo técnico en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales.

Al Ing. Roberto Emmanuel Bolaños Rosales por su gran disponibilidad y apoyo técnico en los laboratorios del CIATEJ.

A I. Q Ma. del Carmen Rocha Medina y Dra. Mireya Edith Martínez Pérez por su disponibilidad y ayuda durante el análisis de muestras en el Laboratorio Nacional de Biotecnología, Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA).

A la M. en C. Beatriz Adriana Rivera Escoto por su disponibilidad para analizar muestras en el equipo del Difracción de rayos X de polvos del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

A mis compañeros de generación y amigos que conocí durante esta etapa de mi vida Mónica Buendía, Erika Ríos, Gabriela Vidal, Nohemí Campos, Claudia Paz, Edgardo Valenzuela, Karen Galindo y Paola Portillo gracias por los buenos momentos.

Y por último a mi gran familia que desde lejos me apoyaron en todo momento.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Abreviaturas	xv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
Resumen gráfico	xviii

## **CAPÍTULO 1 Introducción, antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos**

1.1 Introducción	1
1.1.1 Composición del material lignocelulósico y su distribución en plantas	2
1.1.1.1 Estructura de la pared celular	2
1.1.1.2 Estructura de los componentes de los materiales lignocelulósicos	3
1.1.1.3 Distribución del material lignocelulósico en los tejidos vegetales	5
1.1.2 Tratamientos del material lignocelulósico	7
1.1.3 Formación de inhibidores de los procesos de fermentación durante los tratamientos de la biomasa lignocelulósica	8
1.1.4 Detoxificación de hidrolizados para mejorar la producción de biocombustibles	10
1.1.5 Producción biológica del hidrógeno por fermentación oscura	13
1.2 Antecedentes	16
1.2.1 Utilización del bagazo de <i>A. tequilana</i> como sustrato potencial para la producción de biocombustibles	16
1.2.2 Caracterización de la piña y bagazo de <i>A. tequilana</i>	18
1.2.2.1 Caracterización de la fracción soluble de la piña de <i>A. tequilana</i>	18
1.2.2.2 Caracterización del bagazo de <i>A. tequilana</i> (fracción insoluble)	20
1.2.3 Producción de hidrógeno a partir de bagazo de <i>A. tequilana</i>	20
1.2.4 Limitantes para la producción de hidrógeno a partir de residuos lignocelulósicos	22
1.3 Justificación	23

1.4 Hipótesis	24
1.5 Objetivo general	24
1.6 Objetivos específicos	24
1.7 Estructura de la tesis	25
<b>CAPÍTULO 2 Caracterización de las fibras de piña y bagazo de <i>A. tequilana</i> sometidas a diferentes tratamientos para la extracción de azúcares</b>	<b>26</b>
Resumen	26
2.1 Introducción	26
2.2 Materiales y métodos	29
2.2.1 Biomasa	29
2.2.2 Tratamientos aplicados para extraer azúcares fermentables	29
2.2.2.1 PAT	29
2.2.2.2 BAT	30
2.2.3 Caracterización de fibras	30
2.2.3.1 Determinación de fibras.	31
2.2.3.2 DRX	31
2.2.3.3 Caracterización morfológica	31
2.3 Resultados y discusión	31
2.3.1 Caracterización de la celulosa microcristalina (AVICEL PH101)	31
2.3.2 Evaluación de los tratamientos para extraer azúcares fermentables aplicados a la PAT	32
2.3.3 Evaluación de los tratamientos de hidrólisis enzimática y ácida de BAT37	
2.4 Conclusiones	39
<b>CAPÍTULO 3 Optimización de la hidrólisis enzimática de bagazo de <i>A. tequilana</i> para la producción de hidrógeno</b>	
Resumen	41
3.1 Introducción	41
3.2.1 Materiales	43
3.2.2 Caracterización de la mezcla comercial de enzimas (Celluclast 1.5L)	43
3.2.3 Diseño experimental para la optimización de la hidrólisis enzimática	44
3.2.4 Tratamientos de hidrólisis aplicados al BAT	45
3.2.5 Cinéticas de producción de hidrógeno	45
3.2.5.1 Ensayos en lote	45
3.2.5.2 Cuantificación de gas	46

3.2.5.3 Análisis de la cinética	46
3.2.6 Ensayos en lote para la producción de hidrógeno a partir hidrolizados	46
3.3 Resultados y discusión	47
3.3.1 Optimización de hidrólisis enzimática	47
3.3.2 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos	53
3.4 Conclusiones	56
<b>CAPÍTULO 4 Estudio de la inhibición de la producción de hidrógeno por compuestos fenólicos formados durante el proceso de cocción de la piña y durante los procesos de sacarificación del bagazo de <i>A. tequilana</i></b>	<b>58</b>
Resumen	58
4.1 Introducción	58
4.2 Materiales y métodos	61
4.2.1 Materiales	61
4.2.2 Proceso de lavado del BAT	61
4.2.3 Tratamientos de hidrólisis aplicados al BAT	61
4.2.4 Caracterización de las aguas de lavado e hidrolizados de BAT	62
4.2.5 Remoción de compuestos fenólicos en la primera agua de lavado y en los hidrolizados del BAT	63
4.2.6 Caracterización de los concentrados	64
4.2.7 Ensayos en lote de producción de hidrógeno	64
4.2.7.1 Efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de compuestos remanentes en el BAT formados durante el proceso de cocción de la PAT	64
4.2.7.2 Efecto de la remoción de compuestos fenólicos en hidrolizados de BAT sobre la producción de hidrógeno	65
4.2.7.3 Efecto inhibitorio de los concentrados para la producción de hidrógeno	65
4.3 Resultados y discusión	65
4.3.1 Caracterización de las aguas de lavado e hidrolizados del BAT	65
4.3.2 Remoción de compuestos fenólicos de los hidrolizados y caracterización de los concentrados.	68
4.3.3 Ensayos en lote de producción de hidrógeno	73
4.3.2.1 Efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de compuestos remanentes en el BAT obtenidos durante el proceso de cocción de la PAT	73
4.3.2.2 Efecto de la remoción de compuestos fenólicos en hidrolizados de BAT sobre la producción de hidrógeno	75

4.3.2.3 Efecto inhibitorio de los concentrados sobre la producción de hidrógeno	78
4.3.2.4 Formación de metabolitos durante los ensayos en lote para la producción de hidrógeno	81
4.4 Conclusiones	83
<b>CAPÍTULO 5 Discusión general, conclusiones generales y perspectivas</b>	<b>84</b>
5.1 Discusión general	84
5.2 Conclusiones generales	86
5.3 Perspectivas	87
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>96</b>
<b>Anexo 2a</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 2b</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 2c</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 3a</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 3b</b>	<b>98</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.1</b> Aplicaciones de adsorción en la detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles	12
<b>Tabla 1.2</b> Estequiometría de metabolitos asociados en la producción de hidrógeno en la fermentación oscura	15
<b>Tabla 1.3</b> Producción de biocombustibles a partir de bagazo de <i>A. tequilana</i>	18
<b>Tabla 1.4</b> Composición del bagazo de <i>A. tequilana</i>	20
<b>Tabla 1.5</b> Tratamientos aplicados a las fibras de bagazo de <i>A. tequilana</i> .	21
<b>Tabla 1.6</b> Producción de hidrógeno en sistemas en lote y continuo a partir de hidrolizados de bagazo <i>A tequilana</i>	21
<b>Tabla 2.1</b> Contenido de fibras (%) en el BAT antes y después del tratamiento de hidrólisis ácida.	39
<b>Tabla 3.1</b> Factores experimentales e intervalos de prueba evaluados en la optimización	44
<b>Tabla 3.2</b> Condiciones que predicen los máximos valores para la hidrólisis enzimática establecido por el programa estadístico Statgraphics centurión XVI.II.	50
<b>Tabla 3.3</b> Caracterización de hidrolizados enzimáticos bajo las condiciones óptimas definidas en este trabajo y bajo las condiciones empleadas por Abreu-Sherrer, (2103).	51
<b>Tabla 3.4</b> Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de HECO y HECA.	55
<b>Tabla 4.1</b> Caracterización de la primera y segunda agua de lavado y de los hidrolizados enzimáticos y ácidos del BAT.	66
<b>Tabla 4.2</b> Caracterización de las aguas de lavado y de los hidrolizados de BAT antes y después de remover compuestos fenólicos por AMBERLITE™ FPX66.	68
<b>Tabla 4.3</b> Determinación de fenoles totales (mg/L) en el Celluclast 1.5L y en hidrolizados con y sin enzimas.	70
<b>Tabla 4.4</b> Caracterización de los concentrados obtenidos a partir de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático de BAT.	72
<b>Tabla 4.5</b> Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos a partir de BAT con y sin lavado previo.	74
<b>Tabla 4.6</b> Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados sin tratar y tratados con la columna empacada con resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.	76
<b>Tabla 4.7</b> Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de los concentrados.	80

## Lista de figuras

<b>Figura 1.1</b> Distribución del material lignocelulósico dentro de las capas que presenta la estructura de la pared celular (Achyuthan <i>et al.</i> 2010).	3
<b>Figura 1.2</b> Monolignoles de la lignina. (a) alcohol p-cumarílico, (b) alcohol coniferílico, (c) alcohol sinapílico (Doherty <i>et al.</i> 2011).	4
<b>Figura 1.3</b> Estructura de la hemicelulosa (Chen <i>et al.</i> 2014).	4
<b>Figura 1.4</b> Estructura de la celulosa (Smith, 1977).	5
<b>Figura 1.5</b> Esquema del corte transversal del tallo de una planta monocotiledónea (Esau, 1985).	5
<b>Figura 1.6</b> Principales compuestos formados durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Almeida <i>et al.</i> 2007).	9
<b>Figura 1.7</b> Rutas metabólicas durante la fermentación oscura de varios sustratos por un cultivo mixto; (1) vía Fd-hidrogenasa, (2) vía formiato-hidrogenoliasa (Adaptado de Prescott <i>et al.</i> 2002 y Vasconcelos de Sá <i>et al.</i> 2013).	14
<b>Figura 1.8</b> Consumo de <i>A. tequilana</i> para tequila del 2008 al 2014. Fuente: CRT (2015).	17
<b>Figura 1.9</b> Estructura de fructanos propuesta para una planta de <i>A. tequilana</i> de 8 años (Lopez <i>et al.</i> 2003).	19
<b>Figura 2.1</b> Estrategia experimental para evaluar diferentes procesos para extraer azúcares fermentables de las fibras de <i>A. tequilana</i> ; BAT <sup>***</sup> : bagazo cocido de <i>A. tequilana</i> proveniente del proceso de cocción con vapor; la caracterización de las aguas de lavado e hidrolizados se abordan en el capítulo 4.	29
<b>Figura 2.2</b> Caracterización de la celulosa microcristalina. a) Difractograma de DRX; b) SEM-EDS.	32
<b>Figura 2.3</b> Cambio en el contenido de fibras (%) durante los diferentes procesamientos de la PAT.	32
<b>Figura 2.4</b> Difractogramas de DRX; a) PAT, b) BAT proveniente de un proceso mecánico de la PAT utilizando un extractor de jugos doméstico, c) BAT proveniente de un proceso mecánico de la PAT con una desgarradora e impregnación con agua caliente, d) BAT proveniente de un proceso de cocción de la PAT.	33
<b>Figura 2.5</b> SEM-EDS para la fibra de PAT sin ningún procesamiento.	34
<b>Figura 2.6</b> SEM-EDS de la fibra de BAT proveniente de un tratamiento mecánico de la PAT con un extractor de jugos doméstico.	35
<b>Figura 2.7</b> SEM-EDS de la fibra de BAT proveniente de un proceso mecánico de la PAT con una desgarradora e impregnación con agua caliente.	35
<b>Figura 2.8</b> SEM-EDS de la fibra de BAT proveniente de un proceso de cocción de la PAT.	36
<b>Figura 2.9</b> Remoción de fibras durante los tratamientos de hidrólisis en el BAT cocido proveniente de un proceso de cocción de la PAT. He: hidrólisis enzimática; HA: hidrólisis ácida.	37

<b>Figura 2.10</b> Determinación del IC en las fibras hidrolizadas; a) BAT hidrolizado enzimático; b) BAT hidrolizado ácido	37
<b>Figura 2.11</b> SEM-EDS de la fibra de BAT hidrolizado enzimático.	38
<b>Figura 2.12</b> SEM-EDS de la fibra de BAT hidrolizado ácido	38
<b>Figura 3.1</b> Ajuste de la producción de AR obtenidos de algunos ensayos realizados durante la optimización de la hidrólisis enzimática.	47
<b>Figura 3.2</b> Modelo de superficie de respuesta de la velocidad de producción de AR (mg AR/mL-h) al variar el sustrato y concentración de enzima (mg proteína/mL), a una temperatura de 40°C y a un pH de 6.	48
<b>Figura 3.3</b> Modelo de superficie de respuesta de la concentración de AR (mg AR/mL) al variar el pH y concentración de enzima (mg proteína/mL), a una temperatura de 40°C y 80g/L de bagazo como sustrato.	49
<b>Figura 3.4</b> Modelo de superficie de respuesta del rendimiento (mg AR /g Sustrato), al variar pH y concentración de enzima (mg proteína/mL), evaluados a una temperatura de 40°C y 35g/L de bagazo como sustrato.	49
<b>Figura 3.5</b> Remoción de fibras durante los tratamientos de hidrólisis enzimática en el BAT cocido.	52
<b>Figura 3.6</b> Producción acumulada de hidrógeno en lote de hidrolizados bajo las condiciones óptimas (HECO) y bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) (HECA) de BAT. La concentración de AT fue de 6500 mg/L tanto en los hidrolizados enzimáticos como en el control de glucosa. La concentración del control de Celluclast 1.5L fue equivalente a la que se esperaría estuviera presente en el hidrolizado enzimático (1.2 mg proteína/mL) bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) (CECA) y en el hidrolizado enzimático (0.7 mg proteína/mL) bajo las condiciones óptimas locales.	53
<b>Figura 3.7</b> Producción de metabolitos durante los ensayos en lote para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos; HE: hidrolizado enzimático.	56
<b>Figura 4.1</b> Estrategia experimental para evaluar el efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno por compuestos fenólicos formados durante el proceso de cocción de la PAT y durante los procesos de sacarificación del BAT. a) Columna empacada con resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 para remover compuestos fenólicos; b) Concentración de compuestos retenidos por la resina provenientes de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático.	62
<b>Figura 4.2</b> Columna empacada con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; a) remoción de compuestos fenólicos en la primera agua de lavado y en hidrolizado enzimático (1BV=300 mL); b) remoción de compuestos fenólicos en el hidrolizado ácido (1BV=150 mL).	63
<b>Figura 4.3</b> Rendimiento obtenido en los hidrolizados y aguas de lavado de BAT. FT: Fenoles totales; HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido. *El rendimiento reportado se calculó considerando las concentraciones de la primera y segunda agua de lavado del BAT.	67
<b>Figura 4.4</b> Cambio de color durante la remoción de compuestos fenólicos en la primera agua de lavado; a) Primera agua de lavado antes de eluirla	71

por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; b) Primera agua de lavado después de eluirlo por la resina.	
<b>Figura 4.5</b> Cambio de color durante la remoción de compuestos fenólicos en el hidrolizado ácido; a) hidrolizado ácido antes de eluirlo por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; b) hidrolizado ácido después de eluirlo por la resina.	71
<b>Figura 4.6</b> Cambio de color durante la remoción de compuestos fenólicos en el hidrolizado enzimático; a) hidrolizado enzimático antes de eluirlo por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; b) hidrolizado enzimático después de eluirlo por la resina.	72
<b>Figura 4.7</b> Producción acumulada de hidrógeno en lote de hidrolizados enzimáticos a partir de BAT con y sin lavado previo. HE: hidrolizado enzimático. La concentración de AT fue de 6500 mg/L en los hidrolizados como en el control de glucosa. La concentración de Celluclast 1.5L fue de 0.7 mg proteína/mL equivalente a la que se esperaría estuviera presente en los hidrolizados.	73
<b>Figura 4.8</b> Producción acumulada de hidrógeno en lote de hidrolizados sin tratar y tratados con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 para remover compuestos fenólicos. HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido. La concentración de AT fue de 5000 mg/L tanto en los hidrolizados como en el control de glucosa.	75
<b>Figura 4.9</b> Formación de precipitados en hidrolizados ácidos al ajustar pH a 7.5 para los ensayos en lote de producción de hidrógeno.	77
<b>Figura 4.10</b> Producción acumulada de hidrógeno de los ensayos con el concentrado obtenido del hidrolizado enzimático del BAT (CHE) evaluado a una concentración 1000, 100 y 10 mg/L de fenoles totales con la adición de 5000 mg/L de glucosa. La concentración del control de glucosa fue de 5000 mg/L sin adición del concentrado.	78
<b>Figura 4.11</b> Producción acumulada de hidrógeno de los ensayos con el concentrado obtenido de la primera agua de lavado del BAT (CAL) evaluado a una concentración de 1000, 100 y 10 mg/L de fenoles totales con la adición de 5000 mg/L de glucosa. La concentración del control de glucosa fue de 5000 mg/L sin adición del concentrado.	79
<b>Figura 4.12</b> Producción de metabolitos durante los ensayos en lote para la producción de hidrógeno. *Hidrolizados previamente filtrados para el tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.	82

## Abreviaturas

<b>AGVs</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>AR</b>	Azúcares reductores
<b>AT</b>	Azúcares totales
<b>BAT</b>	Bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul
<b>CAL</b>	Concentrado obtenido de la primera agua de lavado
<b>CECA</b>	Control de Celluclast 1.5L a una concentración equivalente al hidrolizado enzimático bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013)
<b>CECO</b>	Control de Celluclast 1.5L a una concentración equivalente al hidrolizado enzimáticos bajo las condiciones óptimas locales
<b>CHE</b>	Concentrado obtenido del hidrolizado enzimático
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>FT</b>	Fenoles totales
<b>HA</b>	Hidrolizado ácido
<b>HE</b>	Hidrolizado enzimático
<b>HECA</b>	Hidrolizado enzimático bajo las condiciones establecidas por Abreu-Sherrer, (2013)
<b>HECO</b>	Hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales
<b>Hmax</b>	Producción acumulada de hidrógeno
<b>HMF</b>	5-hidroximetilfurfural
<b>IC</b>	Índice de cristalinidad
<b>LGA</b>	Lodo granular anaerobio
<b>PAT</b>	Piña de <i>Agave Tequilana</i> Weber var. Azul
<b>RMH</b>	Rendimiento molar de hidrógeno
<b>SEM-EDS</b>	Microscopia electrónica de barrido con detector de energía dispersiva
<b>VVPH</b>	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno

## Resumen

### **Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul: Efecto del procesamiento de la piña y de la sacarificación del bagazo**

Palabras clave: bagazo de *A. tequilana*, hidrólisis enzimática, hidrólisis ácida, compuestos fenólicos, fermentación oscura.

El bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul (BAT) es un residuo lignocelulósico que resulta del proceso de cocción de la piña de *A. tequilana* (PAT) para extraer azúcares fermentables para la elaboración del tequila. En este trabajo se estudiaron los cambios químicos y morfológicos de los constituyentes lignocelulósicos durante diferentes procesamientos (proceso tradicional de cocción y dos procesos mecánicos alternos) de la PAT y durante diferentes tratamientos de sacarificación (hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida) del BAT para la producción de hidrógeno vía fermentación oscura. También se estudió la remoción de compuestos fenólicos, formados durante el proceso de cocción de la PAT y durante los tratamientos de sacarificación del BAT, empleando la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 y su efecto sobre la producción de hidrógeno. La caracterización de las fibras de la PAT y BAT mostró que el proceso de cocción es eficiente para extraer azúcares fermentables de la PAT. Dicha extracción estuvo asociada a la destrucción del parénquima, permitiendo que el esclerénquima quedara expuesto en el BAT. La hidrólisis ácida del BAT fue más eficiente que la hidrólisis enzimática, removiendo en mayor medida a la fracción amorfa del BAT y solubilizando los cristales de oxalato de calcio presentes en el BAT. Sin embargo, la cristalinidad de celulosa no se vio afectada. La optimización de la hidrólisis enzimática permitió incrementar modestamente el rendimiento de sacarificación del BAT y disminuir de forma importante la concentración de la enzima empleada (Celluclast 1.5L). La resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 fue eficiente para remover compuestos fenólicos en el hidrolizado ácido permitiendo mejorar el proceso de producción de hidrógeno a partir de dicho hidrolizado; esto no se observó con el hidrolizado enzimático. La remoción de compuestos solubles remanentes en el BAT formados durante el proceso de cocción de la PAT, mediante lavados del BAT, mejoró la producción de hidrógeno. Sin embargo, este efecto no se debió a la remoción de compuestos fenólicos.

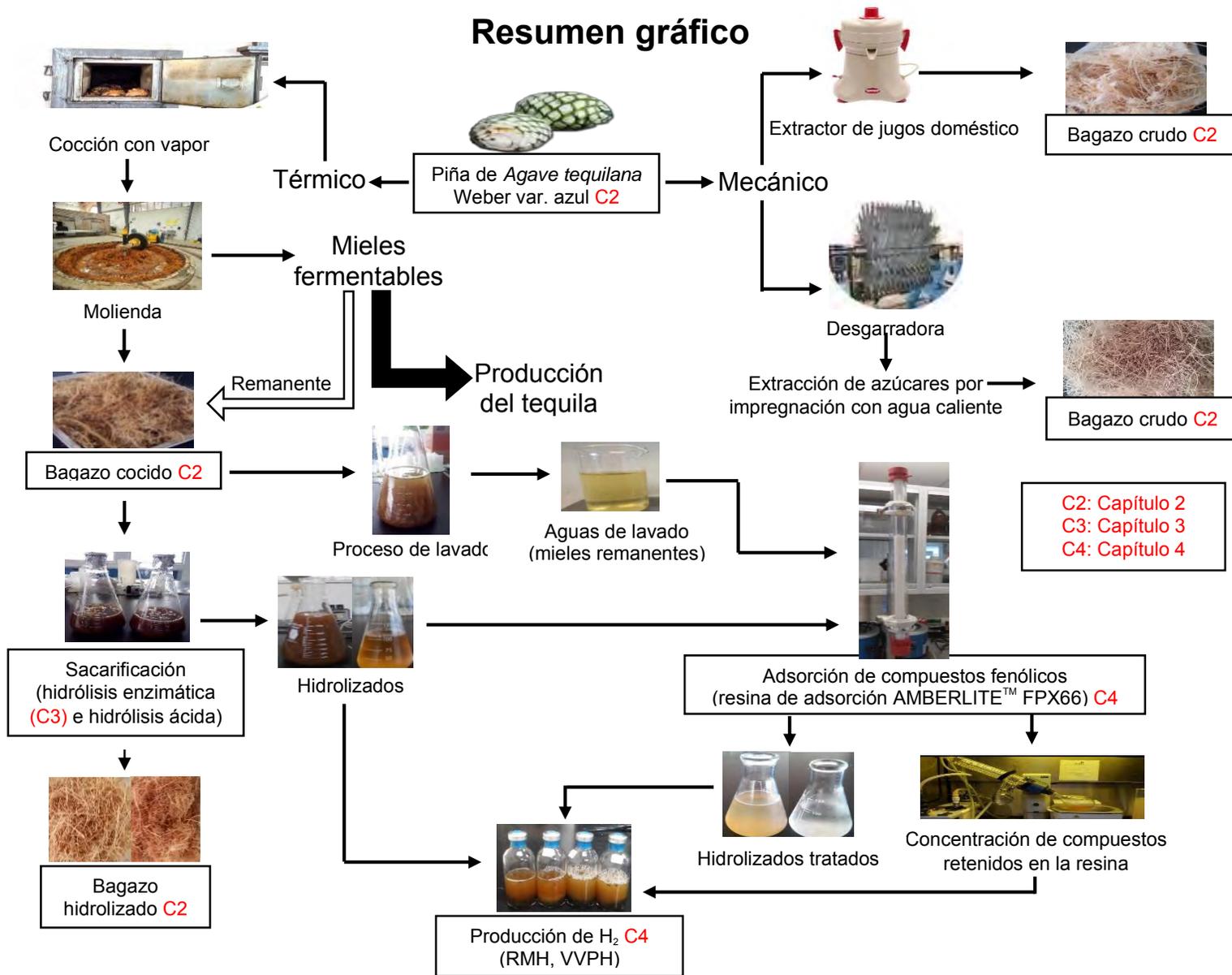
## Abstract

### Hydrogen production from hydrolysates of *Agave tequilana* Weber var. azul bagasse: Effect of head processing and bagasse saccharification

KEY WORDS: *A. tequilana* bagasse, enzymatic hydrolysis, acid hydrolysis, phenolic compounds, dark fermentation.

*Agave tequilana* Weber var. azul bagasse (BAT) is a lignocellulosic residue that results from cooking process of *A. tequilana* head (PAT) to extract fermentable sugars for the tequila production. In this thesis a study was conducted on the chemical and morphological changes of lignocellulosic constituents during different processing (traditional cooking process and two alternative mechanical processes) of the PAT and during different saccharification treatments (enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis) for hydrogen production via fermentation dark. Also the removal of phenolic compounds formed during the cooking process of the PAT and during saccharification treatment of BAT using adsorption resin AMBERLITE FPX66 was studied, and also the effect of that removal on the hydrogen production. The characterization of PAT and BAT fibers showed that the cooking process is an efficient treatment to extract fermentable sugars of the PAT. This extraction was associated with parenchymal destruction, allowing the sclerenchyma to be exposed in the BAT. Acid hydrolysis of BAT was more efficient than the enzymatic hydrolysis, because the acid hydrolysis removed mainly the amorphous fraction of BAT, and the calcium oxalate crystals present in the BAT were also solubilized. However, the crystallinity of cellulose was unaffected. The optimization of the enzymatic hydrolysis allowed a modest increase in the performance of the saccharification of BAT and reduced the concentration of enzymes employed (Celluclast 1.5L). The adsorption resin AMBERLITE™ FPX66 efficiently removed phenolic compounds in the acid hydrolysates allowing improvement of the hydrogen production. This was not observed with enzymatic hydrolysates. Removal of soluble compounds formed during the cooking process of the BAT, by washing it with water, improved hydrogen production. However, this effect was not due to the removal of phenolic compounds.

# Resumen gráfico



C2: Capítulo 2  
 C3: Capítulo 3  
 C4: Capítulo 4

# CAPÍTULO 1

## Introducción, antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos

### 1.1 Introducción

El abastecimiento de energía a nivel mundial es cubierto principalmente por combustibles fósiles. Sin embargo las reservas de combustibles fósiles son limitadas y el uso a gran escala de este recurso no renovable se asocia a problemas ambientales como la lluvia ácida, agotamiento del ozono estratosférico y el cambio climático global (Alemán-Nava *et al.* 2014; Kalogirou, 2004). Por lo que es necesario explorar fuentes de energía limpias y renovables, para su uso en un futuro cercano.

El hidrógeno es una alternativa prometedora, para reducir y eventualmente sustituir el uso de combustibles fósiles, debido a que es un gas con el mayor contenido energético por unidad de peso 143 GJ/t, comparado con cualquier combustible conocido. Además de ser un combustible libre de carbono, de baja solubilidad que es fácilmente separado del agua, purificado y usado como portador de energía en celdas de combustible para generar electricidad (Das *et al.* 2008).

En las últimas décadas, los esfuerzos de investigación se han centrado en la producción de combustibles a partir de biomasa (biocombustibles), elaborados a partir de cultivos alimentarios como el maíz, caña de azúcar y aceite de palma, entre otros. Estos biocombustibles son llamados de primera generación destacando entre ellos el bioetanol y el biodiesel, considerados como posibles alternativas para aliviar la dependencia de la gasolina y del diésel. Sin embargo, su producción causó indirectamente un aumento de precios en los alimentos y por lo tanto contribuyó a la reciente crisis alimentaria mundial (Xin *et al.* 2010). Debido a lo anterior las investigaciones se enfocaron a la producción de biocombustibles de segunda generación elaborados a partir de biomasa lignocelulósica (Ren *et al.* 2009).

México tiene un potencial importante para la producción de biocombustibles de segunda generación, como por ejemplo la producción de hidrógeno por vía biológica, ya que destina gran parte de su territorio para actividades agrícolas, generando dos tipos de residuos; los primarios (24.78 Mt/año) disponibles en el

campo después de la cosecha del producto principal (por ejemplo paja, hojas y tallos), y los secundarios o agroindustriales (6.67 Mt/año) generados al procesar el producto principal de la cosecha (por ejemplo los bagazos de agave y de caña) (Ríos y Kaltschmitt, 2013).

### **1.1.1 Composición del material lignocelulósico y su distribución en plantas**

El material lignocelulósico es el principal y más abundante componente de la biomasa renovable producida por la fotosíntesis. Es un biopolímero que se encuentra en la pared celular de las plantas. Las paredes celulares de las plantas son importantes en la vida humana, ya que proporciona fibras dietéticas y materias primas para la industria textil, maderera, papelera y potencialmente para los biocombustibles (Zhong y Ye, 2007).

#### **1.1.1.1 Estructura de la pared celular**

La pared celular es una estructura altamente organizada, integrada principalmente por lignina, hemicelulosa y celulosa constituyentes del material lignocelulósico; que muestran una estructura submicroscópica formada por una fase fibrilar cristalina y una amorfa. La fase fibrilar cristalina está formada por microfibrillas; finos filamentos formados por moléculas de celulosa, dispuestos paralelamente unidos entre sí por puentes de hidrógeno intermoleculares. Mientras que la fase amorfa está formada por celulosa, hemicelulosa, polisacáridos no celulósicos (xilanos, glucanos, galactanos, mananos y fructanos), pectinas, glucoproteínas y lignina (Bidlack *et al.* 1992).

Como se observa en la Figura 1.1 la pared celular contiene tres capas fundamentales que se desarrollan con la maduración celular, de fuera hacia dentro de la célula son la lámina media, pared primaria y pared secundaria. Donde el material lignocelulósico se encuentra ampliamente distribuido (Bidlack *et al.* 1992; McCann *et al.* 1990).

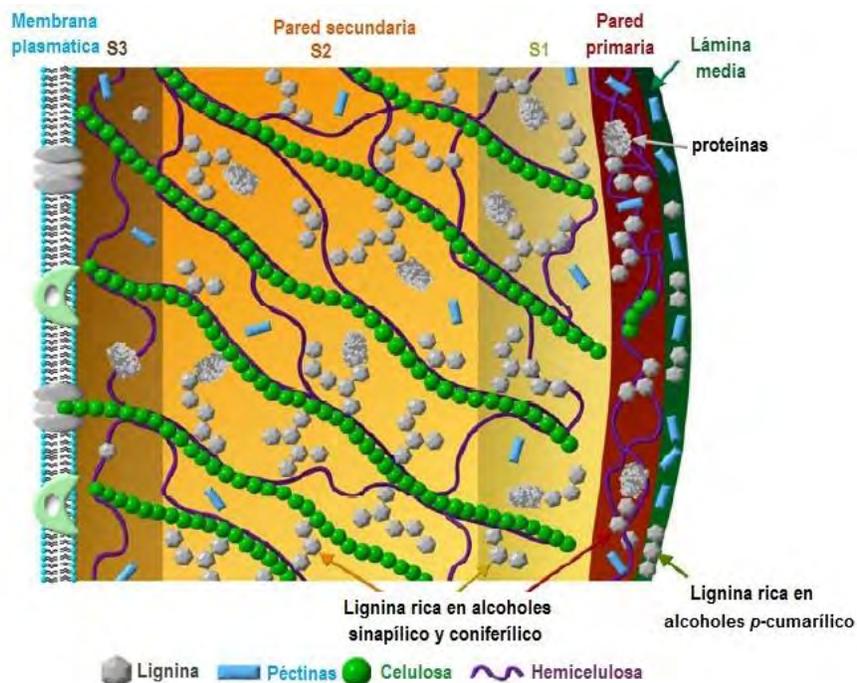


Figura 1.1 Distribución del material lignocelulósico dentro de las capas que presenta la estructura de la pared celular (Achyuthan *et al.* 2010).

La lámina media es la capa más externa, que une las paredes celulares de las fibras contiguas en los tejidos lignificados. Esta se compone principalmente de pectinas, proteínas y lignina rica en alcoholes *p*-cumarílico (Achyuthan *et al.* 2010).

La pared primaria se forma inmediatamente después de la división celular antes de que la célula complete su crecimiento, en esta capa domina la matriz amorfa formada por hemicelulosa, lignina rica en alcoholes sinapílico y coniferílico y polisacáridos no celulósicos. La fase fibrilar cristalina está reducida al 8-25% (McCann *et al.* 1990).

La pared secundaria es más gruesa que la pared primaria, con una estructura más compleja donde generalmente consta de tres subcapas (S1, S2 y S3) como se observa en la Figura 1.1. Las subcapas presentan características físicas y químicas diferentes. La fase fibrilar cristalina domina hasta en un 60% (Bidlack *et al.* 1992).

### 1.1.1.2 Estructura de los componentes de los materiales lignocelulósicos

La lignina es un polímero que se encuentra en la lámina media de la pared celular y en las capas primaria y secundaria de la pared celular. Es un heteropolímero

amorfo ramificado de naturaleza fenólica con grupos metoxi y fenilpropánicos, formado por unidades repetidas de cumaril, guaiacil y siringil. Estas unidades se derivan de los monolignoles como los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 1.2) que son los precursores de la bio-síntesis de lignina (Ralph *et al.* 2004). La lignina en la pared secundaria forma una matriz amorfa que protege a los polisacáridos frente a la degradación microbiana y a la hidrólisis enzimática en general (Doherty *et al.* 2011).

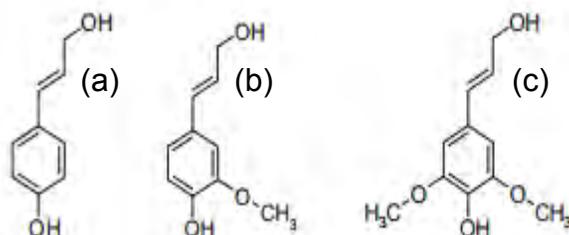


Figura 1.2 Monolignoles de la lignina. (a) alcohol *p*-cumarílico, (b) alcohol coniferílico, (c) alcohol sinapílico (Doherty *et al.* 2011).

La hemicelulosa es un conjunto de polímeros (Figura 1.3) formados por diversas pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), ácidos urónicos (ácido D-glucourónico, ácido 4-O-metil-D-glucourónico y ácido D-galactourónico) y 6-deoxi-hexosas (L-ramnosa y L-fucosa); siendo xilosa la más abundante. Su función principal es su interacción con la celulosa y lignina para proporcionar rigidez a la pared celular (Howard *et al.* 2003; Scheller *et al.* 2010).

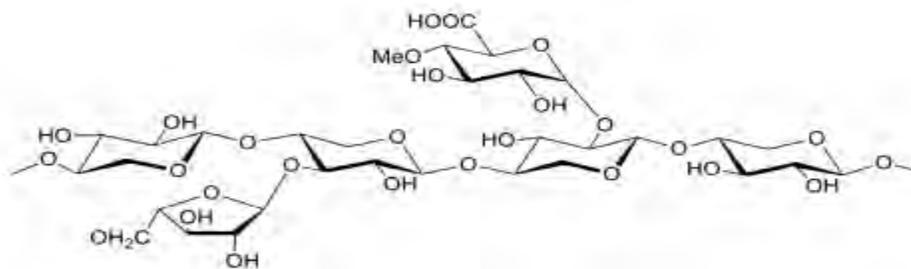


Figura 1.3 Estructura de la hemicelulosa (Chen *et al.* 2014).

Mientras que la hemicelulosa y lignina son consideradas como sustancias amorfas, la celulosa es un agregado policristalino que contiene componentes cristalinos y no cristalinos o amorfos, es decir, está formado por regiones cristalinas separadas por

regiones amorfas o menos cristalinas. Las moléculas de celulosa formada por unidades de glucosa conectadas a través de enlaces  $\beta$ -1-4 glucosídicos, tienen una fuerte tendencia a formar enlaces por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (Figura 1.4). Los puentes de hidrógeno intermoleculares permiten una estructura fibrilar terciaria de alta cristalinidad. Las zonas que presentan elevada cristalinidad son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos. Por el contrario, las zonas relativamente más desordenadas (amorfas) son más accesibles y más susceptibles a todas las reacciones químicas (Smith, 1977; Nishiyama *et al.* 2002).

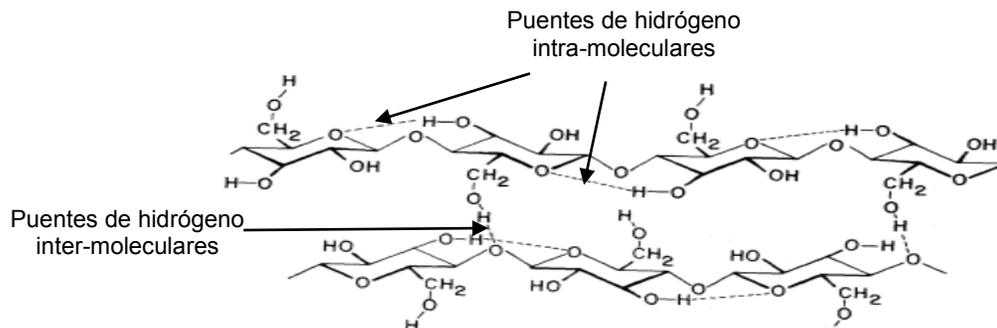


Figura 1.4 Estructura de la celulosa (Smith, 1977).

### 1.1.1.3 Distribución del material lignocelulósico en los tejidos vegetales

La distribución del material lignocelulósico en la pared celular, varía dependiendo del tipo de células que conforman los tejidos vegetales del tallo y hoja de las plantas vasculares. Estos tejidos como se indica en la Figura 1.5 corresponden a la epidermis, al parénquima, colénquima, esclerénquima y al sistema vascular (Esau, 1985).

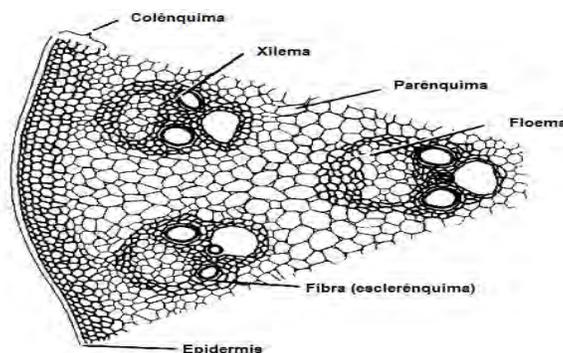


Figura 1.5 Esquema del corte transversal del tallo de una planta monocotiledónea (Esau, 1985).

La epidermis es un tejido de protección formado por una gran variedad de células vivas con contenido celular y pared primaria generalmente delgada que forma una capa continua sobre la superficie del cuerpo de la planta. La mayor parte del tejido esta formado por células epidérmicas alargadas y ordenadas consideradas como los elementos menos especializados del sistema y que constituyen la masa fundamental del tejido. Dispersas entre las células epidérmicas están las células oclusivas y adyacentes que forman a los estomas encontrados habitualmente en las hojas de las plantas.

El parénquima es un tejido fundamental constituido por células vivas con pared primaria, rica en sustancias pécticas y solubles. Estas células pueden desdiferenciarse y volver a ser meristemáticas o puede engrosar sus paredes y originar colénquima o incluso esclerificarse originando por ejemplo: esclereidas o fibras.

El colénquima es un tejido de sostén compuesto de células vivas más o menos alargadas con paredes primarias no lignificadas, en plantas con gran desarrollo del esclerénquima pierde en gran parte su función. En plantas monocotiledóneas es poco frecuente.

El esclerénquima también es un tejido de sostén formado por células no vivas con pared secundaria lignificada; su principal función es de índole mecánica. Las células pueden ser de dos tipos:

- Esclereidas: células relativamente cortas
- Fibras: células alargadas, flexibles que brindan apoyo estructural al tejido vascular en hojas y tallos. Las fibras se clasifican en fibras xilemáticas y extraxilemáticas.

Por último se encuentran los tejidos vasculares o de conducción, formados por haces vasculares que originan al xilema principal tejido conductor de agua y al floema tejido conductor de las sustancias alimenticias. El xilema puede contener tres tipos de células alargadas: traqueidas, elementos vasculares o vasos (tráqueas) y fibras. Estas células en la madurez están muertas. Mientras que en el floema dominan células cribosas con pared primaria que nunca se lignifica (Esau, 1985).

### **1.1.2 Tratamientos del material lignocelulósico**

La conversión directa del material lignocelulósico a biocombustibles no es posible, ya que las cadenas de la hemicelulosa se asocian con las microfibrillas de celulosa y lignina debido a su carácter polar (puentes de hidrógeno), formando un complejo entre celulosa, hemicelulosa y lignina difícil de separar (Ishii, 1997). Por lo que es necesario aplicar tratamientos para hidrolizar las estructuras heterogéneas y cristalinas del material lignocelulósico (De Vrije *et al.* 2002). La hidrólisis generalmente incluye un pre-tratamiento (pre-hidrólisis) y un tratamiento de hidrólisis de celulosa. El pre-tratamiento es usado para remover lignina y parte de hemicelulosa, mientras que la hidrólisis de celulosa es usada para obtener azúcares fermentables (Duff y Murray, 1996).

El proceso del pre-tratamiento permite cambiar la estructura del material lignocelulósico; incrementando el área superficial y la porosidad. Ya que la hemicelulosa y lignina son removidas y la cristalinidad de la celulosa se reduce. De modo que las enzimas puedan acceder fácilmente a la celulosa para hidrolizarla en azúcares fermentables (Kumar *et al.* 2009; Behera *et al.* 2014).

El pre-tratamiento debe cumplir los siguientes requisitos: mejorar la capacidad de obtener azúcares por hidrólisis, evitar la degradación o pérdida de hidratos de carbono, evitar la formación de subproductos inhibidores para los procesos posteriores y una buena relación costo-efectividad (Kumar *et al.*, 2009).

Los métodos de pre-tratamiento se pueden dividir en diferentes categorías: físicos (molienda y trituración), fisicoquímicos (explosión por vapor, AFEX, explosión con CO<sub>2</sub>), químicos (hidrólisis con álcali o con ácidos diluidos, ozonólisis, proceso organosolv, líquidos iónicos), biológicos, eléctricos, o una combinación de éstos. (Kumar *et al.* 2009; Behera *et al.* 2014).

La hidrólisis enzimática se ve influenciada tanto por las características estructurales de la celulosa como por el modo de acción de las enzimas. El mecanismo de hidrólisis de la celulosa depende la acción conjunta de diferentes enzimas como las exoglucanasas y endoglucanasas; esta acción sinérgica depende de varios factores como la naturaleza del sustrato lignocelulósico (grado de polimerización y

cristalinidad de celulosa), la composición y concentración de la enzima, la afinidad por el sustrato de la enzima, la estereoespecificidad, y la relación enzima-sustrato. (Alvira *et al.* 2010; Yang *et al.* 2011).

Por lo tanto, las fracciones deseables para la producción de biocombustibles son la celulosa y hemicelulosa. Mientras que la presencia de lignina es desventajoso desde el punto de vista de la fermentación, ya que esta fracción presenta persistencia para la biodegradación y solo un número limitado de especies posee la capacidad de degradarla (Kumar *et al.* 2015).

A pesar de la gran variedad de tratamientos que están disponibles para liberar azúcares fermentables, no existe un tratamiento universal que sea eficiente para todo tipo de biomasa lignocelulósica. Por lo que es importante encontrar el tratamiento y las condiciones adecuadas para cada tipo de residuo (Kumar *et al.* 2015).

### **1.1.3 Formación de inhibidores de los procesos de fermentación durante los tratamientos de la biomasa lignocelulósica**

Durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica además de la liberación de azúcares como D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, y L-arabinosa (Mussatto *et al.* 2004), se forman compuestos inhibitorios (Figura 1.6) que afectan a los microorganismos que participan en los procesos de fermentación. Estos compuestos inhibitorios se pueden dividir en tres grupos:

- Ácidos orgánicos, como el acetato generado durante la degradación de la hemicelulosa.
- Derivados furanos de la degradación de los azúcares como furfural o 5-hidroximetilfurfural (HMF).
- Compuestos fenólicos como vanilina o siringaldehído derivados de la alteración parcial de la lignina.

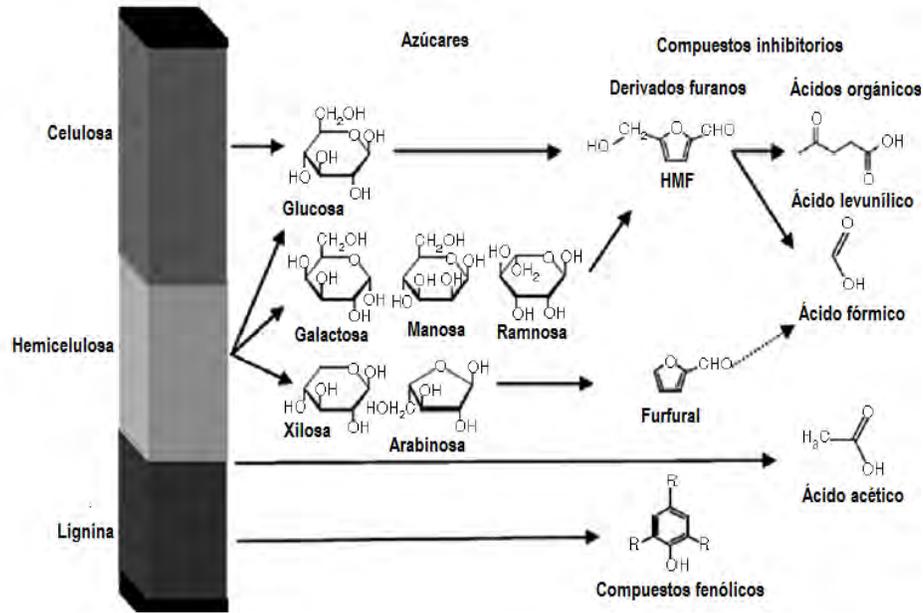


Figura 1.6 Principales compuestos formados durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Almeida *et al.* 2007).

Para la fermentación alcohólica el efecto inhibitorio de estos compuestos sobre las levaduras ha sido ampliamente estudiado (Jönsson *et al.* 2013). No obstante, los estudios que abordan el modo de acción de estos compuestos inhibitorios sobre consorcios microbianos para la producción de hidrógeno son escasos (Siqueira *et al.* 2015). De acuerdo a Cao *et al.* (2010) los derivados furanos actúan como potentes inhibidores de enzimas asociadas a la glucólisis, influenciando de manera negativa en el crecimiento de microorganismos productores de hidrógeno. Por otra parte el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular y la capacidad de penetrar y dañar la membrana celular de los microorganismos. La tolerancia de los microorganismos a la presencia de acetato en los hidrolizados lignocelulósicos depende de las condiciones de pH y el tipo de microorganismos utilizado para la producción de hidrógeno, ya que es uno de los principales metabolitos que se produce durante la fermentación oscura. Donde el acetato puede ser consumido por un consorcio microbiano (Siqueira *et al.* 2015; Kumar *et al.* 2015).

En los pre-tratamientos con hidrólisis ácida, la concentración del ácido y la temperatura son un factor crucial para la formación de compuestos inhibitorios (McMillan, 1994).

Se ha reportado que a una concentración mayor a 1000 mg/L de estos compuestos inhibitorios afectan negativamente la eficiencia de la producción de bioetanol, inhibiendo el metabolismo de los microorganismos durante la fermentación alcohólica (Mussatto *et al.* 2004). Mientras que para el proceso de la fermentación oscura para la producción de hidrógeno por consorcios microbianos, los derivados furanos a una concentración mayor a 1000 mg/L ejercen una fuerte inhibición para los microorganismos productores de hidrógeno (Quéméneur *et al.* 2012; Siqueira *et al.* 2015). La especie de *Clostridium beijerinckii* se encontró ser más resistente a los inhibidores, considerada ideal para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica (Quéméneur *et al.* 2012).

Por otro lado la digestión anaerobia se ha encontrado eficiente para remover concentraciones moderadas de estos compuestos inhibitorios (Monlau *et al.* 2014). La producción de metano se ve afectada a concentraciones altas de HMF (mayor a 10 g/L). Esto se explica debido a que la digestión anaerobia utiliza consorcios microbianos más complejos, además de un tiempo de incubación más larga que la fermentación oscura, donde los metabolitos que se generan son convertidos a metano (Barakat *et al.* 2012; Monlau *et al.* 2014).

#### **1.1.4 Detoxificación de hidrolizados para mejorar la producción de biocombustibles**

Se ha reportado varios métodos para remover compuestos inhibitorios antes del proceso de fermentación. A este procedimiento se le ha denominado detoxificación. Entre los métodos de detoxificación que se han reportado se encuentran los biológicos (uso de enzimas específicas para los compuestos inhibitorios), físicos (evaporación al vacío) y químicos (carbón activado, overliming, resinas de intercambio iónico y de adsorción) (Mussatto *et al.* 2004; Wiel *et al.* 2002).

Los métodos químicos son los más empleados donde el carbón activado adsorbente tradicional puede adsorber compuestos fenólicos, derivados furanos y ácidos orgánicos (Liu *et al.* 2012; Mateo *et al.* 2013), el tratamiento overliming (incremento de pH con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  seguido de una reducción de pH con HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) reportado para la eliminación de compuestos fenólicos y derivados furanos (Martinez *et al.* 2001), las resinas de intercambio iónico permiten separar sustancias a través de iones de grupos activos en el esqueleto de la resina, adsorbiendo ácidos, fenoles y aldehídos (Sainio *et al.* 2011; De Mancilha *et al.* 2003) y por ultimo las resinas de adsorción donde su estructura porosa es efectiva para la adsorción de alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles y derivados furanos en solución, a través de fuerzas intermoleculares de Van der Waals. La ventaja de utilizar resinas de adsorción es su alta especificidad hacia compuestos inhibitorios y poca o nula especificidad para azúcares como xilosa y glucosa (Wiel *et al.* 2002; Schwartz *et al.* 2010; Chen *et al.* 2015).

La eficacia de un método de detoxificación para mejorar la producción de biocombustibles, depende tanto del tipo de hidrolizado como de la especie de microorganismo empleado, ya que cada tipo de hidrolizado tiene un grado de toxicidad diferente, y cada especie de microorganismo tiene un diferente grado de tolerancia a los compuestos inhibitorios (Larsson *et al.* 1999).

En la Tabla 1.1 se muestran diferentes métodos de detoxificación que han sido aplicados para mejorar la producción de biocombustibles como el bioetanol e hidrógeno a partir de hidrolizados lignocelulósicos.

Tabla 1.1 Aplicaciones de adsorción en la detoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles.

Sustrato	Detoxificación	Compuestos removidos	Biocombustible	Aumento en la producción	Referencia
Hidrolizado ácido de residuos de poda de árbol de olivo	Carbón activado	Acetato (46%) Derivados furanos (98%) y compuestos fenólicos (81%)	Bioetanol	NR	Mateo <i>et al.</i> 2013
Hidrolizado ácido de mazorca de maíz	Resina Amberlite XAD-4	Furfural (99%)	Bioetanol	Alcanzó el 90% del rendimiento teórico	Weil <i>et al.</i> 2002
Hidrolizado ácido de hemicelulosa extraída de virutas de madera.	Resina Amberlite XAD-4	Furfural (100%) y lignina ácida soluble (90%)	Bioetanol	Alcanzó el 97% del rendimiento teórico	Schwartz <i>et al.</i> 2010
Hidrolizados ácidos de hemicelulosa	Overliming	Derivados furanos (52%) Compuestos fenólicos (42%)	Bioetanol	NR	Martinez <i>et al.</i> 2001
Hidrolizado ácido de la mazorca de maíz	Resina Amberlite XAD-4	HMF (99%), Furfural (99%) y vanilina (99%)	Bioetanol	Incremento de 6.5 veces	Hatano <i>et al.</i> 2013
Hidrolizado ácido de bagazo de caña de azúcar	Resina de intercambio aniónico DIAION (HPA 25)	Derivados furanos (63.4%) y compuestos fenólicos (75.8%)	Bioetanol	Incremento de 2.2 veces	Chandel <i>et al.</i> 2007
Hidrolizado ácido de paja de arroz	Tratamiento overliming y carbón activado	Furfurales (100%)	Hidrógeno	NR	Chang <i>et al.</i> 2011
Hidrolizados hidrotérmicos de almidón	Carbón activado	HMF (36-96%)	Hidrógeno	Aumento del 70% de la producción de hidrógeno	Orozco <i>et al.</i> 2012

NR: No reportado

### 1.1.5 Producción biológica del hidrógeno por fermentación oscura

Los microorganismos pueden producir hidrógeno ( $H_2$ ) por varias vías como: biofotólisis del agua usando algas, fotofermentación por bacterias fotosintéticas y por fermentación oscura llevada a cabo por bacterias anaerobias (Das *et al.* 2008).

Entre las diversas vías para la producción de hidrógeno, la fermentación oscura es un método factible ya que puede llevarse a cabo en condiciones de temperatura y presión ambiental, usando diversos compuestos o residuos orgánicos como fuente de energía (Nath y Das, 2004).

La fermentación oscura es un proceso anaerobio, que no depende de la luz, llevada a cabo por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas. Los hidratos de carbono, principalmente la glucosa, son las fuentes de carbono preferidas para este proceso. Donde la producción de hidrógeno es un producto secundario de la degradación de materia orgánica a ácidos grasos volátiles (AGVs) y alcoholes. (Lee *et al.* 2009).

La producción de hidrógeno puede llevarse a cabo por diferentes vías (Figura 1.7), como la vía Fd-hidrogenasa llevada a cabo por microorganismos estrictamente anaerobios como *Clostridium spp.* Esta vía consiste en la transferencia de electrones del piruvato a  $H^+$  por  $Fd_{red}$  (forma reducida de la ferredoxina) como acarreador de electrones y los  $H^+$  son reducidos a  $H_2$  por acción de la enzima hidrogenasa. La otra vía es llevada a cabo por anaerobios facultativos como *Enterobacter spp* donde la enzima formiato-hidrogenoliasa escinde el formiato a  $H_2$  y  $CO_2$ . Por lo que la estructura microbiana puede dar una idea sobre el mecanismo principal para la formación de hidrógeno, siendo la vía Fd-hidrogenasa predominante en la fermentación oscura al utilizar un consorcio microbiano (Lee *et al.* 2009).

Se ha reportado que de la mezcla de AGVs, acetato y butirato son los productos de fermentación predominantes en la fase líquida (García-Peña *et al.* 2009). La reacción que produce butirato es más favorable termodinámicamente (Tabla 1.2). Existen otras rutas que compiten con la producción de hidrógeno, produciendo lactato y propionato a partir de la oxidación del piruvato (Lee *et al.*, 2009).

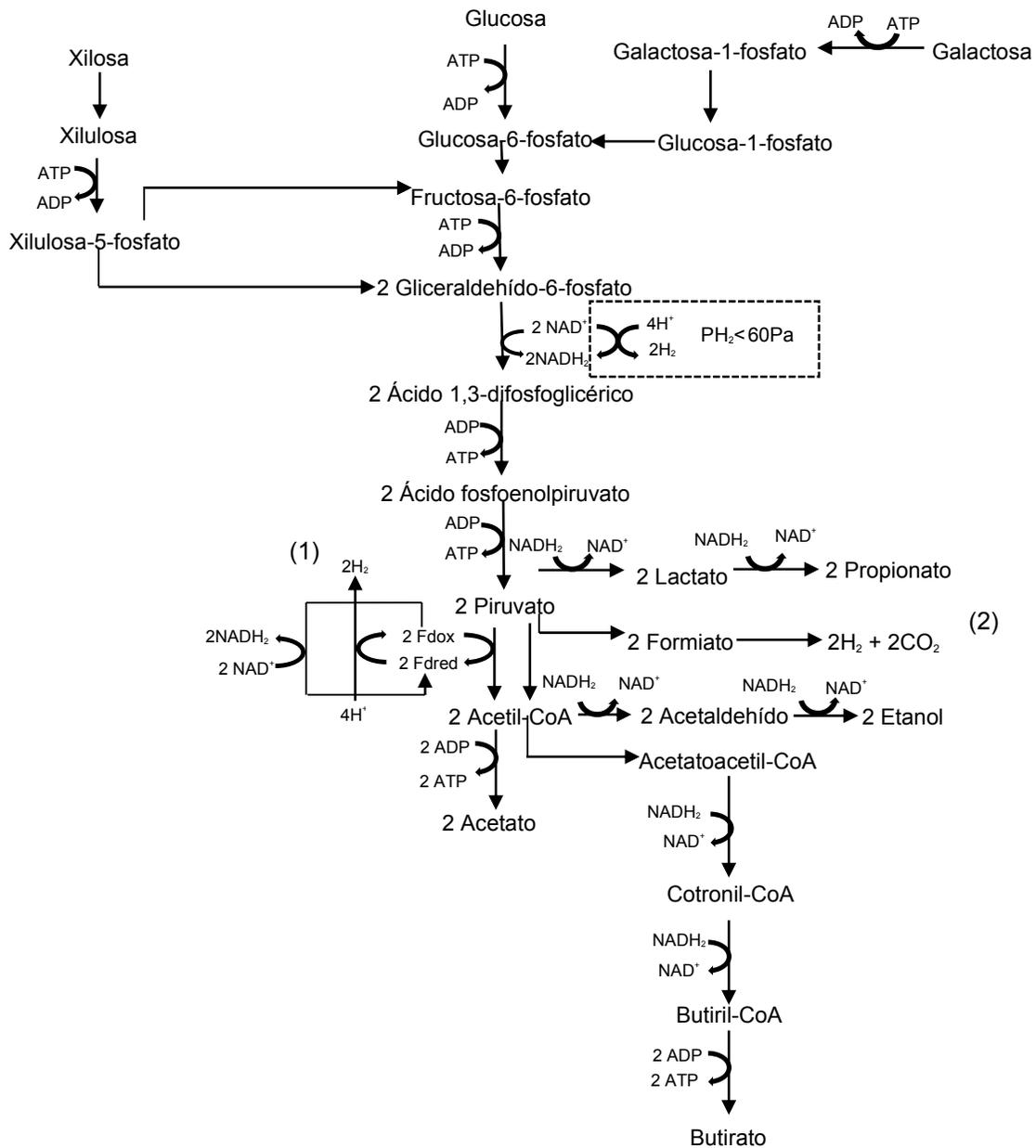


Figura 1.7 Rutas metabólicas durante la fermentación oscura de varios sustratos por un cultivo mixto; (1) vía Fd-hidrogenasa, (2) vía formiato-hidrogenoliasa (Adaptado de Prescott *et al.* 2002 y Vasconcelos de Sá *et al.* 2013).

De acuerdo a la Tabla 1.2 el rendimiento teórico de hidrógeno es de 4 moles de H<sub>2</sub>/mol de glucosa, cuando existe una presión parcial de H<sub>2</sub> menor a 60 Pa y el producto final metabólico es el acetato. Mientras que 2 moles de H<sub>2</sub>/mol de glucosa, si el producto final es el butirato y la presión parcial de H<sub>2</sub> es mayor a 60 Pa. Este rendimiento estequiométrico es únicamente alcanzable bajo condiciones de equilibrio, lo cual implica bajas presiones parciales de hidrógeno y muy bajas velocidades de producción (Nath y Das, 2004). Los microorganismos productores de hidrógeno tienen un metabolismo bifásico en el que la primera fase de su crecimiento consiste en fermentación acidogénica del sustrato, pues se producen altos niveles de acetato y butirato, y en menor grado, propionato, succinato, formiato y lactato. La acumulación de los productos de la fermentación disminuye el pH; para compensar esta disminución, las células entran a una fase solventogénica de su crecimiento, en la que son capaces de convertir el butirato y el acetato, en butanol y acetona respectivamente (Finch *et al.* 2011). Por lo que los bajos rendimientos de producción de hidrógeno actualmente obtenidos en la fermentación oscura se deben al metabolismo de los microorganismos, donde la acumulación de alcoholes y ácidos inhiben el crecimiento celular y disminuyen la producción de hidrógeno (Oh *et al.* 2011).

Tabla 1.2 Estequiometría de metabolitos asociados en la producción de hidrógeno en la fermentación oscura.

Metabolito	Estequiometría	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)
Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 4H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$	-206
Butirato	$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2H_2 + CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2$	-254
Formiato	$2HCOOH \longrightarrow 2CO_2 + 2H_2$	-6

(Lee *et al.* 2009).

## **1.2 Antecedentes**

### **1.2.1 Utilización del bagazo de *A. tequilana* como sustrato potencial para la producción de biocombustibles**

El *Agave tequilana* Weber var. azul es una planta monocotiledónea de color azul o verde grisáceo, con un tallo muy corto del cual brota una roseta de hojas o pencas apretadas con espinas marginales. La planta se caracteriza por poseer una epidermis foliar con cutícula gruesa, revestimiento ceroso y estomas complejos, que recubren la estructura visible de la planta. Además de contener cristales de oxalato de calcio encargados de brindar firmeza a los tejidos que conforman al tallo y a las hojas, servir como reserva de calcio y proteger a la planta de insectos y animales (Nobel, 1988; Ilarslan *et al.* 2001).

El tequila es una bebida alcohólica mexicana, que se produce a partir de la fermentación y posterior destilación del jugo obtenido de *A. tequilana*, donde el tallo también conocido como piña o cabeza es la parte comercial de la planta ya que se utiliza como fuente de azúcares fermentables en el proceso de elaboración de tequila (Narváez y Sánchez 2009).

Es mundialmente conocida la importancia que tiene la industria del tequila en diferentes estados de México, principalmente en el estado de Jalisco. Su desarrollo industrial ha ido en crecimiento desde hace tiempo con dos importantes problemas que resolver, las aguas residuales llamadas vinazas, producto de la destilación del tequila y el volumen de bagazo de agave, producto de la extracción de azúcares fermentables de la piña de *A. tequilana* (Iñiguez *et al.* 2005). La producción de bagazo de agave es equivalente al 40 % del peso de las piñas de agave molidas en peso húmedo (Cedeño y Alvarez-Jacobs, 2003). Según estimaciones del Consejo Regulador de Tequila (CRT) del año 2008 al 2014 se procesaron en promedio 927 mil toneladas de agave por año, de las cuales produjeron 371 mil toneladas de bagazo (Figura 1.8).

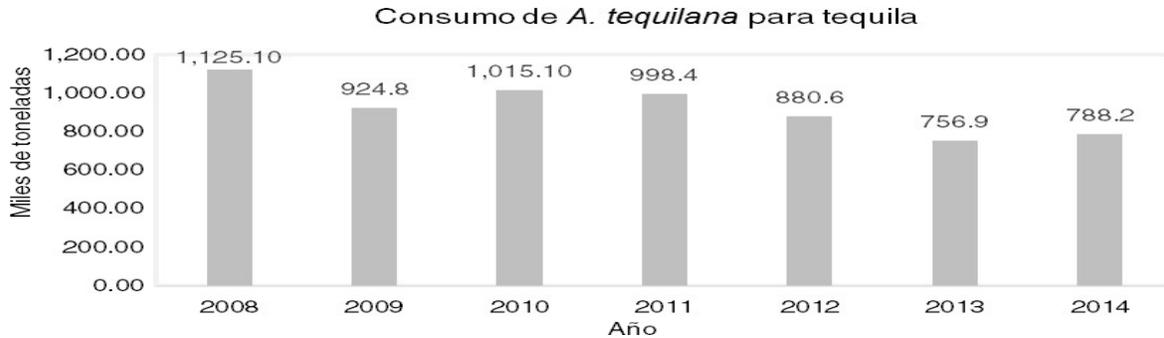


Figura 1.8 Consumo de *A. tequilana* para tequila del 2008 al 2014. Fuente: CRT (2015).

El bagazo de *A. tequilana* es un residuo agroindustrial que posee un alto contenido de humedad (80%), constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Su transporte y confinamiento se dificulta por los grandes volúmenes generados, provocando tiraderos clandestinos o incorporaciones inadecuadas a campos agrícolas. Lo que favorece riesgos fitosanitarios, además de promover alteraciones negativas a la fertilidad de los suelos y ocasionar contaminación ambiental por lixiviados. Adicionalmente el contenido de azúcares remanentes es suficiente para la infestación por hongos y levaduras ocasionando malos olores y productos indeseables, siendo un excelente hospedero para plagas y enfermedades de plantas (Rodríguez *et al.* 2001; Crespo *et al.* 2013; Moran-Salazar *et al.* 2015).

En la actualidad existen propuestas que ofrecen alternativas ambientalmente amigables para el bagazo de *A. tequilana*, como lo es la biotransformación a composta y vermicomposta, para usarse en enmiendas agrícolas como mejorador de suelo y sustrato para plántulas (Rodríguez *et al.* 2001; Iñiguez *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2013). Así como su utilización como complemento alimenticio de rumiantes (Ramírez-Cortina *et al.* 2012). Y también usarse para elaborar madera plástica (Canché Escamilla *et al.* 2014), con el cual se podrían obtener beneficios económicos para los productores.

Por otra parte al ser un residuo lignocelulósico, el bagazo de *A. tequilana* ha sido sometido a diferentes pre-tratamientos químicos (ácidos, alcalinos y líquidos iónicos) y tratamientos enzimáticos (Tabla 1.3). Con el fin de extraer azúcares fermentables en la fracción soluble (hidrolizado) y utilizarlo como sustrato para la producción de diferentes biocombustibles.

Tabla 1.3 Producción de biocombustibles a partir de bagazo de *A. tequilana*.

Biocombustible	Pre-tratamiento	Tratamiento	*Rendimiento	**Rendimiento	Referencia
Bioetanol	Ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Enzimático (celulasas y glucosidasas)	248.8 mg azúcares fermentables /g bagazo	0.18 g etanol/g bagazo	Saucedo-Luna <i>et al.</i> 2010
Bioetanol	Ethanosolv (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -etanol)	Enzimático (Novozymes)	510 mg azúcares fermentables /g bagazo	0.25 g etanol/g bagazo.	Caspeta <i>et al.</i> 2014
Metano	Ácido (HCl)	-	558 mg azúcares totales /g bagazo	0.26 L CH <sub>4</sub> /g DQO.	Arreola-Vargas <i>et al.</i> 2015a
Hidrógeno	-	Enzimático (Celluclast 1.5 L)	207 mg azúcares totales /g bagazo	0.76-1.36 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	Abreu-Sherrer, 2013
Hidrógeno	-	Enzimático (Celluclast 1.5L)	-	1.35-1.53 mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido	Contreras-Dávila, 2015

\*Rendimiento de sacarificación; \*\*Rendimiento de producción de biocombustible.

### 1.2.2 Caracterización de la piña y bagazo de *A. tequilana*

En base a la relación que guarda su peso en la biomasa total de la planta, la piña representa el 45% del peso total de la planta, el restante 55% está integrado por las hojas o pencas, las cuales constituyen los residuos primarios del cultivo (González, 2013).

La piña de *A. tequilana* está formada por una fracción soluble y una fracción insoluble. La fracción soluble es rica en fructanos, mientras que la fracción insoluble está constituido por fibra lignocelulósica (Flamm *et al.* 2001; González, 2013).

#### 1.2.2.1 Caracterización de la fracción soluble de la piña de *A. tequilana*

La fracción soluble está constituida principalmente por fructanos; polímeros u oligómeros compuestos principalmente de unidades de fructosa unidas a una molécula de sacarosa (Figura 1.9) (Lopez *et al.* 2003).

Los fructanos son carbohidratos de reserva que se sintetizan y almacenan en los tallos de la planta de *A. tequilana*; actúan como osmoprotectores durante la sequía (Arrizon *et al.* 2010). De acuerdo a su estructura molecular, los fructanos se clasifican en inulinas, cuando entre las moléculas de fructosa predominan enlaces

$\beta$  (2,1), o levanas, cuando predominan enlaces  $\beta$  (2,6). Los fructanos de *A. tequilana* consisten en una mezcla compleja, que contiene principalmente fructanos altamente ramificados y neo-fructanos (grupo de fructanos mixtos) (Mancilla-Margalli y López, 2002; Lopez *et al.* 2003).

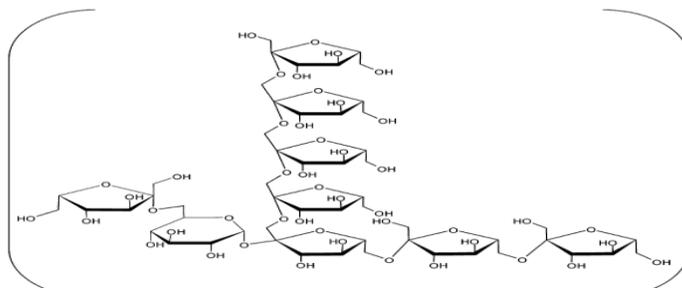


Figura 1.9 Estructura de fructanos propuesta para una planta de *A. tequilana* de 8 años (Lopez *et al.* 2003).

Tradicionalmente, durante la elaboración de tequila, las piñas de *A. tequilana* son cocidas al vapor en hornos de ladrillo durante aproximadamente 36 h con el fin de hidrolizar los fructanos y liberar principalmente fructosa y glucosa como azúcares fermentables. Más recientemente, varias destilerías de tequila han sustituido a sus hornos de ladrillo por autoclaves con el fin de disminuir el tiempo de cocción. La hidrólisis de fructanos se acelera cuando existen condiciones de alta temperatura y humedad y a un pH de 4.5 (Lamas *et al.* 2004).

El proceso de cocción es una etapa particularmente importante, ya que además de la generación de azúcares fermentables por hidrólisis térmica de los fructanos presente en la piña de *A. tequilana*, se llevan a cabo una serie de reacciones químicas llamadas reacciones de Maillard, que generan muchos de los compuestos responsables de las características organolépticas de la bebida (Mancilla-Margalli y López, 2002).

Se han identificado alrededor de 75 compuestos derivados de las reacciones de Maillard, incluyendo compuestos furanos, piranos, aldehídos, nitrogenados y sulfurados. Siendo 2-furoato de metilo, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona, y 5-hidroximetilfurfural (HMF) los compuestos más abundantes, además de encontrar una serie de cadenas cortas y largas de ácidos grasos (Mancilla- Margalli

y López, 2002). El HMF se genera por la deshidratación de azúcares por efecto de la temperatura y tiempo prolongado; parcialmente responsable del aroma característico del agave cocido (Lamas *et al.* 2004).

Adicionalmente, durante el proceso de cocimiento se ablanda la textura del agave facilitando su molienda, lo cual puede deberse a una pérdida de turgencia, de aire vascular y extracelular y a la desnaturalización y degradación de los componentes de la membrana celular y de otros polisacáridos (Lamas *et al.* 2004).

### 1.2.2.2 Caracterización del bagazo de *A. tequilana* (fracción insoluble)

La fibra lignocelulósica representa el segundo constituyente en importancia en el *A. tequilana*. Por su composición es insoluble en agua. Por lo que no se afecta en gran medida durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*. Siendo el principal constituyente del bagazo que se obtiene del proceso de cocción (Tabla 1.4) (Saucedo-Luna, 2010; González, 2013).

Tabla 1.4 Composición del bagazo de *A. tequilana*.

Compuesto	Compuesto (%BS)
Hemicelulosa	20
Celulosa	42
Lignina	15
Solubles	23

(Saucedo-Luna, 2010)

### 1.2.3 Producción de hidrógeno a partir de bagazo de *A. tequilana*

Los sistemas reportados para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *A. tequilana* han sido en lote y continuos (CSTR, TBR) por Abreu-Sherrer, (2013) y Contreras-Dávila, (2015). En el trabajo de Abreu-Sherrer, (2013) se aplicaron diferentes tratamientos de sacarificación del bagazo de *A. tequilana* (Tabla 1.5).

Abreu-Sherrer, (2013) reportó que el tratamiento de hidrólisis enzimática fue suficiente para sacarificar al bagazo de *A. tequilana* sin ser pre-tratado (Tabla 1.5). Esto probablemente se debió a que el proceso de cocción y molienda que se aplica

en la piña de *A. tequilana*, funcionó como un pre-tratamiento en las fibras de *A. tequilana*.

Tabla 1.5 Tratamientos aplicados a las fibras de bagazo de *A. tequilana*.

Tratamiento	Caracterización de hidrolizados	Rendimiento de sacarificación
Secuencial: - Alcalino con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /NaMoO <sub>4</sub> -Ácido con HCl -Hidrólisis Enzimática	AR: 4841 mg/L* AT: 6320 mg/L* Furfural: ND* HMF:ND*	121.05 mg AR/g bagazo 150 mg AT/g bagazo
-Hidrólisis Enzimática	AR: 6728 mg/L AT: 8290 mg/L Furfural: ND HMF: ND	168.2 mg AR/g bagazo 207 mg AT/g bagazo

AR: Azúcares reductores; AT: Azúcares totales; ND: no detectados (Abreu-Sherrer, 2013); \*Los datos mostrados corresponde al hidrolizado enzimático después de los pre-tratamientos.

La Tabla 1.6 muestra los rendimientos molares (RMH) y velocidades de producción de hidrógeno (VVP) obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *A. tequilana* (Abreu-Sherrer, 2013; Contreras-Dávila, 2015).

Tabla 1.6 Producción de hidrógeno en sistemas en lote y continuo a partir de hidrolizados de bagazo de *A. tequilana*.

Sistema	Sustrato	VVP (mL H <sub>2</sub> /L-h)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol glucosa)	Referencia
Lote	3.15 g AT/L de hidrolizados con tratamiento secuencial	83.70	1.36	Abreu-Sherrer, 2013
Lote	4.1g AT/L de HE	60.03	1.31	Abreu-Sherrer, 2013
Continuo (CSTR)	CAT de HE: 0.54 g AT/L-h. (TRH:12 h)	72.55	0.76	Abreu-Sherrer, 2013
Continuo (CSTR)	COV de HE: 52.5 y 40.2 g DQO/L-d	105.41	1.35	Contreras-Dávila, 2015
Continuo (TBR)	COV de HE: 52.9 g DQO/L-d	143.75	1.53	Contreras-Dávila, 2015

HE: hidrolizado enzimático; CAT: Carga orgánica por azúcares totales; TRH: tiempo de retención hidráulico; COV: carga orgánica volumétrica.

Tanto los RMH y las VVPH reportados son bajos en comparación con sustratos modelos (1.03-2.79 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa; 170-1270 ml H<sub>2</sub>/L-h) (Kyung-Won *et al.* 2011). Abreu-Sherrer, (2013) propuso que esto puede deberse a que durante la hidrólisis enzimática del bagazo de *A. tequilana* se generan oligómeros de celulosa y hemicelulosa ligados a restos de lignina, los cuáles sean los que afecten negativamente a la producción de hidrógeno.

#### **1.2.4 Limitantes para la producción de hidrógeno a partir de residuos lignocelulósicos**

Hasta el momento no existen estudios sobre la naturaleza y el papel de todos los compuestos presentes en los hidrolizados para la producción de hidrógeno, debido a la complejidad de la biomasa lignocelulósica y al tipo de tratamiento aplicado. Sin embargo, los bajos rendimientos de hidrógeno obtenidos podrían estar asociados a las siguientes explicaciones:

- A los compuestos inhibitorios presentes en los hidrolizados afectando negativamente la eficiencia de la producción de hidrógeno, ocasionando daño celular en los microorganismos fermentativos y/o inhibiendo su metabolismo. Sin embargo, la magnitud de estos impactos nocivos depende básicamente de dos factores, la concentración de los compuestos inhibitorios y la tolerancia específica de microorganismos hacia ellos (Kumar *et al.* 2015; Mussatto *et al.* 2004; Quéméneur *et al.* 2012; Siqueira *et al.* 2015).
- El hidrógeno se produce utilizando consorcios microbianos, lo que podría permitir que las hexosas y pentosas presentes en los hidrolizados sean utilizadas durante la fermentación. Sin embargo, es importante mencionar que la competencia e interacciones entre microorganismos podrían afectar patrones metabólicos, impactando negativamente en el rendimiento de hidrógeno (Quéméneur *et al.* 2011; Nissilä *et al.* 2014).
- Las características de los hidratos de carbono en los hidrolizados son importantes e influyen en el rendimiento de la fermentación oscura. Es probable que la presencia de oligosacáridos afecte negativamente la producción de hidrógeno. Probablemente porque los microorganismos tienen

que invertir energía para la producción de enzimas con el fin de hidrolizar oligosacáridos (Quéméneur *et al.* 2011; Arreola-Vargas *et al.* 2014).

### **1.3 Justificación**

El bagazo de *A. tequilana* al ser una fibra lignocelulósica tiene las características adecuadas para ser un sustrato atractivo para la producción de hidrógeno. Donde no es necesario un pre-tratamiento previo, debido a que el bagazo de *A. tequilana* proviene de un proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*. No obstante, como lo han demostrado estudios anteriores los rendimientos de sacarificación de la hidrólisis enzimática del bagazo cocido de *A. tequilana* han sido bajos. Probablemente debido a que la celulosa cristalina no está siendo afectada durante la hidrólisis enzimática. Así mismo, los rendimientos y velocidades de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos fueron bajos comparados con lo obtenido por sustratos modelos. Esto podría deberse a la presencia de compuestos inhibitorios en los hidrolizados como lo son los compuestos fenólicos formados durante los tratamientos de sacarificación o a los compuestos solubles remanentes en el bagazo de *A. tequilana* formados durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio más completo en cuanto a los cambios químicos y morfológicos de los constituyentes lignocelulósicos (celulosa amorfa y cristalina, hemicelulosa y lignina) de las fibras de la piña y bagazo de *A. tequilana*. Evaluando el proceso tradicional de cocción con vapor de la piña de *A. tequilana*, donde se genera grandes cantidades de bagazo cocido de *A. tequilana*, comparándolo con tratamientos alternos para extraer azúcares fermentables de piña de *A. tequilana*. Así mismo estudiar diferentes tratamientos de sacarificación del bagazo cocido de *A. tequilana* en condiciones suaves (hidrólisis enzimática) y en condiciones severas (hidrólisis ácida). De igual manera, investigar si los compuestos fenólicos afectan el proceso de fermentación oscura para la producción de hidrógeno y si su remoción permite mejorar la producción de hidrógeno.

#### **1.4 Hipótesis**

- I. El proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*, para la extracción de las mieles fermentables, afecta el contenido de las fibras y reduce la cantidad de celulosa cristalina.
- II. Los compuestos solubles remanentes en el bagazo de *A. tequilana* formados durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana* presentan un efecto inhibitorio en la fermentación oscura para la producción de hidrógeno.
- III. La remoción de compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados mejoran los rendimientos y velocidades de producción de hidrógeno vía fermentación oscura.

#### **1.5 Objetivo general**

Estudiar la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados obtenido de bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul.

#### **1.6 Objetivos específicos**

- a. Evaluar el efecto de diferentes tratamientos para extraer azúcares de la piña y bagazo de *A. tequilana* sobre la cristalinidad de la celulosa, la morfología y el contenido de fibras.
- b. Optimizar la hidrólisis enzimática de bagazo de *A. tequilana*.
- c. Estudiar el efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de compuestos solubles remanentes en el bagazo de *A. tequilana* formados durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*.
- d. Estudiar el efecto de la remoción de compuestos fenólicos presentes en hidrolizados enzimáticos y ácidos de bagazo de *A. tequilana* sobre la producción de hidrógeno.
- e. Determinar el efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de los concentrados obtenidos a partir de las aguas de lavado e hidrólisis enzimática del bagazo de *A. tequilana*.

## 1.7 Estructura de la tesis

El presente capítulo presenta la composición estructural de los residuos lignocelulósicos, los pre-tratamientos de la biomasa lignocelulósica, la formación de inhibidores durante los pre-tratamientos, la remoción de dichos inhibidores y el proceso de fermentación oscura. También se describen los componentes lignocelulósicos del bagazo *A. tequilana* y su utilización potencial como sustrato para la producción de biocombustibles (bioetanol, metano e hidrógeno). Así mismo, se plantea la justificación, hipótesis y objetivos del presente trabajo.

El capítulo 2 describe los estudios que se realizaron para entender los cambios químicos y morfológicos de los constituyentes lignocelulósicos presentes en la piña y bagazo de *A. tequilana*, después de ser sometidos a diferentes tratamientos de extracción de azúcares. Para esto, se caracterizó la composición química de las fibras, se determinó la cristalinidad de las mismas y se observó su morfología microscópica. Los tratamientos estudiados fueron el proceso de cocción y dos procesos mecánicos en la piña y dos hidrólisis (enzimática y ácida) en el bagazo.

En el capítulo 3 se describe la optimización de las condiciones de la hidrólisis enzimática de bagazo de *A. tequilana* y su efecto sobre la producción de hidrógeno.

En el capítulo 4 se describe el efecto que tiene la remoción de los compuestos fenólicos presentes en el bagazo cocido de *A. tequilana* y en los hidrolizados de bagazo sobre la producción de hidrógeno. Dichos compuestos se forman durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana* y durante la hidrólisis enzimática y ácida del bagazo. Para esto, se lavó el bagazo con agua y a estas aguas se les removieron los compuestos fenólicos por medio de una resina de adsorción (AMBERLITE™FX66). Por otra parte los hidrolizados enzimáticos y ácidos fueron tratados con la misma resina. Las aguas de lavado y los hidrolizados tratados con la resina se emplearon para realizar pruebas de producción de hidrógeno en lote. Así mismo, se estudió el efecto de los compuestos fenólicos retenidos en la resina sobre la producción de hidrógeno.

Finalmente, en el capítulo 5 se presenta una discusión general de los resultados obtenidos en esta tesis, incluyendo conclusiones generales y perspectivas.

## CAPÍTULO 2

### Caracterización de las fibras de piña y bagazo de *A. tequilana* sometidas a diferentes tratamientos para la extracción de azúcares

#### Resumen

En este estudio se evaluaron diferentes procesamientos (proceso tradicional de cocción y dos procesos mecánicos alternos) de la piña de *A. tequilana* (PAT) para extraer azúcares fermentables y diferentes tratamientos de sacarificación (hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida) del bagazo de *A. tequilana* (BAT) procedente del proceso de cocción de la PAT. La caracterización de las fibras de la PAT y BAT permitió entender los cambios químicos y morfológicos de los constituyentes lignocelulósicos presentes en las fibras de la PAT y del BAT. Se encontró que el proceso de cocción resultó ser el más eficiente para remover la fracción soluble y extraer azúcares fermentables de la PAT. Asociado a esto, se observó también la remoción del parénquima presente en las fibras de la PAT, permitiendo que el esclerénquima quedara expuesto en el BAT resultante de dicho proceso. Por otra parte se encontraron cristales de oxalato de calcio, tanto en la PAT como en el BAT. Por otra parte la hidrólisis ácida solubilizo los cristales, permitiendo una remoción alta de la fracción amorfa de la fibra lo cual representa un tratamiento atractivo para hidrolizar el BAT. Sin embargo, la cristalinidad de celulosa no se vio afectada.

#### 2.1 Introducción

La biomasa lignocelulósica representa una fuente de carbono sostenible para su transformación en biocombustibles, como el hidrógeno, debido a su bajo costo y amplia disponibilidad. No obstante, su conversión directa no es posible, debido a que la biomasa lignocelulósica es muy recalcitrante a la biodegradación y ofrece un acceso limitado a las enzimas o microorganismos hidrolíticos. Por lo que es necesario la aplicación de pre-tratamientos seguido de un tratamiento enzimático para hidrolizar las estructuras heterogéneas y cristalinas de la biomasa lignocelulósica (De Vrije *et al.* 2002).

Los pre-tratamientos termoquímicos son los más utilizados en comparación con los biológicos o mecánicos debido a que los tiempos de procesamiento son más cortos,

y se obtienen mayores rendimientos. Sin embargo, a pesar de la gran variedad de pre-tratamientos reportados, no existe un tratamiento universal que sea sugerido para todo tipo de biomasa lignocelulósica, probablemente debido a que el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa varía de acuerdo a la naturaleza de la biomasa (Kumar *et al.* 2009).

La elección del tratamiento idóneo para extraer azúcares fermentables de un residuo lignocelulósico se basa en la cuantificación de azúcares fermentables y formación de compuestos inhibitorios para procesos fermentativos. Sin embargo, el conocimiento exacto de la composición química de la biomasa es fundamental cuando se trata de entender y evaluar la efectividad de los pre-tratamientos y tratamientos que se aplican para liberar azúcares fermentables (Kumar *et al.* 2009; Li *et al.* 2012; FitzPatrick, 2011). Con la aplicación de diversas técnicas analíticas se puede obtener una mejor caracterización de las fracciones amorfas y cristalinas de la biomasa lignocelulósica. Permitiendo tener una mejor comprensión de los cambios estructurales de dichas fracciones y del impacto de los tratamientos aplicados para extraer azúcares fermentables. (Kumar *et al.* 2009; FitzPatrick, 2011).

Un parámetro importante en la caracterización de la biomasa lignocelulósica es la estructura cristalina de la celulosa, la cual no ha sido completamente entendida, debido a su complejidad. Se ha usado ampliamente un parámetro denominado índice de cristalinidad (IC) para describir la cantidad relativa del material cristalino en la celulosa. El cálculo del IC de la celulosa a partir del análisis de difracción de rayos X (DRX), se puede realizar utilizando diferentes métodos como la deconvolución de picos mediante un ajuste de curvas (utilizando funciones como la Gaussiana y la Lorentziana), la medida de los picos cristalinos y amorfos más altos, o la sustracción de la parte amorfa (Park *et al.* 2010). La medición del IC de materiales lignocelulósicos es más difícil de determinar en comparación con materiales celulósicos, debido a que el IC se ve afectado por el contenido de celulosa amorfa, hemicelulosa y lignina (Zhang *et al.* 2004).

El BAT es un residuo lignocelulósico que cuenta con un alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de lignina, por lo que tiene un alto potencial como sustrato para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. Este residuo es generado durante el proceso de cocción y molienda de la PAT para hidrolizar fructanos y liberar azúcares fermentables (Bautista *et al.* 2001). La composición del BAT depende de las condiciones en las que se realice el tratamiento térmico y la forma en la que se lleve a cabo la desintegración y molienda de la PAT cocida (Lamas *et al.* 2004). Es de esperarse que el procesamiento de la PAT podría acondicionar a la fibra lignocelulósica para poder ser hidrolizada directamente sin la necesidad de aplicar pre-tratamientos (Abreu-Sherrer, 2013).

El IC de la celulosa en el BAT que se ha reportado es de 61% y 70% (Perez-Pimienta *et al.* 2015; Kestur *et al.* 2013), esta variación se debe al tipo de método utilizado para obtener el IC. A diferencias de otros materiales lignocelulósicos, donde la cristalinidad se debe solo a la celulosa cristalina, en *A. tequilana* la cristalinidad se debe tanto a cristales de oxalato de calcio como a la celulosa cristalina (Perez *et al.* 2013). Sin embargo, no se ha estudiado si la presencia de los cristales de oxalato de calcio afecta la eficiencia de los tratamientos que se aplican para liberar azúcares fermentables.

El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios sobre la cristalinidad de celulosa, el contenido de fibras y la morfología de las fibras de PAT y BAT sometidas a diferentes procesos para extraer azúcares fermentables.

Para este estudio las fibras se caracterizaron antes y después de cada proceso aplicado. En el caso de la PAT se evaluaron 3 procesos para extraer azúcares fermentables; el proceso tradicional de cocción con vapor y dos procesos mecánicos alternos (empleando una desgarradora y un extractor de jugos doméstico) (Figura 2.1). Para el BAT se evaluaron dos tratamientos de sacarificación (una hidrólisis enzimática en condiciones suaves y una hidrólisis ácida en condiciones severas) (Figura 2.1). Utilizando BAT cocido originado del proceso tradicional de cocción de la PAT.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Biomasa

La PAT, y dos tipos de BAT fueron colectados en la tequilera “Casa Herradura”, localizada en Amatitán, Jalisco.

### 2.2.2 Tratamientos aplicados para extraer azúcares fermentables

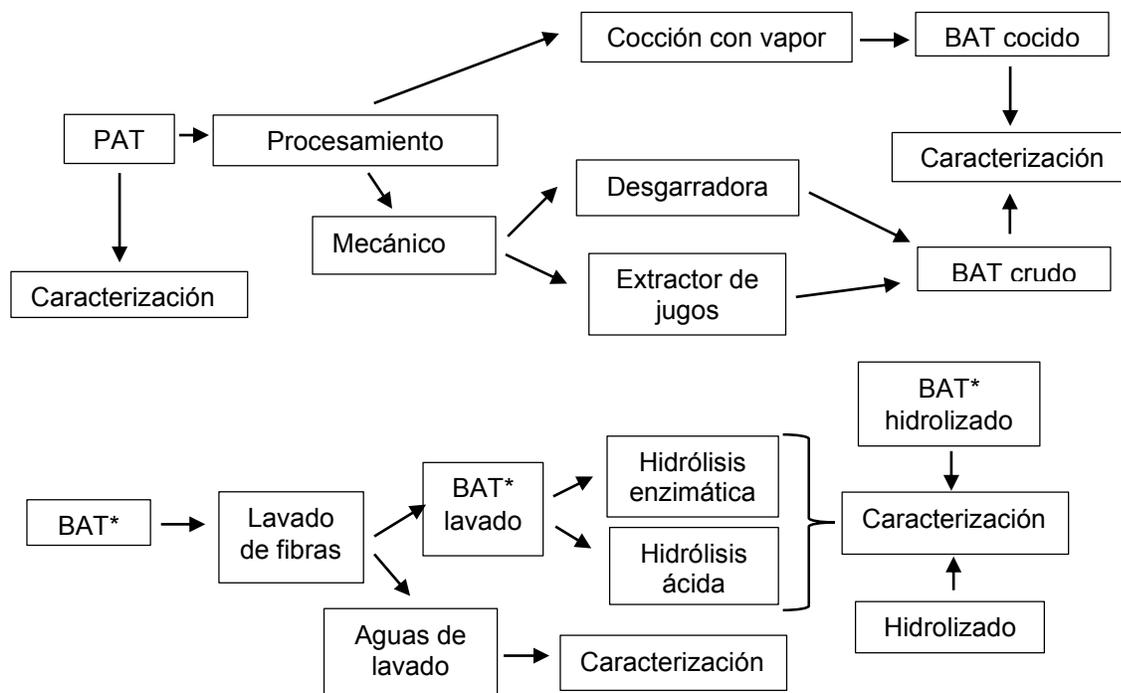


Figura 2.1 Estrategia experimental para evaluar diferentes procesos para extraer azúcares fermentables de las fibras de *A. tequilana*; BAT<sup>\*\*</sup>: bagazo cocido de *A. tequilana* proveniente del proceso de cocción con vapor. La caracterización de las aguas de lavado e hidrolizados se abordan en el capítulo 4.

#### 2.2.2.1 PAT

La PAT fue fraccionada en trozos con peso menor a 50 g, una fracción fue sometida a un tratamiento mecánico para extraer azúcares fermentables por medio de un extractor de jugos doméstico. La otra fracción se sometió a un secado a 60 °C por 12 horas para su conservación y análisis posterior.

### **2.2.2.2 BAT**

El BAT proviene de dos procesos diferentes a los que se somete la PAT en “Casa Herradura”. Uno, es un proceso térmico que se realiza con vapor en hornos tradicionales. El otro es un proceso alternativo que se realiza desgarrando la PAT e impregnándola con agua caliente. En ambos casos la PAT tratada se somete a una compresión para extraer las mieles fermentables. Los detalles de temperatura y tiempo son información no disponible. Ambos BAT se secaron a temperatura ambiente para su conservación.

El BAT cocido que se origina por el proceso de cocción con vapor, fue el sustrato para realizar la hidrólisis enzimática y ácida. Por lo que las fibras secas del BAT fueron cortadas en trozos de 2 cm, lavadas con agua destilada para eliminar compuestos solubles remanentes del proceso de cocción de la PAT, y secadas a 60 °C por 12 horas.

La hidrólisis enzimática se realizó de acuerdo a lo establecido en el trabajo de Abreu-Sherrer, (2013) utilizando Celluclast 1.5L en una relación de 1g de enzima por gramo de bagazo. El bagazo seco se suspendió a una concentración de 4% (w/v) de sólidos en un buffer de citratos 50mM a pH 4.5. La hidrólisis se efectuó a 45°C por 10 horas.

La hidrólisis ácida fue realizada de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas en el trabajo de Arreola-Vargas *et al.* 2015, utilizando 5% (w/v) de sólidos de bagazo seco en HCl diluido al 2.7%. La hidrólisis se efectuó a una temperatura de 123.6°C por un período de 1.3 horas.

### **2.2.3 Caracterización de fibras**

Para la determinación de fibras y DRX las fibras de PAT sin ningún tratamiento, BAT y BAT hidrolizado, previamente secadas, fueron pulverizadas utilizando un molino Thomas Wiley® Mini-Mill. Mientras que para observar su morfología, se utilizaron fibras de un tamaño de 1 cm aproximadamente.

### **2.2.3.1 Determinación de fibras.**

Se realizó mediante un procedimiento secuencial ANKOM con bolsas de poliéster, basado en el método de Van Soest, realizando la determinación de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina detergente ácido (LDA). Lo que permitió conocer el contenido de los constituyentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) (Keys *et al.* 1969).

### **2.2.3.2 DRX**

Se utilizó una radiación monocromática Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1.5818$  Å) generado por un difractómetro de rayos X para polvos marca Bruker D8 Advance con un voltaje de 35 keV y una corriente de 25 mA. La fracción amorfa y cristalina en las fibras se calculó entre valores  $2\theta$  de 5° y 60° con un tamaño de paso de 0.015°. Se utilizó un estándar de celulosa microcristalina (AVICEL PH101) para determinar los picos cristalinos de celulosa los cuales están reportados en la literatura a valores de  $2\theta$  de 15°, 16.5°, 22.8 ° y 34.6°. El IC se calcula con la Ecuación 2.1, mediante el método de deconvolución, a través del programa MagicPlot. El cual permite separar la contribución amorfa de la cristalina mediante un ajuste de curvas, asumiendo funciones Gaussianas para cada pico (Park *et al.* 2010).

$$IC = \frac{I_c}{I_c + I_a} (100) \quad (2.1)$$

Donde  $I_c$  corresponde al área total de la fracción cristalina, mientras que  $I_a$  corresponde al área total de la fracción amorfa.

### **2.2.3.3 Caracterización morfológica**

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido con detector de energía dispersiva (SEM-EDS) FEI Quanta 200, para observar la morfología superficial de las fibras.

## **2.3 Resultados y discusión**

### **2.3.1 Caracterización de la celulosa microcristalina (AVICEL PH101)**

El IC obtenido para el estándar de celulosa microcristalina fue de 62.9% el cual está dentro de los intervalos reportados cuando se usa el método de deconvolución (Park *et al.* 2010). Las flechas en la Figura 2.2 indican los picos cristalinos, mientras que la fracción amorfa es el principal contribuyente para el ensanchamiento de los picos.

Las estructuras cristalinas de la celulosa no pudieron visualizarse por SEM-EDS; esto podría deberse a que el tamaño de la celulosa cristalina que se han reportado es de 5nm (Park *et al.* 2010), tamaño que no pudo ser visualizado en el equipo de SEM-EDS.

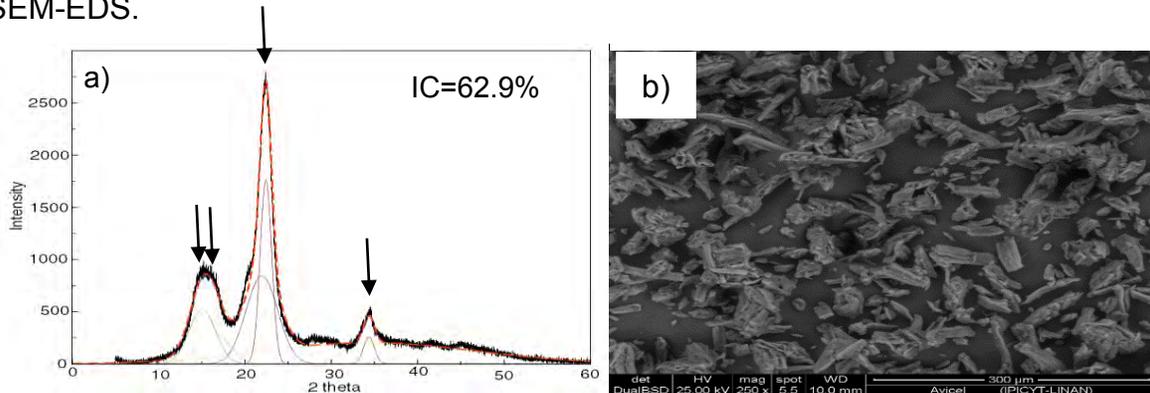


Figura 2.2 Caracterización de la celulosa microcristalina. a) Difractograma de DRX; b) SEM-EDS.

### 2.3.2 Evaluación de los tratamientos para extraer azúcares fermentables aplicados a la PAT

Las fibras de PAT contienen un alto porcentaje de solubles (fructanos) (Figura 2.3). Por lo cual, el difractograma de DRX resultante presentó un ensanchamiento muy pronunciado de los picos (Figura 2.4a). Esto dificultó determinar el IC ya que los picos correspondientes a la celulosa cristalina quedaron encubiertos (Figura 2.4a).

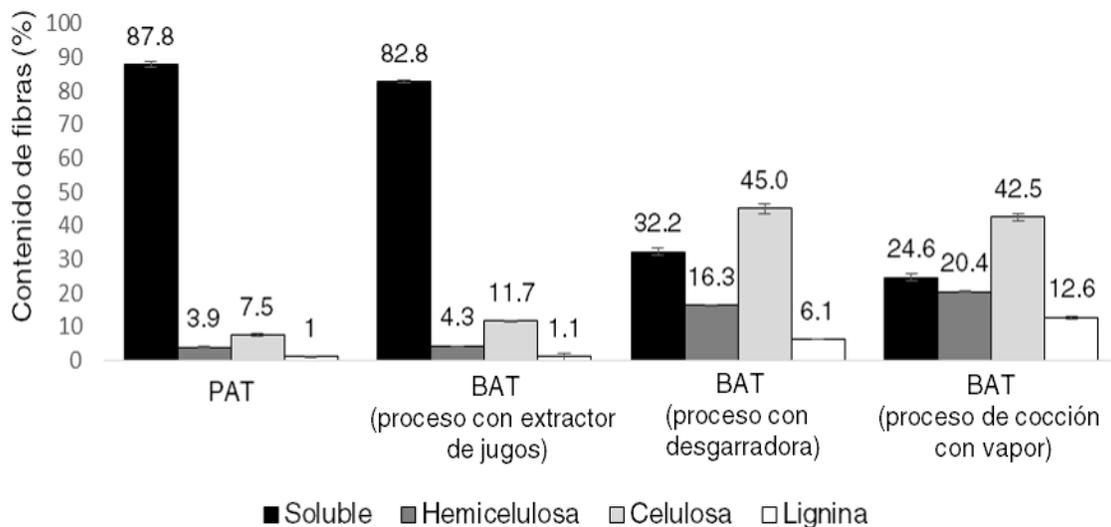


Figura 2.3 Cambio en el contenido de fibras (%) durante los diferentes procesamientos de la PAT.

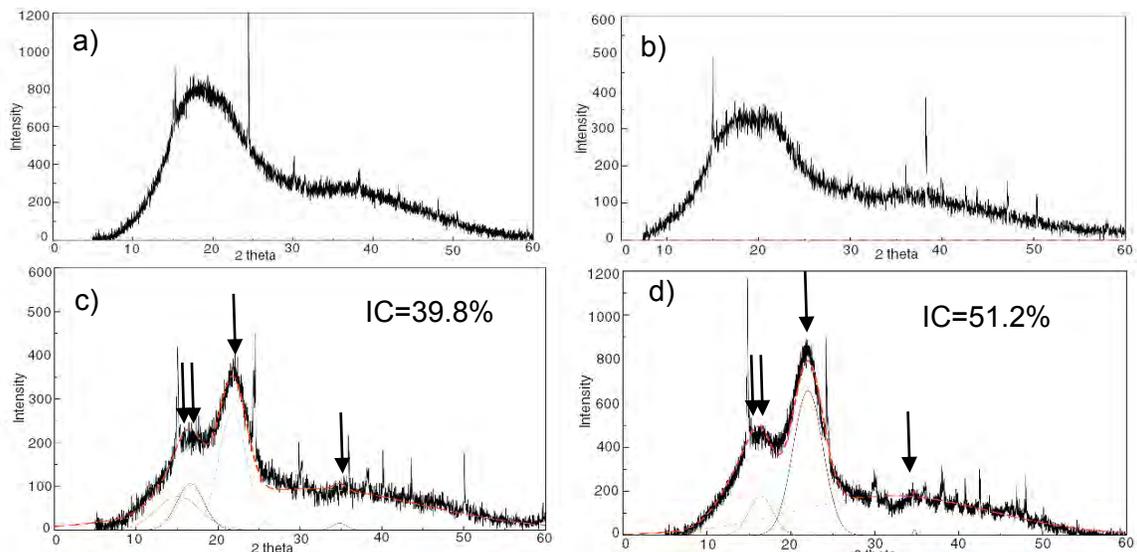


Figura 2.4 Difractogramas de DRX; a) PAT, b) BAT proveniente de un proceso mecánico de la PAT utilizando un extractor de jugos doméstico, c) BAT proveniente de un proceso mecánico de la PAT con una desgarradora e impregnación con agua caliente, d) BAT proveniente de un proceso de cocción de la PAT.

El tratamiento mecánico con extractor de jugos doméstico fue el menos efectivo para remover la fracción soluble de la PAT (5% de remoción; Figura 2.3). Dificultado la determinación del IC, ya que el difractograma de este bagazo (Figura 2.4b) presentó un comportamiento similar al difractograma de la PAT (Figura 2.4a). Por otro lado, el desgarramiento de la PAT con impregnación con agua caliente fue eficiente para remover la fracción soluble (62.6% de remoción), con el consecuente enriquecimiento del contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina. Permitiendo calcular un IC debido a la celulosa de 39.8% (Figura 2.4c).

El proceso de cocción con vapor de la PAT permitió una remoción mayor de la fracción soluble (72% de remoción) en comparación con los procesos mecánicos (Figura 2.3). Por lo que el BAT resultante presentó un IC debido a la celulosa de 51.2% (Figura 2.4d). Este valor es bajo en comparación con lo reportado por Perez-Pimienta *et al.* (2015) y Kumar *et al.* (2014) reportando un IC de 61% y 70% respectivamente; sin embargo, estas diferencias podrían deberse al método y programa utilizado para determinar el IC.

En los difractogramas de las fibras de PAT y BAT se observaron picos cristalinos que no corresponden a la celulosa cristalina, principalmente a  $2\theta$  de  $15^\circ$ ,  $24.5^\circ$ ,  $30.5^\circ$  y  $38^\circ$ ; en base a la literatura y a la información proporcionada por SEM-EDS se determinó que corresponden a oxalato de calcio monohidratado, también conocido como whewellita. Estos cristales se encuentran de manera natural en el *A. tequilana* (Perez *et al.* 2013). No obstante, el cálculo del IC que se realizó en este trabajo solo se basó en los picos cristalinos debidos a la celulosa.

El análisis morfológico de las fibras de PAT y BAT por SEM-EDS permitió observar cristales de oxalato de calcio en forma de estiloides (formas prismáticas) y rafidios (cristales en forma de aguja, generalmente agrupados). Ambas formas de cristales no se vieron afectadas por los tratamientos térmicos.

Se observó que la fibra de la PAT sin ningún tratamiento (Figura 2.5) se encuentra envuelta por células del parénquima, con la presencia de punteaduras o poros que permiten la comunicación entre las células. Además de cristales de oxalato de calcio en forma de estiloides incrustados sobre la superficie de la fibra.

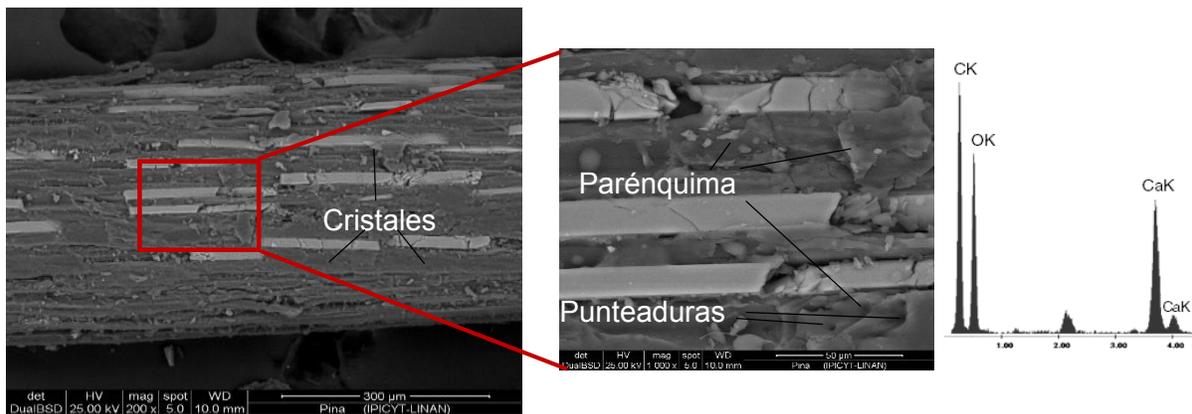


Figura 2.3 SEM-EDS para la fibra de PAT sin ningún procesamiento.

Por otro parte, el proceso mecánico con un extractor de jugos de la PAT fue más disruptivo debido a la fuerza que se aplica (Figura 2.6). Alterando la integridad de las fibras y la estructura de cristales estiloides, además de desagrupar a los cristales en forma de rafidios. También se provocó el rompimiento de los haces vasculares liberando fracciones de pared celular lignificada. Donde la estructura del parénquima no se removió pero si se alteró seriamente, perdiéndose la integridad

morfológica del tejido. Esto se puede observar en la Figura 2.6 en donde las células parenquimáticas se encuentran en los espacios que se formaron entre los haces vasculares. Sin embargo, la remoción de solubles fue muy pobre (Figura 2.3).

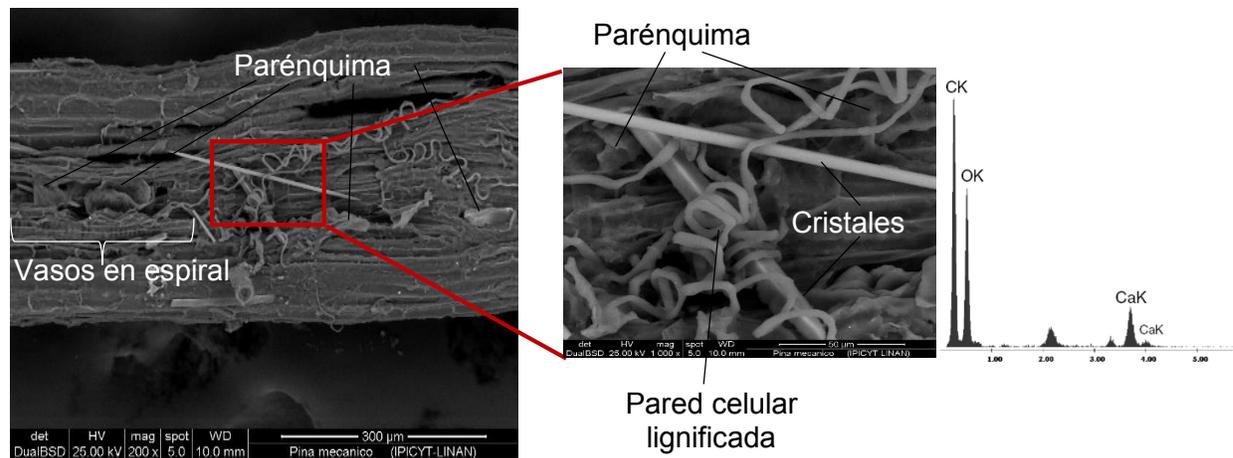


Figura 2.4 SEM-EDS de la fibra de BAT proveniente de un procesamiento mecánico de la PAT con extractor de jugos doméstico.

El bagazo resultante del proceso mecánico donde se desgarró la PAT impregnándola con agua caliente presenta parénquima que no se vio afectado (Figura 2.7). Esto quizá indique que aunque la extracción de la fracción soluble fue alta (Figura 2.3), el parénquima conservó parcialmente su integridad.

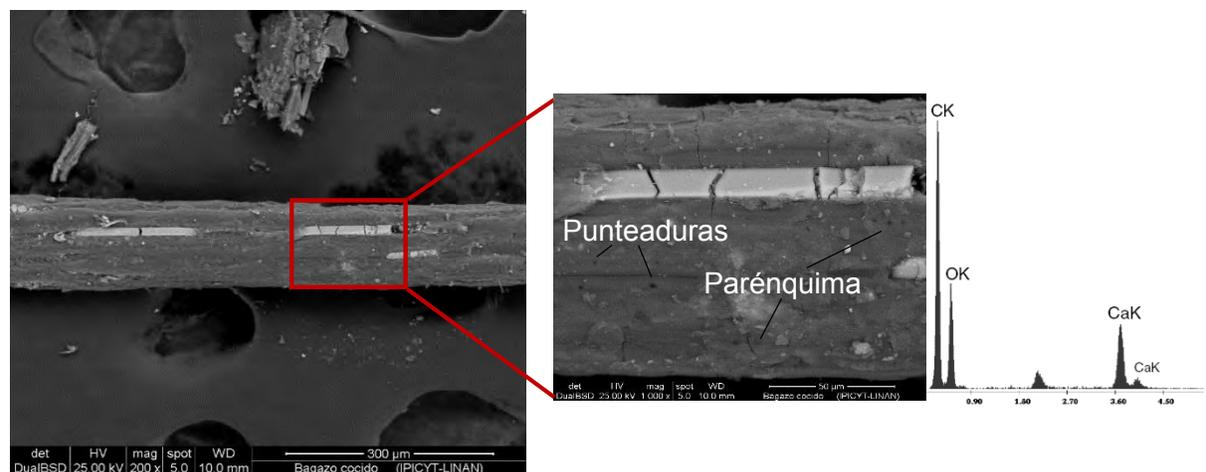


Figura 2.5 SEM-EDS de la fibra de BAT proveniente de un proceso mecánico de la PAT con una desgarradora e impregnación con agua caliente.

El proceso de cocción con vapor removió el parénquima presente sobre la PAT (Figura 2.8), permitiendo observar células fibrosas del esclerénquima en el BAT resultante. Donde se distinguen las punteaduras y la lamina media que une a las paredes celulares de las fibras. Esto probablemente debido a que el proceso de cocción provoco una hinchazón de las células fibrosas.

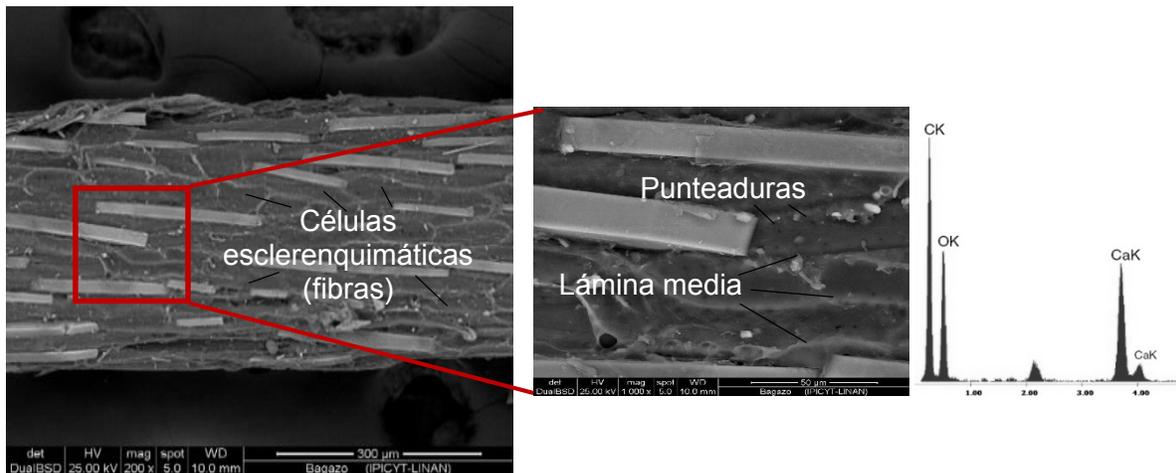


Figura 2.6 SEM-EDS de la fibra de BAT proveniente de un proceso de cocción con vapor de la PAT.

Las remociones altas de la fracción soluble presentada en la Figura 2.3, estuvieron asociadas a la remoción del parénquima durante el proceso de cocción con vapor (Figura 2.8). Ya que el parénquima es un tejido constituido por células con pared primaria (hemicelulosa, celulosa y lignina), rica en sustancias solubles como los son los fructanos (Esau, 1985). Por lo que se esperaría que la remoción de la fracción soluble proviene principalmente del parénquima.

Al parecer los componentes de la lignocelulosa no se vieron afectados en cuanto a composición, ya que en en el proceso de cocción con vapor y en el proceso mecanico con una desgarradora e impregnacion de agua caliente se observó un enriquecimiento de la hemicelulosa, celulosa y lignina en el BAT resultante (Figura 2.3).

### 2.3.3 Evaluación de los tratamientos de hidrólisis enzimática y ácida de BAT

La hidrólisis enzimática de BAT resultante del proceso de cocción con vapor, permitió una remoción mínima en el contenido de hemicelulosa y celulosa (Figura 2.9), esta remoción se vio reflejada en un incremento mínimo del IC de 51.2% (Figura 2.4d) a 52.7% (Figura 2.10a). Estos datos confirman lo mencionado en el trabajo de Abreu-Sherrer, (2013), en cuanto a que es necesario optimizar las condiciones de la hidrólisis enzimática de BAT con el objetivo de obtener una mayor hidrólisis de celulosa y hemicelulosa. La cual se reporta en el Capítulo 3 de esta tesis.

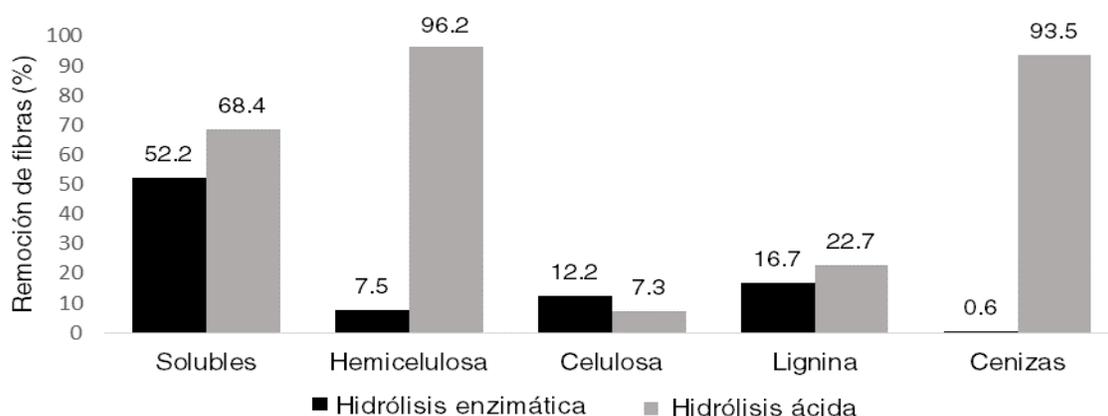


Figura 2.9 Remoción de fibras durante los tratamientos de hidrólisis en el BAT cocido proveniente del proceso de cocción con vapor de la PAT.

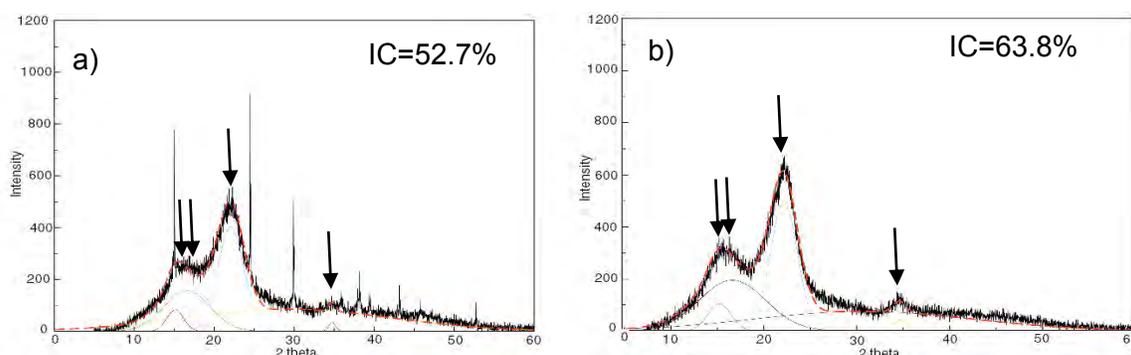


Figura 2.10 Determinación del IC en las fibras hidrolizadas; a) BAT hidrolizado enzimático; b) BAT hidrolizado ácido.

Las fibras de BAT sometidas a una hidrólisis enzimática (Figura 2.11), mostraron una remoción de células fibrosas (esclerénquima), permitiendo la visualización de células que forman parte de la estructura de los haces vasculares del xilema. Los

crisales de oxalato de calcio no son afectados permaneciendo incrustados en la superficie de las fibras. Esto podría representar una limitante para la hidrólisis enzimática.



Figura 2.11 SEM-EDS de la fibra de BAT hidrolizado enzimático.

Por otra parte, al aplicar una hidrólisis ácida, se observó una remoción importante de la hemicelulosa (96.2%; Figura 2.9), por lo que el IC aumentó un 12.6% (Figura 2.10b). Donde los oxalatos de calcio son solubilizados por el HCl. Esto se infiere de su ausencia en la micrografía (Figura 2.12) y en la ausencia de señal del oxalato de calcio en el difractograma del BAT hidrolizado con ácido (Figura 2.10b). Más aún, se observó que el contenido de cenizas disminuyó considerablemente (Figura 2.9) lo que es consistente con la remoción de los cristales de oxalato de calcio.

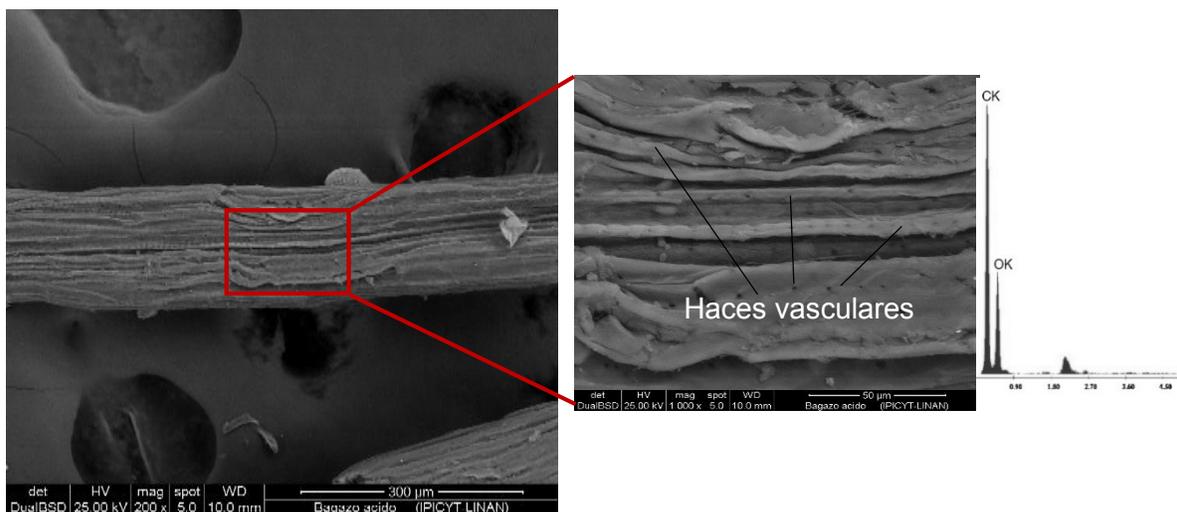


Figura 2.12 SEM-EDS de la fibra de BAT hidrolizado ácido.

La hidrólisis ácida al ser un tratamiento severo a altas temperaturas, provoca que la fibra se hinche, permitiendo la protonación del enlace glucosídico (Timell, 1964) facilitando la hidrólisis de la hemicelulosa. La Figura 2.12 muestra la fibra del BAT después de la hidrólisis ácida. En ella se observa la ausencia de la lámina media de la pared celular. Además, la integridad de los tejidos del esclerénquima y vascular presentes en el BAT se vieron afectados debido a que la remoción de la hemicelulosa modificó las células de dichos tejidos. Observando en la Figura 2.12 restos de los tejidos enriquecidos en celulosa y lignina. Por lo que las fibras del BAT resultante del tratamiento de hidrólisis ácida presentaron un alto contenido de celulosa (Tabla 2.1) la cual podría ser hidrolizada con mayor facilidad mediante un tratamiento de hidrólisis enzimática.

Tabla 2.1 Contenido de fibras (%) en el BAT antes y después del tratamiento de hidrólisis ácida.

<b>Fracción</b>	<b>BAT*</b>	<b>BAT hidrolizado ácido</b>
Soluble	24.6±0.9	9.9±0.7
Hemicelulosa	20.4±0.3	2±0.8
Celulosa	42.5±1.1	64.9±7
Lignina	12.6±0.4	22.7±6.8

\*BAT cocido lavado proveniente del proceso de cocción con vapor.

## 2.4 Conclusiones

La complementariedad en el uso de técnicas de análisis de contenido de fibras, DRX y SEM-EDS demostró ser útil para la caracterización de las fibras de la PAT y de BAT sometidas a diferentes tratamientos empleados para extraer azúcares fermentables.

Conocer los cambios en la estructura de las fibras empleando SEM-EDS, permitió observar los cambios morfológicos que ocurren después de la aplicación de tratamientos para extraer azúcares fermentables.

De los tres procesos aplicados a la PAT, el proceso tradicional de cocción con vapor resultó ser el más eficiente para remover la fracción soluble, extrayendo el

parénquima durante el procesamiento de la PAT. Donde el BAT resultante está constituido principalmente por células fibrosas del esclerénquima.

El BAT que fue sometido a una hidrólisis enzimática, presentó una mínima remoción de la hemicelulosa y celulosa amorfa, a pesar de que en el BAT se había removido el parénquima previamente. Por lo tanto, es necesario optimizar las condiciones en las que se realiza el tratamiento de hidrólisis con el fin de tener una mayor remoción del contenido de hemicelulosa y celulosa presente en las fibras de BAT.

La hidrólisis ácida de BAT resultó ser más eficiente para remover la hemicelulosa, lo que provocó una alteración severa del esclerénquima, dejando a dicho tejido enriquecido en celulosa y lignina.

La estructura de los cristales de oxalato de calcio presente en la PAT no se vio afectada por los procesos que se aplicaron para extraer azúcares fermentables de la PAT. Por lo que los bagazos resultantes presentaron cristales de oxalato de calcio incrustados sobre la superficie de las fibras. Sin embargo, el proceso mecánico con extractor de jugos doméstico alteró la estructura y agrupamiento de dichos cristales.

La estructura de los cristales de oxalato de calcio presente en el BAT sometido a un tratamiento de hidrólisis enzimática no fue afectada. Pero un tratamiento de hidrólisis ácida fue eficiente para eliminar estos cristales de las fibras de BAT.

La celulosa cristalina no fue afectada por los tratamientos de sacarificación aplicados en el BAT que se evaluaron en este estudio. Ya que la remoción de las fracciones amorfas (celulosa y hemicelulosa principalmente y en menor proporción lignina) permitió obtener un IC más alto en las fibras tratadas. Lo cual se interpretó como un enriquecimiento de la celulosa cristalina al ser removidas las fracciones amorfas. Este enriquecimiento se observó especialmente con el tratamiento de hidrólisis ácida.

## CAPÍTULO 3

### Optimización de la hidrólisis enzimática de bagazo de *A. tequilana* para la producción de hidrógeno

#### Resumen

En este estudio se optimizaron las condiciones de la hidrólisis enzimática de BAT. Como factores de estudio, se consideraron la concentración de enzima, el pH, la temperatura y la concentración de sustrato (BAT), generando un modelo factorial  $2^4$  de composición central con puntos axiales. Se evaluaron tres variables de respuesta: la velocidad de producción de azúcares reductores (mg AR/mL-h), la concentración de azúcares reductores (mg AR/mL) y el rendimiento obtenido (mg AR/g sustrato). Los ANOVA y los modelos de superficie de respuesta obtenidos indicaron que el rendimiento fue el más adecuado para definir las condiciones óptimas locales para realizar la hidrólisis enzimática, utilizando 3.5% de BAT suspendido en un buffer de citratos 50mM con pH de 5.5, con una concentración de 0.7 mg proteína/mL de Celluclast 1.5L y una incubación a 40°C durante 12 horas. El hidrolizado enzimático realizado con las condiciones óptimas locales mostró un mayor rendimiento de producción de azúcares reductores (AR) y una mayor remoción de hemicelulosa (26%), en comparación con el hidrolizado enzimático obtenido bajo las condiciones reportadas por Abreu-Sherrer, (2013). Se realizaron ensayos en lote de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados obtenidos bajo ambas condiciones. Los rendimientos molares (1.21 y 1.30 molH<sub>2</sub>/mol AT consumido) y velocidades de producción de hidrógeno (79.50 y 81.73 mLH<sub>2</sub>/L-h) que se obtuvieron fueron similares. En comparación con el control de glucosa que se utilizó en este estudio, los hidrolizados presentaron mayores velocidades de producción de hidrógeno aunque los rendimientos molares obtenidos fueron menores.

#### 3.1 Introducción

El BAT es un residuo lignocelulósico que por su contenido de celulosa y hemicelulosa es un sustrato atractivo para la producción de hidrógeno por fermentación oscura (Abreu-Sherrer, 2013). Sin embargo su conversión directa no es posible, por lo que se necesitan tratamientos de sacarificación para extraer azúcares fermentables (Duff y Murray, 1996).

La hidrólisis enzimática representa un tratamiento adecuado para sacarificar la fracción de celulosa en el BAT previamente pre-tratado con hidrólisis ácida en el cual la lignina y hemicelulosa son removidas (Saucedo-Luna *et al.* 2010). No obstante Abreu-Sherrer en el 2013, demostró que es posible realizar la hidrólisis enzimática directa de BAT y emplear dichos hidrolizados para la producción de hidrógeno. Probablemente esto se debió a que las fibras de BAT provienen de un proceso de cocción de la PAT, el cual de alguna forma desestabilizó la estructura nativa de la lignocelulosa. No obstante, el rendimiento de azúcares fermentables obtenido fue bajo, presentando una remoción de 7.5% de hemicelulosa y 12.3% de celulosa (datos presentados en el capítulo 2 de esta tesis).

El tratamiento de hidrólisis enzimática es una reacción de multietapas heterogéneas en la que la celulosa insoluble inicialmente se rompe en la interfase sólido-líquido de la reacción por la acción sinérgica de endoglucanasas y exoglucanasas/celobiohidrolasas. La reacción inicial es acompañada de una hidrólisis adicional de compuestos intermediarios solubles, es decir de oligosacáridos cortos y celobiosa para producir glucosa por la acción de  $\beta$ -glucosidasas (Yang *et al.* 2011). Aunque la hidrólisis enzimática ofrece el potencial para obtener mayores rendimientos, una mayor selectividad, menores costos de energía y condiciones de funcionamiento más suaves que los procesos químicos. Los altos costos de la producción de enzimas, junto con las altas dosis enzimáticas necesarias para hidrolizar la biomasa son considerados las principales limitantes hacia el camino de la producción de biocombustibles (Várnai *et al.* 2011; Yang *et al.* 2011).

El Celluclast 1.5L es una mezcla comercial de celulasas derivada de *Trichoderma reesei* empleada para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica para la producción de hidrógeno. Donde las enzimas además de presentar actividad de celulasa, en menor proporción presentan actividad de  $\beta$ -glucosidasa y xilanasa, liberando hexosas y pentosas en la fracción soluble (hidrolizado) (Berlin *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2008). No obstante, Abreu-Sherrer, (2013) y Arreola-Vargas *et al.* (2015b) encontraron que

además de las hexosas y pentosas presentes en los hidrolizados enzimáticos, el Celluclast 1.5L contribuye a la producción de hidrógeno.

El Celluclast 1.5L además de las enzimas, contiene la presencia de otros constituyentes solubles como el sorbitol que es el estabilizador de las enzimas, glicerol y azúcares como arabinosa y glucosa (Nieves *et al.* 1998). Los cuales son fácilmente fermentables al utilizar consorcios microbianos (Arreola-Vargas *et al.* 2015b).

El objetivo de este estudio fue optimizar las condiciones de la hidrólisis enzimática de BAT empleando la mezcla comercial de enzimas Celluclast 1.5 para obtener un mejor rendimiento de producción de AR y con esto incrementar la producción de hidrógeno mediante ensayos en lote. También se evaluó la contribución del Celluclast 1.5L a la producción de hidrógeno bajo las condiciones óptimas locales encontradas.

### **3.2.1 Materiales**

El BAT fue recolectado en la tequilera “Casa Herradura” localizada en Amatitán, Jalisco, proveniente del proceso tradicional de cocción con vapor de la PAT. El BAT se secó a temperatura ambiente para su conservación y posterior uso. Se empleó Celluclast 1.5L de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), mientras que el reactivo de Bradford y BSA (albúmina sérica bovina) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Las fibras del BAT seco, se cortó en trozos de 2 cm, los trozos se lavaron con agua destilada para eliminar compuestos solubles remanentes del proceso de cocción de la PAT, y se secaron a 60 °C por 12 horas. Posteriormente las fibras fueron sometidas a los ensayos de hidrólisis enzimática.

### **3.2.2 Caracterización de la mezcla comercial de enzimas (Celluclast 1.5L)**

Se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976) para determinar la concentración de proteína en el Celluclast 1.5L. Mientras que la actividad enzimática se determinó en términos de unidades de papel filtro (FPU por sus siglas en ingles) de acuerdo a Adney y Baker, (1996).

### 3.2.3 Diseño experimental para la optimización de la hidrólisis enzimática

Para realizar la optimización de la hidrólisis enzimática se utilizó un diseño experimental  $2^k$  de composición central con puntos axiales a través del programa estadístico Statgraphics centurión XVI.II de acuerdo a Gómez-Tovar, (2008). Esto con el fin de estudiar simultáneamente los factores que pueden afectar la variable de respuesta. Empleando un modelo de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática de BAT.

Los factores de estudio que se evaluaron fueron el pH, temperatura, concentración de enzima y concentración de sustrato, evaluando tres variables de respuesta: velocidad de producción de AR (mg AR/mL-h), concentración de AR (mg AR/mL) y rendimiento (mg AR/g sustrato). Lo anterior generó un modelo factorial  $2^4$  de composición central con 6 puntos axiales y 4 puntos centrales con un total de 28 ensayos.

Los intervalos de prueba que se evaluaros (Tabla 3.1) son los reportados por Gómez-Tovar, (2008) durante la optimización de la hidrólisis enzimática de paja de avena empleando Celluclast 1.5L.

Tabla 3.1 Factores experimentales e intervalos de prueba evaluados en la optimización.

<b>Factores de estudio</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Valor central</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Puntos axiales</b>	<b>Unidades</b>
pH	4.5	5.0	5.5	4 y 6	
Temperatura	45	50	55	40 y 60	°C
Concentración de enzima	0.1	0.3	0.5	0.7	mg proteína/mL de medio
Concentración de sustrato (BAT)	20	40	60	80	g/L

Los ensayos se realizaron en un volumen de 50 mL. Para determinar las variables de respuesta, se cuantificó la concentración de AR presentes en los ensayos en

diferentes intervalos de tiempo por 24 horas. Los AR se determinaron por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller, (1959).

### **3.2.4 Tratamientos de hidrólisis aplicados al BAT**

La hidrólisis enzimática para realizar las cinéticas de producción de hidrógeno se realizaron con BAT lavado bajo las condiciones óptimas locales mostradas por el diseño experimental explicado anteriormente y bajo las condiciones reportadas en el trabajo de Abreu-Sherrer, (2013). Ambas hidrólisis enzimáticas se realizaron en un volumen de 1L.

Los hidrolizados se caracterizaron determinando la concentración de AR por el método anteriormente mencionado, la demanda química de oxígeno (DQO) de acuerdo al Standard Methods (APHA, 1998) y azúcares totales (AT) por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). En el BAT residual obtenido después de la hidrólisis se determinó el contenido de fibras de acuerdo a lo establecido en la sección 2.2.3.1 del capítulo 2 de esta tesis.

### **3.2.5 Cinéticas de producción de hidrógeno**

#### **3.2.5.1 Ensayos en lote**

Se utilizó como inóculo lodo granular anaerobio (LGA) proveniente de una planta de tratamientos de vinazas de la tequilera “Casa Herradura”. El LGA fue tratado térmicamente a 105°C por 24 horas, pulverizado y guardado en un frasco a temperatura ambiente hasta su uso.

Los ensayos en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 mL con un volumen de trabajo de 30 mL, dejando un espacio de cabeza de 30 mL para la acumulación del gas. Cada vial contenía 4.5 g SSV/L de inóculo, medio mineral y sustrato, ajustando a pH inicial de 7.5. Las botellas se purgaron con una mezcla de gas N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%) por 45 segundos, para garantizar anaerobiosis. Posteriormente, las botellas se incubaron a 37 °C con una agitación de 120 rpm. Se dio seguimiento a la cinética hasta que la producción de biogás se igualó o aproximó a cero. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Composición del medio mineral (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 (Arreola-Vargas *et al.* 2015b).

### 3.2.5.2 Cuantificación de gas

La producción gaseosa se midió a través de un dispositivo de desplazamiento, mientras que los componentes del gas se cuantificaron en un cromatógrafo de gases con un detector de conductividad térmica (modelo 6890N, Agilent Technologies), tal como se describe en Davila-Vazquez *et al.* (2008) y Carrillo *et al.* (2012).

### 3.2.5.3 Análisis de la cinética

La producción máxima acumulada de hidrógeno durante el ensayo se calculó mediante la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 3.1), ajustando la ecuación a través del software Kaleidagraph 4.0.

$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{max} e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3.1)$$

Dónde: H es el total de hidrógeno producido (mL) en el tiempo de ensayo,  $H_{max}$  es la producción máxima acumulada de hidrógeno (mL),  $R_{max}$  es la velocidad máxima de producción de hidrógeno (mL/h),  $e=2.718281828$ ,  $\lambda$  es el tiempo de fase lag (h) y t el tiempo de incubación (h).

El rendimiento molar de hidrógeno (RMH) se calculó a partir de  $H_{max}$  y el sustrato consumido (AT consumidos); mientras que las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno (VVPH) se obtuvieron a partir de  $R_{max}$  y del volumen del trabajo (Zwietering *et al.* 1990; Fang *et al.* 2006).

Se determinó la concentración de AR, AT y DQO en los efluentes de los ensayos después del proceso de fermentación oscura. Mientras que la formación de AGVs se determinó por electroforesis capilar (Agilent 1600A), siguiendo el procedimiento establecido por Davila-Vazquez *et al.* (2008).

### 3.2.6 Ensayos en lote para la producción de hidrógeno a partir hidrolizados

Los ensayos en lote de producción de hidrógeno se realizaron con hidrolizados obtenidos por las condiciones óptimas locales y por las condiciones de Abreu-

Sherrer, (2013) a una concentración de AT de 6500 mg/L. Como control se utilizó glucosa como sustrato modelo a una concentración de 6500 mg/L, Celluclast 1.5L a una concentración equivalente a la que se esperaría estuviera presente en los hidrolizados y LGA sin la adición de sustrato (para evaluar la actividad endógena).

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Optimización de hidrólisis enzimática

La concentración de proteína que se determinó en el Celluclast 1.5L fue de 39.23 mg/mL similar al valor de 40.7 mg/mL reportado por Gómez-Tovar, (2008). Mientras que la actividad enzimática que se obtuvo fue de 66.02 FPU/mL; dicha actividad enzimática está por debajo a lo reportado por Abreu-Sherrer, (2013) (82.2 FPU/mL). Lo que indica que el Celluclast 1.5L gradualmente va perdiendo su actividad enzimática. Cabe aclarar que en este trabajo se utilizó el mismo lote de Celluclast 1.5L empleado en los trabajos de Gómez-Tovar, (2008) y Abreu-Sherrer, (2013).

Los AR obtenidos en cada ensayo se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (Figura 3.1), lo que permitió determinar por un lado la velocidad de producción de AR (Rmax) y por otra parte la concentración de AR (Hmax) con la cual se estimó el rendimiento (Anexo 1). Los valores de  $R^2$  obtenidos para estos ajustes se encontraron en el intervalo de 0.94-0.99. Lo cual muestra la validez del uso del modelo de Gompertz.

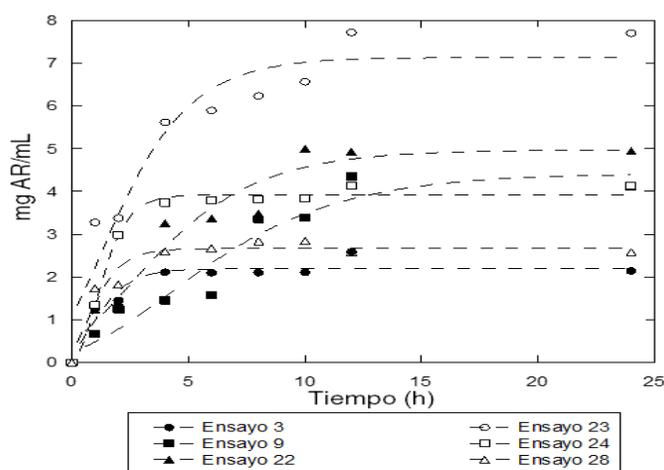


Figura 3.1 Ajuste de datos de la producción de AR obtenidos de algunos ensayos realizados durante la optimización de la hidrólisis enzimática.

Los ANOVA realizados para los datos obtenidos de las tres variables de respuesta evaluadas para la optimización de la hidrólisis enzimática de BAT indicaron que la variable de respuesta que mostró baja variabilidad fue la velocidad de producción de AR, ya que los cuadrados medios tabulados en el ANOVA son cercanos a cero (Anexo 2a). Esto se debió a la poca variación en los resultados de los ensayos. Los factores estudiados más significativos fueron el pH ( $p < 0.05$ ) y la concentración de enzima (aunque en el límite de la no significación  $p = 0.058$ ). El modelo de superficie de respuesta que se generó explicó el 66.9% de la variabilidad de los datos (Figura 3.2).

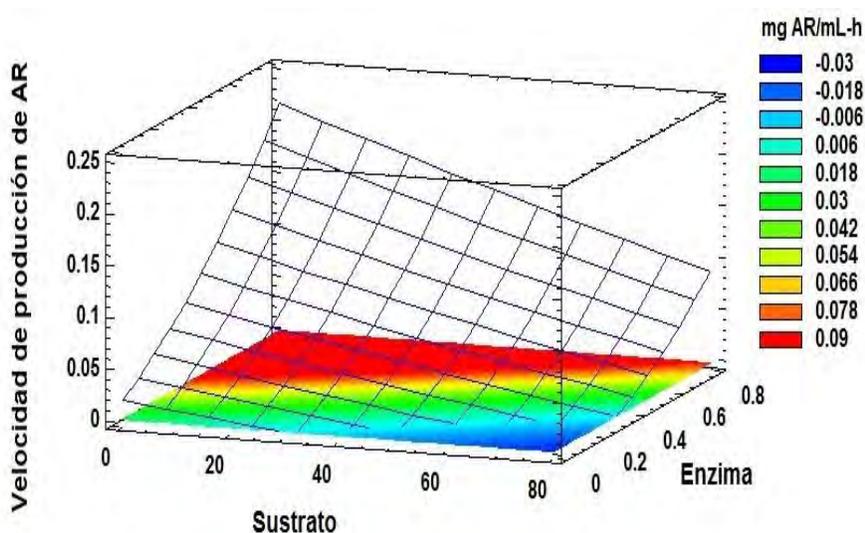


Figura 3.2 Modelo de superficie de respuesta de la velocidad de producción de AR (mg AR/mL-h) al variar el sustrato y concentración de enzima (mg proteína/mL), a una temperatura de 40°C y a un pH de 6.

En cambio en el análisis de los datos de la concentración de AR los factores estudiados más significativos ( $p < 0.05$ ) fueron la concentración de sustrato, concentración de sustrato y temperatura (Anexo 2b). El modelo de superficie de respuesta que se generó explicó el 90.3% de la variabilidad de los datos (Figura 3.3).

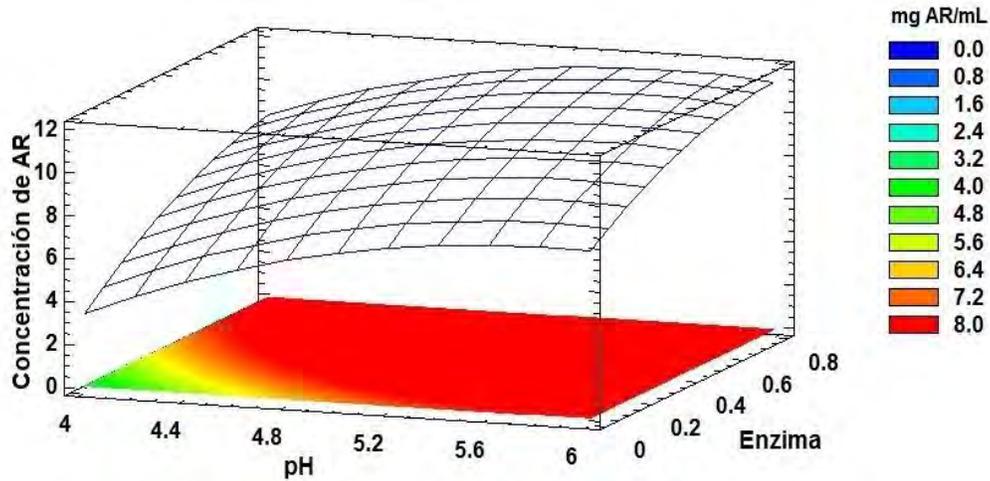


Figura 3.3 Modelo de superficie de respuesta de la concentración de AR (mg AR/mL) al variar el pH y concentración de enzima (mg proteína/mL), a una temperatura de 40°C y 80g/L de bagazo como sustrato.

Por otro lado el análisis de datos del rendimiento mostró que la concentración de enzima fue el factor experimental más significativo para maximizar el rendimiento durante la hidrólisis enzimática ( $p < 0.05$ ) (Anexo 2c), explicando el 51.5% de la variabilidad de los datos en el modelo de superficie de respuesta generado (Figura 3.4).

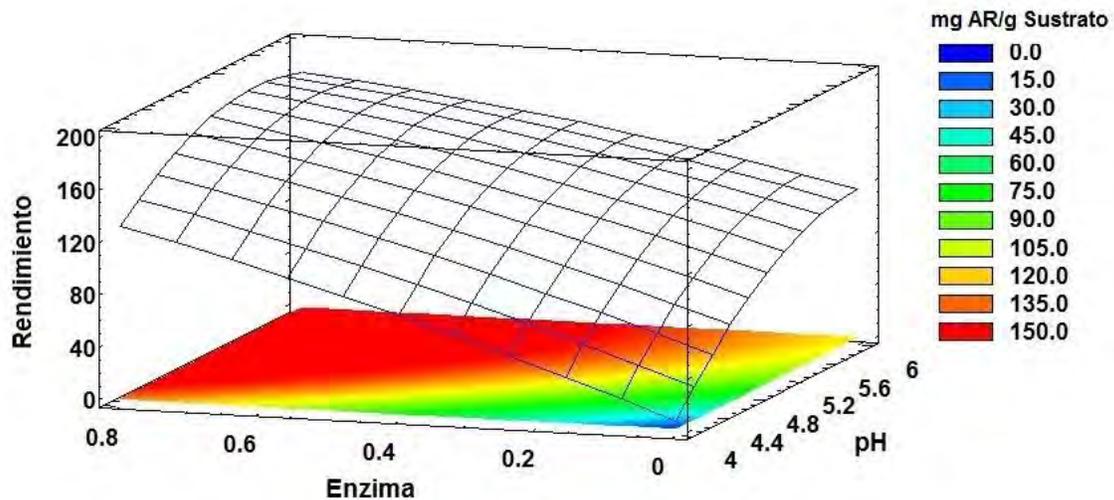


Figura 3.4 Modelo de superficie de respuesta del rendimiento (mg AR/g Sustrato), al variar pH y concentración de enzima (mg proteína/mL), evaluados a una temperatura de 40°C y 35g/L de bagazo como sustrato.

Las condiciones que predicen los máximos valores para las tres variables de respuesta estudiadas para la hidrólisis enzimática se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Condiciones que predicen los máximos valores para la hidrólisis enzimática establecido por el programa estadístico Statgraphics centurión XVI.II.

<b>Variable de respuesta</b>	<b>Sustrato (g/L)</b>	<b>Enzima (mg proteína/mL)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Predicción</b>
Velocidad de producción de AR	$3 \times 10^{-6}$	0.7	6	40	0.18 mg AR/mL-h
Concentración de AR	78	0.7	5.5	40	11.19 mg AR/mL
Rendimiento	35	0.7	5.5	40	179.13 mg AR/g sustrato

Los análisis estadísticos indican que la variable de respuesta de la concentración de AR presentó el mejor ajuste del modelo para obtener la predicción máxima (Figura 3.3 y Anexo 2b). Este modelo predice utilizar una concentración de sustrato de 78 g/L (Tabla 3.2). Sin embargo, de acuerdo a lo mencionado en el trabajo de Gómez-Tovar (2008) utilizar esta concentración de sustrato puede ocasionar problemas de agitación durante la hidrólisis, ocasionando una concentración de AR baja en comparación con lo predicho por el modelo (Tabla 3.2).

Por lo que, se eligieron las condiciones óptimas que el modelo generó para predecir el máximo rendimiento, es decir, 35 g/L de bagazo, 0.7 mg proteína/mL de enzima, pH de 5.5 y temperatura de 40°C (Tabla 3.2). Aun cuando estas condiciones estadísticamente no fueron las más favorables. Esto debido a que los resultados de la variable de respuesta de la velocidad de producción de AR mostraron baja variabilidad (ANOVA 2a). No obstante, los valores establecidos para la concentración de enzima y para la temperatura se encuentran dentro de los puntos axiales. Por lo que probablemente no sean los óptimos reales para la hidrólisis enzimática. Por ello, las condiciones óptimas que se establecieron en este estudio fueron locales.

Con respecto al tiempo de reacción, se establecieron 12 horas, ya que después de ese tiempo en los ensayos no se observaron aumentos importantes en la concentración de AR.

El hidrolizado obtenidos bajo las condiciones óptimas locales determinadas en este trabajo, se compararon con el hidrolizado bajo las condiciones establecidas por Abreu-Sherrer, (2013). Los resultados mostraron que la producción de AR y el rendimiento (mg AR/g sustrato) fue mayor para el hidrolizado bajo las condiciones óptimas locales (20% mayor en la concentración de AR producidos presentes en el hidrolizado y un rendimiento de producción de azúcares 30% más alto). Presentando una mayor remoción de la fracción de hemicelulosa en el BAT (Figura 3.5), con una mínima presencia de oligosacáridos debido a que la concentración de AT y AR son similares (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Caracterización de hidrolizados enzimáticos

Hidrolizado	DQO (mg/L)	AT (mg/L)	AR (mg/L)	Rendimiento (mg AR/g BAT)
HE bajo las condiciones óptimas locales	29027 ± 2234	7209 ± 211	6932 ± 111	199 ± 0.11
He bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013)	32701 ± 2513	7359 ± 300	5502 ± 40	139.9 ± 1.2

HE: hidrolizado enzimático

La remoción de hemicelulosa y celulosa con Celluclast 1.5L (Figura 3.5) se debió a que dicha preparación enzimática presenta diferentes actividades enzimáticas (celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y xilanasas) (Berlin *et al.* 2007). El incremento en la remoción de celulosa bajo las condiciones óptimas locales fue mínimo. Por otra parte, la mayor remoción de hemicelulosa bajo las condiciones óptimas locales definidas en este estudio, comparada con las condiciones empleadas por Abreu-Sherrer, (2013) es intrigante, ya que indica que las concentraciones bajas de enzima empleadas en las condiciones óptimas locales fueron más efectivas para hidrolizar

la hemicelulosa. Probablemente esto se debe a que la hemicelulosa está más expuesta en la fibra que la fracción de celulosa. No obstante, estas observaciones requieren de posteriores estudios.

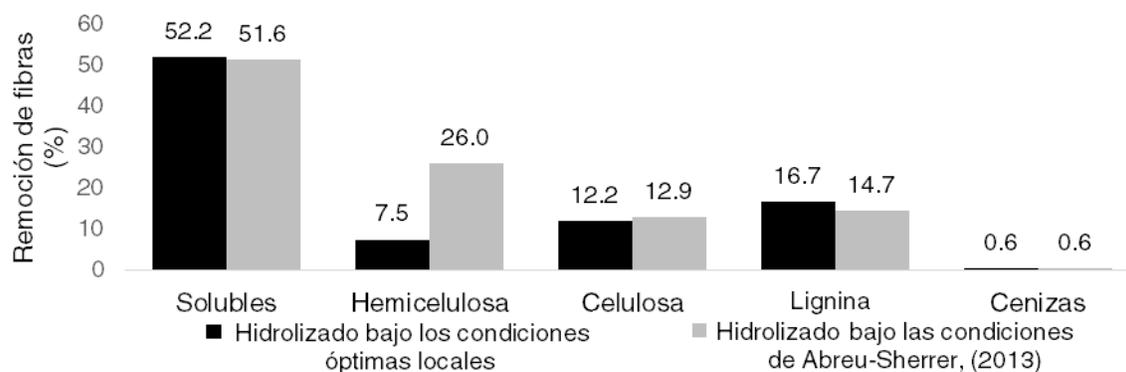


Figura 3.5 Remoción de fibras durante los tratamientos de hidrólisis enzimática en el BAT cocido.

Saucedo-Luna *et al.* (2010) realizaron la hidrólisis enzimática utilizando 8% de BAT después de una hidrólisis ácida con una carga enzimática de 59 FPU y 25 CBU /g de BAT de Celluclast 1.5L y Novozyme 188, logrando un rendimiento de sacarificación de 248.8 mg de azúcares fermentables/g de BAT. Así mismo, en el trabajo reportado por Caspeta *et al.* (2014) obtuvieron un rendimiento de sacarificación de azúcares fermentables de 510 mg/g BAT proveniente de un pre-tratamiento con Ethanosolv, realizando la hidrólisis enzimática en un bioreactor con 30% de sólidos con una carga enzimática de 10 FPU y 20 CBU /g de BAT de un coctel de enzimas de celulasas y  $\beta$ -glucosidasas. En comparación con lo reportado en este trabajo se obtuvo una sacarificación de 199 mg de AR/g de BAT (Tabla 3.4) realizando la hidrólisis con 3.5% de sólidos con una carga enzimática de 33.6 FPU/g BAT de Celluclast 1.5L. Lo anterior indica que los rendimientos de sacarificación que se obtuvieron bajo las condiciones óptimas locales son menores en comparación con los trabajos mencionados. Sin embargo, su escalamiento podría ser económicamente más viable ya que la hidrólisis enzimática se realiza con BAT no pre-tratado a concentraciones de sustrato relativamente más bajas a las reportadas por Saucedo-Luna *et al.* (2010) y Caspeta *et al.* (2014).

### 3.3.2 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos

Tal y como se reportó en los trabajos de Abreu-Sherrer, (2013) y Arreola-Vargas *et al.* (2015b) el Celluclast 1.5L remanente en el hidrolizado enzimático es un sustrato que aporta en gran medida a la producción de hidrógeno. Debido a que el hidrolizado enzimático realizado bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) se obtuvo con una concentración más alta de Celluclast 1.5L (1.2 mg proteína/mL), la producción de hidrógeno proveniente del Celluclast 1.5L fue del 59% de la producción total (Figura 3.6). Para el caso del hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales, en donde se empleó una menor concentración de Celluclast 1.5 L. La contribución del mismo a la producción de hidrógeno fue alrededor del 46% (Figura 3.6). Esta observación es importante en el contexto de los esfuerzos para recuperar las enzimas celulolíticas presentes en los hidrolizados enzimáticos (Xu *et al.* 2009). Con el fin de reducir los costos de producción de hidrógeno, los cuales se tendrán que comparar con el valor económico de incrementar los rendimientos y las velocidades de producción de hidrógeno.

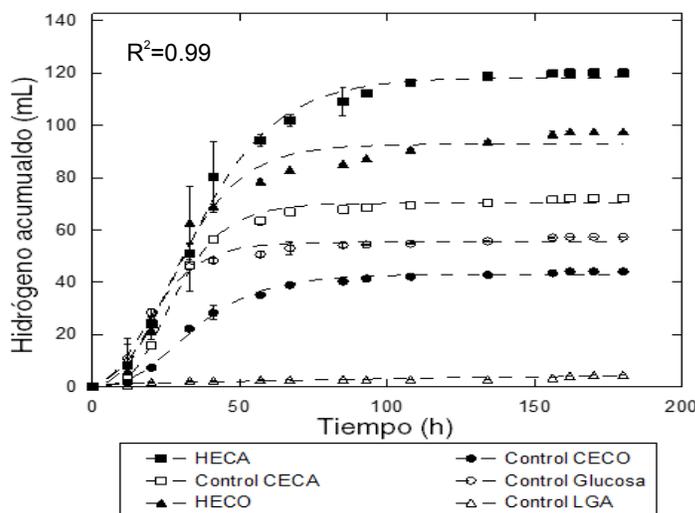


Figura 3.6 Producción acumulada de hidrógeno en lote de los hidrolizados bajo las condiciones óptimas locales (HECO) y bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) (HECA) de BAT. La concentración de AT fue de 6500 mg/L tanto en los hidrolizados enzimáticos como en el control de glucosa. La concentración del control de Celluclast 1.5L fue equivalente a la que se esperaría estuviera presente en el hidrolizado enzimático (1.2 mg proteína/mL) bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) (CECA) y en el hidrolizado enzimático (0.7 mg proteína/mL) bajo las condiciones óptimas locales.

Así mismo, se observó que el LGA sin adición de sustrato tiene una mínima contribución a la producción de hidrógeno, lo que indica que el LGA contenía una mínima cantidad de sustrato endógeno proveniente de la planta de tratamiento de vinazas de donde fue obtenido.

La optimización de las condiciones de la hidrólisis enzimática no se vio reflejada en la VVPH ya que solo se observó un incremento mínimo de la VVPH obtenido con el hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales en comparación con el obtenido bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) (Tabla 3.4). Sin embargo, las VVPH que se observaron para ambos hidrolizados, fueron mayores que la VVPH observada para el sustrato modelo (glucosa), lo cual probablemente está relacionada con la contribución del Celluclast 1.5L a la producción de hidrógeno.

En el caso de los RMH, se observó un menor valor de RMH con el hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales comparado con el observado con el hidrolizado enzimático bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013) (Tabla 3.4). Sin embargo, cuando se descontó la contribución del Celluclast 1.5L, los rendimientos corregidos ( $RMH^{CORR}$ , Tabla 3.4) de ambos hidrolizados fue muy semejante, aunque el RMH para el hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales fue ligeramente mayor. Sin embargo, los RMH para ambos hidrolizados enzimáticos fueron menores que el obtenido con el control de glucosa. Estos valores de RMH obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos de BAT fueron similares a lo reportado por Abreu-Sherrer, (2013) y por Contreras-Dávila, (2015). Así mismo, estos RMH son mayores a lo reportado para otros bagazos lignocelulósicos (0.96 y 1.08 mol H<sub>2</sub>/mol sustrato) (Cheng y Chang, 2011; Lo *et al.* 2011). Dichos bagazos lignocelulósicos fueron sometidos a un pre-tratamiento previo a la hidrólisis enzimática.

Tabla 3.4 Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos

Sustrato	pH final	Hmax (mL)	Hmax <sup>CORR</sup> (mL)	$\lambda$ (h)	VVPH (mL H <sub>2</sub> /L-h)	RMH (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)	RMH <sup>CORR</sup> (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)
Control de Glucosa	5.97±0.1	55.3±0.4	-	5.63±1.3	62.79±14	1.50±0.2	-
HE bajo las condiciones óptimas locales	6.20±0.2	118.38±15	48.20±15	10.13±1.7	79.50±2.2	3.05±0.7	1.21±0.7
He bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013)	6.50±0.1	92.83±0.2	49.88±0.2	10.14±1.9	81.73±1.7	2.63±0.1	1.30±0.1

HE: hidrolizado enzimático; Hmax<sup>CORR</sup> y RMH<sup>CORR</sup> se estimaron eliminando la aportación del Celluclast 1.5L para la producción de hidrógeno. Los resultados equivalen al promedio del triplicado que se realizó en los ensayos en lote.

Por otra parte las rutas metabólicas que se favorecieron durante los ensayos de la fermentación oscura para la producción de hidrógeno, fueron la formación de acetato y butirato (Figura 3.7), los cuales favorecen la producción de hidrógeno. Sin embargo, también se observó la formación de propionato. La producción de propionato fue ligeramente mayor y la de acetato ligeramente menor en el hidrolizado enzimático bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013). Esto explicaría el RMH ligeramente más bajo en comparación con el observado en el hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales.

Las concentraciones altas de acetato y en menor medida del butirato en ambos hidrolizados enzimáticos (Figura 3.7) pudieran explicar los bajos RMH que se obtuvieron para ambos hidrolizados en comparación al sustrato modelo (glucosa). Esto debido a lo reportado por Infantes *et al.* (2012) donde encontraron que concentraciones mayores de 3000 mg/L de acetato y 4000 mg/L de butirato afectan la producción de hidrógeno, disminuyendo el consumo de sustrato y crecimiento de

biomasa. Ya que estos ácidos no disociados en el interior de la célula se disocian debido al pH intracelular más alto. Por lo que, con el fin de mantener el gradiente de pH a través de la membrana, la célula debe gastar energía metabólica en forma de ATP para generar una fuerza motriz de protones que es esencial para el metabolismo y el crecimiento (Van Ginkel y Logan, 2005). Sin embargo, se necesitan más estudios para afirmar lo anteriormente mencionado. Ya que las concentraciones de acetato y butirato que inhiben la producción de hidrógeno usando como inóculo un consorcio microbiano tratado térmicamente, es difícil de predecir por la literatura (Van Ginkel y Logan, 2005).

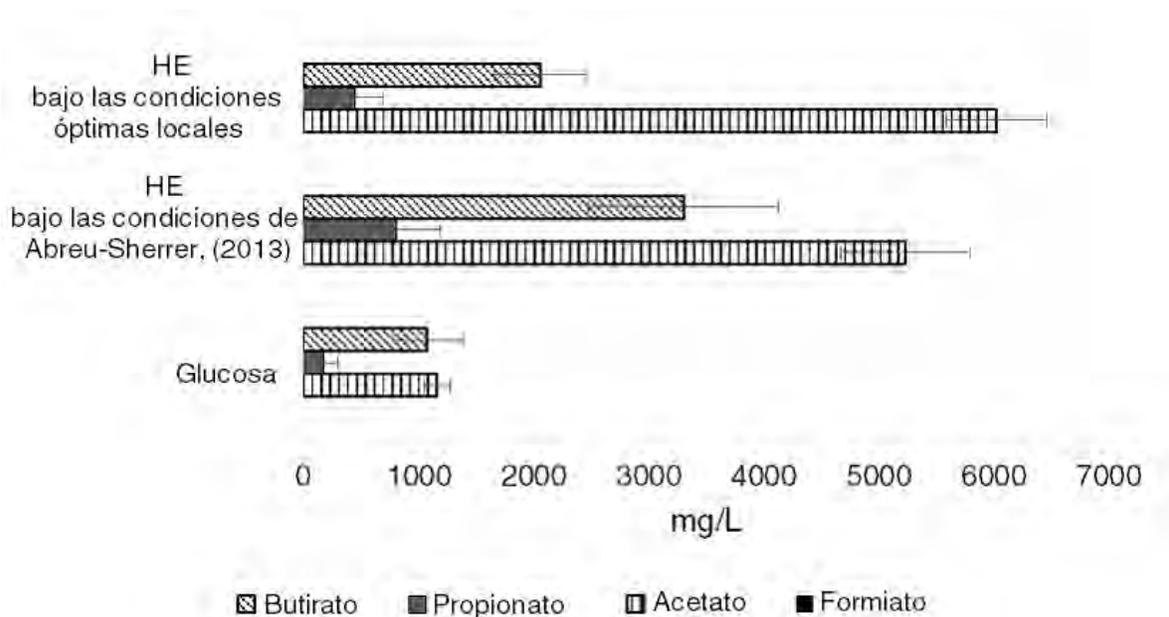


Figura 3.7 Producción de metabolitos durante los ensayos en lote para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos; HE: hidrolizado enzimático.

### 3.4 Conclusiones

Se establecieron las condiciones óptimas locales para realizar la hidrólisis enzimática, considerando el rendimiento como el parámetro de respuesta. Dichas condiciones fueron: 3.5% de BAT suspendido en un buffer de citratos 50mM pH de 5.5; concentración de Celluclast 1.5L de 0.7 mg proteína/mL. Incubación a 40°C durante 12 horas.

La optimización de la hidrólisis enzimática permitió remover un mayor porcentaje de la fracción de hemicelulosa (26%) lo que incremento el rendimiento de sacarificación

(199 g AR/g BAT). Esto se reflejó en un hidrolizado con una concentración alta de AR (6932 mg AR/L).

El hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales encontradas en este estudio se observó un incremento mínimo en los RMH y VVPH en comparación con el hidrolizado enzimático bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013). Sin embargo, los VVPH encontrados en ambos estudios fueron más altos que los del control de glucosa. Mientras que los RMH<sup>CORR</sup> fueron más bajos en comparación con el control de glucosa.

Se corroboró la contribución del Celluclast 1.5L a la producción de hidrógeno siendo de un 46% en el hidrolizado enzimático bajo las condiciones óptimas locales y del 59% en el hidrolizado enzimático bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013).

Debido a la mayor concentración del Celluclast 1.5L empleada en la hidrólisis enzimática bajo las condiciones de Abreu-Sherrer, (2013), podría ser más conveniente a escala industrial la utilización de las condiciones óptimas locales, en donde se emplea una menor concentración de enzima.

## CAPÍTULO 4

### **Estudio de la inhibición de la producción de hidrógeno por compuestos fenólicos formados durante el proceso de cocción de la piña y durante los procesos de sacarificación del bagazo de *A. tequilana***

#### **Resumen**

El efecto de remover los compuestos fenólicos, sobre la producción de hidrógeno, formados durante el proceso de cocción de la PAT, así como también durante los procesos de sacarificación del BAT para extraer azúcares fermentables empleando una resina de adsorción con una capacidad alta de retención de compuestos fenólicos se estudió en este trabajo. Para esto, se realizó un lavado con agua para extraer compuestos solubles remanentes en el BAT. La remoción de compuestos fenólicos tanto en la primera agua de lavado como en los hidrolizados enzimáticos y ácidos del BAT se realizó utilizando una resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66. Los compuestos retenidos en la resina presentes en la primera agua de lavado y en el hidrolizado enzimático se eluyeron y concentraron. Los resultados mostraron que el hidrolizado enzimático del BAT sin lavar afectó la producción de hidrógeno ya que se observaron valores bajos del RMH y de la VVPH. Sin embargo, este efecto no se debió a los compuestos fenólicos. Ya que el concentrado obtenido a partir de la primera agua de lavado, evaluado a una concentración de 1000 mg/L de fenoles totales, no mostró un efecto inhibitorio sobre la producción de hidrógeno. El hidrolizado enzimático tratado con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 no mostró una mejor producción de hidrógeno. Así mismo, el concentrado obtenido a partir del hidrolizado enzimático, evaluado a una concentración de 1000 mg/L de fenoles totales tampoco mostró un efecto inhibitorio sobre la producción de hidrógeno. Por último, el tratamiento del hidrolizado ácido con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 fue efectivo para remover compuestos fenólicos (92%), lo cual se reflejó en una mejora de la producción de hidrógeno alcanzando valores del RMH y de la VVPH más altos después del tratamiento. No obstante, los valores fueron menores que los valores de RMH y VVPH alcanzados con el sustrato modelo (glucosa).

#### **4.1 Introducción**

Durante los procesos de hidrólisis de biomasa lignocelulósica, especialmente los procesos térmicos y ácidos, además de la liberación de azúcares fermentables se originan compuestos como furfural, HMF, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos

reportados como inhibidores de la actividad microbiana para los procesos de fermentación (Mussatto *et al.* 2004).

El BAT es un residuo lignocelulósico agroindustrial proveniente de un tratamiento térmico, donde se esperaría que la fibra residual lignocelulósica quedara más accesible para ser hidrolizada por medio de un tratamiento posterior, siendo las hidrólisis enzimática y ácida los tratamientos que han sido reportados para este tipo de residuo lignocelulósico (Abreu-Sherrer, 2013; Arreola-Vargas *et al.* 2015a; Contreras-Dávila, 2015). Se ha observado que durante el proceso de hidrólisis ácida, además de la formación de HMF y furfural a partir de los azúcares liberados, la lignina se degrada parcialmente en compuestos fenólicos (Abreu-Sherrer, 2013; Mitchell *et al.* 2014).

Por otro lado, durante el proceso de hidrólisis enzimática no se ha detectado la formación de HMF y furfural. Sin embargo, Abreu-Sherrer, (2013) empleando hidrolizados enzimáticos de BAT observó rendimientos molares y velocidades de producción de hidrógeno bajos (0.76-1.31 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa; 60.03-72.55 ml H<sub>2</sub>/l-h) en comparación con sustratos modelos (Kyung-Won *et al.* 2011). Abreu-Sherrer, (2013) propuso que esto podría deberse a compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados. Ya que durante la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica se generan oligómeros de celulosa y hemicelulosa ligados a restos de lignina.

Durante el proceso de cocción de la PAT para hidrolizar a los fructanos, se generan compuestos derivados de las reacciones de Maillard (Mancilla-Margalli y López, 2002) que pueden presentar actividad inhibitoria para los procesos de fermentación (Tauer *et al.* 2004). Por lo tanto, durante la molienda de la PAT cocida para extraer las mieles fermentables es de esperarse que un remanente de estos compuestos inhibitorios quedara impregnados en el bagazo. Los cuales podrían interferir en los procesos de sacarificación de la fibra y en los procesos fermentativos posteriores.

Se ha reportado que los compuestos fenólicos no inhiben el proceso de fermentación oscura para la producción de hidrógeno por consorcios microbianos, pero si interfieren en las rutas metabólicas y en el incremento de la fase lag (Quéméneur *et al.* 2012; Siqueira *et al.* 2015). Estos estudios solo se han realizado

utilizando vanilina y siringaldehído como compuestos modelo (Quéméneur *et al.* 2012; Siqueira *et al.* 2015).

Existen diferentes métodos de detoxificación que se han aplicado para eliminar compuestos inhibitorios de hidrolizados; estos incluyen la adición de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , carbón activado y uso de resinas (intercambio iónico y de adsorción). Su efectividad depende del tipo de hidrolizado y de la concentración de los compuestos inhibitorios (Sainio *et al.* 2011).

Chang *et al.* (2011) reportaron la detoxificación de hidrolizados ácidos de paja de arroz para remover furfural mediante la adición de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y carbón activado para hacer factible la fermentación oscura para la producción de hidrógeno a través de un consorcio microbiano. Así mismo, Orozco *et al.* (2012) detoxificaron hidrolizados hidrotérmicos de almidón removiendo HMF con carbón activado permitiendo mejorar la producción de hidrógeno a partir de *E. coli*.

El uso de carbón activado resultó ser eficiente para remover derivados furanos. Sin embargo, no es selectivo y la concentración de azúcares fermentables se ve afectada (Nilvebrant *et al.* 2001). Debido a lo anterior en este estudio se propuso el uso de una resina de adsorción macroporosa no iónica, la cual presenta una alta especificidad para remover compuestos fenólicos. Esta resina es la AMBERLITE™ FPX66 utilizada para la extracción de polifenoles en extractos de plantas (Sandhu *et al.* 2013).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de compuestos solubles remanentes en el BAT formados durante el proceso de cocción de la PAT y de compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados enzimáticos y ácidos de BAT. Los compuestos solubles remanentes en el BAT se extrajeron lavando el BAT con agua destilada. Los compuestos fenólicos (medidos como fenoles totales) presentes en la primera agua de lavado resultantes del lavado del BAT y en ambos hidrolizados del BAT se retuvieron en una resina de adsorción (AMBERLITE™ FPX66). Los compuestos retenidos en la resina durante la remoción de compuestos fenólicos de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático se eluyeron de la resina con etanol y se concentraron.

Estos concentrados se emplearon para determinar el efecto inhibitorio de compuestos fenólicos para la producción de hidrógeno (Figura 4.1).

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Materiales**

El BAT fue recolectado en la tequilera “Casa Herradura” localizada en Amatitán, Jalisco, proveniente del proceso de cocción con vapor de la PAT. Las fibras de BAT fueron secadas a temperatura ambiente para su conservación. Se empleó Celluclast 1.5L de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) y se empleó la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 (Beverages and Nutrition “Rohm and Haas”, Philadelphia, USA).

### **4.2.2 Proceso de lavado del BAT**

Para la extracción de compuestos remanentes del proceso de cocción de la PAT, el BAT fue lavado 4 veces utilizando 1% de BAT suspendido en agua destilada por una hora manteniéndose en agitación, recolectando los dos primeros lavados para posteriormente ser caracterizados.

### **4.2.3 Tratamientos de hidrólisis aplicados al BAT**

La hidrólisis enzimática se realizó con BAT lavado y sin lavado previo, utilizando las condiciones óptimas locales establecidas en el capítulo 3 de esta tesis. La hidrólisis ácida fue realizada con BAT lavado de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas en el trabajo de Arreola-Vargas *et al.* (2015).

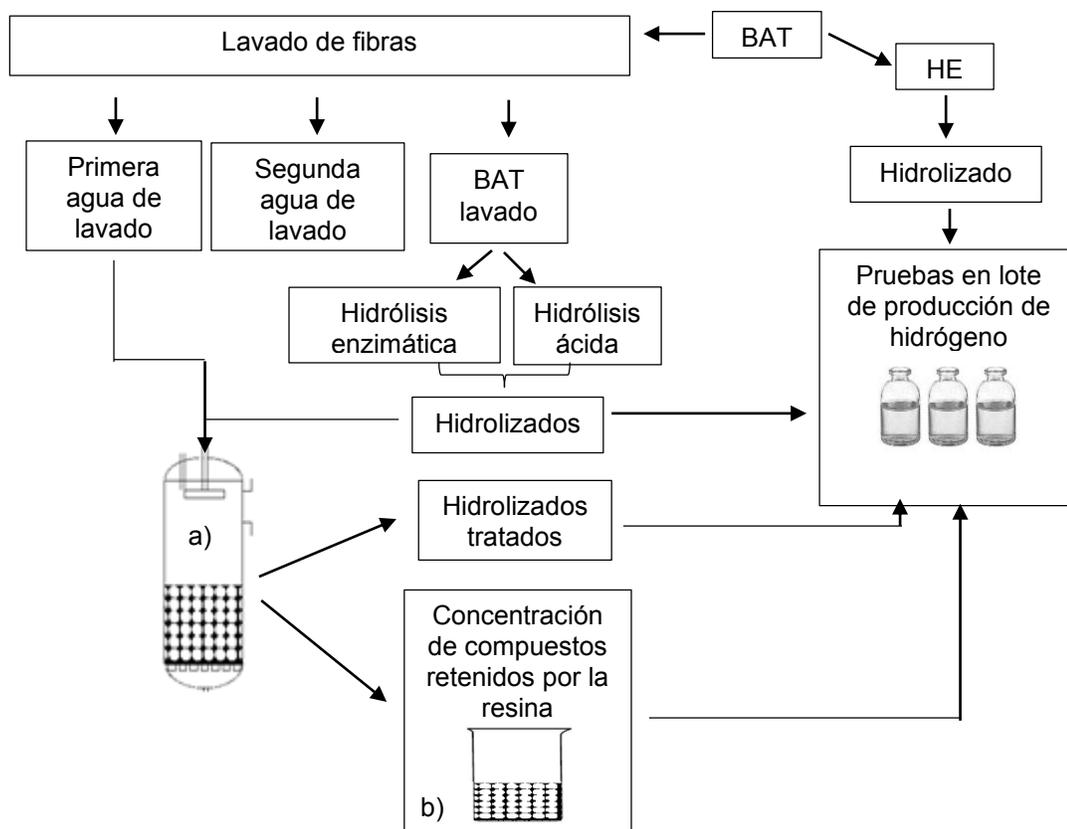


Figura 4.1 Estrategia experimental para evaluar el efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno por compuestos fenólicos formados durante el proceso de cocción de la PAT y durante los procesos de sacarificación del BAT. a) Columna empacada con resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 para remover compuestos fenólicos; b) Concentración de compuestos retenidos por la resina provenientes de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático.

#### 4.2.4 Caracterización de las aguas de lavado e hidrolizados de BAT

La primera y segunda agua de lavado e hidrolizados se caracterizarán determinando: DQO de acuerdo al Standard Methods (APHA, 1998), AT por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), AR por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar (Singleton *et al.* 1999). Los derivados furanos (HMF y furfural) y compuestos fenólicos (vanilina y siringaldehído) se determinaron por HPLC de acuerdo al método descrito por Arreola-Vargas *et al.* (2013) el cual brevemente consiste en el empleo de una columna Zorbax Eclipse XDB-C18,

Agilent Technologies (4.6 x 150 mm 5- micron), utilizando una fase móvil compuesta de agua/acetonitrilo (92/8% v/v) a un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de 40°C, el pH de las muestras y estándares se ajustó a 4.4.

Debido a la solubilización de los cristales de oxalato de calcio durante la hidrólisis ácida (reportada en el capítulo 2 de esta tesis), se determinó la concentración de calcio en los hidrolizados por espectroscopía de plasma ICP-OES (Varian 730-ES) a una longitud de onda de 422.67 nm.

#### **4.2.5 Remoción de compuestos fenólicos en la primera agua de lavado y en los hidrolizados del BAT**

Se empacó un volumen x mL (x mL= 1 BV por sus siglas en inglés) de resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 en una columna de vidrio, la resina se sometió a un lavado con 4BV de agua desionizada y con 2BV de etanol a un flujo de 2BV/hora, la primera agua de lavado y los hidrolizados (previamente filtrados con papel Whatman No. 1) se pasaron a un flujo de 3BV/hora, recolectando la muestra tratada después de pasar 1 BV (Figura 4.2).

El objetivo de filtrar la primera agua de lavado y los hidrolizados enzimáticos y ácidos fue eliminar material sólido suspendido presente en el hidrolizado para mantener un flujo constante al eluirlo a través de la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

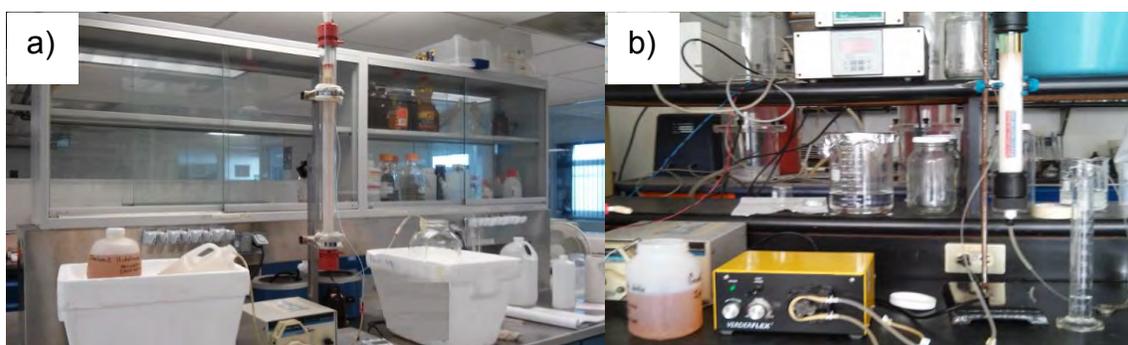


Figura 4.2 Columna empacada con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; a) remoción de compuestos fenólicos en la primera agua de lavado y en el hidrolizado enzimático (1BV=300 mL); b) remoción de compuestos fenólicos en el hidrolizado ácido (1BV=150 mL).

Los compuestos adsorbidos en la resina se desorbieron lavando la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 con etanol al 96%. Los compuestos eluidos se concentraron posteriormente por medio de un evaporador rotatorio IKA RV 10 BASIC a 30 rpm, 65°C y aplicando un vacío de 21 pulg/Hg. Por último, el concentrado etanólico se llevó a sequedad y el residuo resinoso se solubilizo en agua (30 mL en el caso de la muestra proveniente de la primera agua de lavado del BAT y 60 mL para el hidrolizado enzimático de BAT). La cantidad de muestra pasada por la columna fue 8L de aguas de lavado, 3.5L de hidrolizado enzimático y 0.5L de hidrolizado ácido.

Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) presente en el hidrolizado enzimático antes y después del tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66, para determinar la adsorción de proteína en la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

#### **4.2.6 Caracterización de los concentrados**

Los concentrados descritos en la sección 4.2.5 se caracterizaron en cuanto a contenido de azúcares (AT y AR), fenoles totales, y DQO de acuerdo a los métodos descritos en la sección 4.2.4.

#### **4.2.7 Ensayos en lote de producción de hidrógeno**

Los ensayos en lote de producción de hidrógeno se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2.5 del capítulo 3 de esta tesis.

##### **4.2.7.1 Efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de compuestos remanentes en el BAT formados durante el proceso de cocción de la PAT**

Para evaluar el posible efecto inhibitorio de los compuestos solubles presentes en el BAT originados durante el proceso de cocción, se realizaron experimentos en lote de producción hidrógeno. Estos experimentos se realizaron a partir de hidrolizado enzimático empleando BAT lavado y sin lavar a una concentración de AT de 6500 mg/L. Como control se utilizó glucosa como sustrato modelo a una concentración de 6500 mg/L y Celluclast 1.5L a 7 mg proteína/mL, la cual corresponde a la concentración presente en el hidrolizado enzimático.

#### **4.2.7.2 Efecto de la remoción de compuestos fenólicos en hidrolizados de BAT sobre la producción de hidrógeno**

Los ensayos en lote de producción hidrógeno se realizaron con hidrolizado enzimático y ácido filtrado con papel Whatman No. 1. Después de la filtración se procedió a eluir el hidrolizado a través de la resina de adsorción. Las pruebas de producción de hidrógeno se llevaron a cabo con el hidrolizado filtrado antes y después de eluirlo por la resina a una concentración de AT de 5000 mg/L. Como control se utilizó glucosa como sustrato modelo a una concentración de 5000 mg/L.

#### **4.2.7.3 Efecto inhibitorio de los concentrados para la producción de hidrógeno**

Para evaluar el efecto inhibitorio de compuestos retenidos en la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66, se realizaron ensayos en lote utilizando como fuente de carbono un sustrato modelo (glucosa) a una concentración de 5000 mg/L de glucosa adicionando concentrado a diferentes concentraciones de compuestos fenólicos medidos como fenoles totales (1000 mg/L, 100 mg/L y 10 mg/L). Como control se utilizó glucosa a una concentración de 5000 mg/L sin la adición de concentrado.

### **4.3 Resultados y discusión**

#### **4.3.1 Caracterización de las aguas de lavado e hidrolizados del BAT**

El BAT como lo muestran las aguas de lavado contienen remanentes de compuestos formados durante el proceso de cocción de la PAT, por lo que se esperaría que los hidrolizados con BAT sin un lavado previo contengan una mayor cantidad de azúcares y de compuestos fenólicos (Tabla 4.1). Debido a que los lavados del BAT se realizaron varias veces utilizando una agitación enérgica, se obtuvo una buena remoción de los compuestos impregnados en las fibras del BAT. Esto se refleja en una mayor concentración de fenoles totales en la primera y segunda agua de lavado comparada con la obtenida en el hidrolizado enzimático realizados bajo condiciones no severas (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Caracterización de la primera y segunda agua de lavado y de los hidrolizados enzimáticos y ácidos del BAT.

Muestra	DQO (mg/L)	AT (mg/L)	AR (mg/L)	Fenoles totales (mg/L)	Derivados furanos (mg/L)	Calcio (mg/L)
Primera agua de lavado del BAT	540.2 ± 97.2	331.13 ± 14.5	307.6 ± 28.5	130 ± 5.2	-	-
Segunda agua de lavado del BAT	160.35 ± 6.5	69.55 ± 9.7	-	80 ± 1.4	-	-
HE de BAT sin lavar	33083 ± 2969	8558 ± 262	7459 ± 257	153.6 ± 14.8	-	-
HE de BAT lavado	29027 ± 2234	7209 ± 211	6932 ± 111	107.1 ± 4.9	-	-
HA de BAT lavado	17002 ± 4239	14026 ± 190	16325 ± 7141	476.1 ± 141	Fur=16.2±1.5 HMF=0.879 ±0.05	408 ± 91

HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido; Fur: furfural.

En base a las concentraciones de AT, AR y fenoles totales reportadas anteriormente se calcularon los rendimientos obtenidos en los procesos de hidrólisis y en el proceso de lavado del BAT (Figura 4.3). El hidrolizado enzimático se obtuvo en condiciones no severas por lo que los rendimientos de azúcares fermentables (210-245 mg AT/g BAT; 199-213 mg AR/g BAT) y concentración de fenoles totales (3-4.4 mg/g BAT), son menores en comparación con el hidrolizado ácido (Figura 4.3). Realizado en condiciones más severas, obteniendo un mayor rendimiento de azúcares fermentables (280 mg AT/g BAT; 326 mg AR/g BAT) y una mayor formación de compuestos inhibitorios (9.52 mg fenoles totales/g BAT, 0.016 mg furfural/g BAT y 0.3 mg HMF/g BAT).

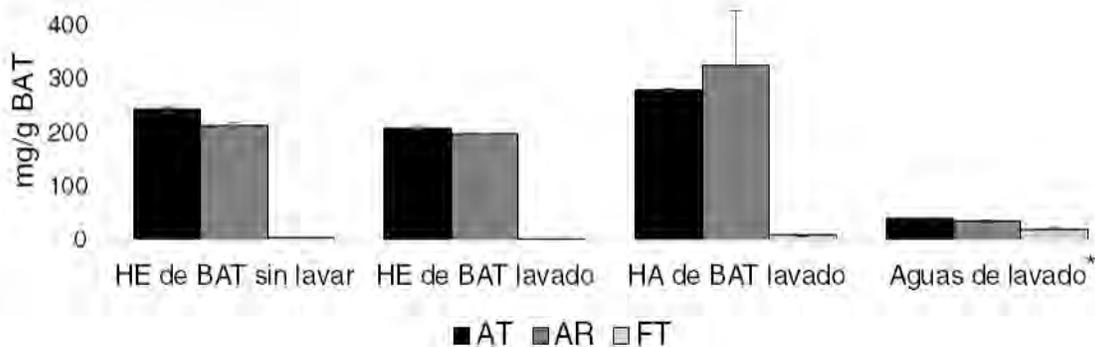


Figura 4.3 Rendimiento obtenido en los hidrolizados y aguas de lavado de BAT. FT: Fenoles totales; HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido. \*El rendimiento reportado se calculó considerando las concentraciones de la primera y segunda agua de lavado del BAT.

La concentración de compuestos fenólicos medidos como fenoles totales, presentes tanto en las aguas de lavado como en ambos hidrolizados, no corresponden a vanilina ni a siringaldehído ya que estos compuestos fenólicos no se detectaron por HPLC.

Por otra parte en concordancia con los datos reportados en el capítulo 2, donde se observa que un tratamiento de hidrólisis ácida remueve los cristales de oxalato de calcio del BAT. El hidrolizado ácido mostró una concentración de calcio soluble de  $408 \pm 91$  mg/L, en forma de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) de acuerdo a la Ecuación 4.1. Sin embargo, su presencia en el hidrolizado ácido no ha sido reportada y no existen estudios sobre su efecto en los procesos fermentativos. Por otra parte, en la literatura esta reportado que sales como el  $\text{CaCl}_2$  interfieren en el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para cuantificar AR, donde estos iones aumentan la absorbancia de las muestras (Leung, 1984). Probablemente, por esta razón la concentración de AR fue mayor que la concentración de AT en el hidrolizado ácido como se puede apreciar en la Tabla 4.1 y Figura 4.3. Este efecto no se observó en el hidrolizado enzimático, lo cual apoya la suposición de que los iones de calcio interfieren en la determinación de AR.



### 4.3.2 Remoción de compuestos fenólicos de los hidrolizados y caracterización de los concentrados.

Similar a las altas remociones de derivados furanos y compuestos fenólicos presentes en hidrolizados reportadas para la resina de adsorción XAD-4 (Weil *et al.* 2002; Schwartz *et al.* 2010; Hatano *et al.* 2013). La resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 también mostró ser efectiva para remover fenoles totales (92%), HMF (100%) y furfural (62%) en el hidrolizado ácido, mostrando una pérdida mínima de AT y calcio en dichos hidrolizados (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Caracterización de las aguas de lavado y de los hidrolizados de BAT antes y después de remover compuestos fenólicos por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

Muestra	DQO (mg/L)	AT (mg/L)	FT (mg/L)	Proteína (mg/mL)	Fur (mg/L)	HMF (mg/L)	Ca (mg/L)
Primera agua de lavado (antes)	540.5	331.39	130	-	-	-	-
Primera agua de lavado (después)*	325.82	272.14	111.4	-	-	-	-
HE (antes)	26520	7090	107.16	0.67	-	-	-
HE (después)	24510	6900	78.41	0.62	-	-	-
HA (antes)	15560	1412	406.11	-	0.837	15.10	360.9
HA (después)	14360	1348	32.72	-	0.314	0	349.3

FT: fenoles totales; Fur: Furfurales; HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido. \*Las concentraciones se determinaron en base a las concentraciones presentes en la primera agua de lavado antes del tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 y a las concentraciones encontradas en el concentrado obtenido de la primera agua de lavado (Tabla 4.4). Los cálculos se presentan en el Anexo 3a.

Por el contrario, para la primera agua de lavado y el hidrolizado enzimático del BAT se presentó una remoción baja de fenoles totales, del 12 y 26.8% respectivamente.

Cabe hacer notar que el reactivo de Folin-Ciocalteu además de utilizarse para determinar fenoles totales, también es utilizado para determinar proteína por el método de Lowry. Por lo tanto, los resultados de fenoles totales se encuentran sobrestimados, ya que no solo se cuantifican los fenoles totales sino que además se cuantifican las enzimas del Celluclast 1.5L presentes en el hidrolizado (Lowry *et al.* 1951).

Lo anterior se demostró determinando fenoles totales en el Celluclast 1.5L a la misma concentración utilizada durante la hidrólisis enzimática de BAT (0.7 mg proteína/mL), en el hidrolizado enzimático antes y después de la elución por la resina de adsorción AMBERLITE™ FXP66 (Tabla 4.3) y después de filtrar las muestras del hidrolizado enzimático antes y después de la elución por la resina de adsorción AMBERLITE™ FXP66 a través de un filtro de 10kDa para eliminar las enzimas del Celluclast 1.5L. Suponiendo que el tamaño de las enzimas presentes en el Celluclast 1.5L es mayor a 10kDa por lo que son retenidas en el filtro (Tabla 4.3).

Los resultados mostrados en la Tabla 4.3 indican que efectivamente una parte del color desarrollado en el método de fenoles totales se debe al Celluclast 1.5L. Por otra parte, la concentración de fenoles totales que se midió experimentalmente en el hidrolizado enzimático, después de haber sido filtrados por el filtro de 10 kDa fue más baja que la concentración encontrada en el hidrolizado sin filtrar, lo cual indica la contribución de la proteína. Adicionalmente, se realizó una estimación de la concentración de fenoles totales presentes en el hidrolizado enzimático, en la que no se incluyó la contribución del Celluclast 1.5L. Para esto, se sustrajo la contribución de fenoles totales del Celluclast 1.5L de la concentración de fenoles totales medida en el hidrolizado enzimático sin filtrar. Los resultados de dicha concentración estimada de fenoles totales se muestran en la Tabla 4.3. Se puede observar que la concentración de fenoles totales medida fue menor que la estimada. Esta discrepancia podría indicar que el filtro de 10 kDa además de retener a las enzimas del Celluclast 1.5L, retiene compuestos fenólicos con pesos moleculares

mayores a 10 kDa. La naturaleza de estos compuestos se desconoce ya que no ha sido reportada su presencia en el hidrolizado enzimático.

Tabla 4.3 Determinación de fenoles totales (mg/L) en el Celluclast 1.5L y en el hidrolizado con y sin enzimas del Celluclast 1.5L.

	<b>Celluclast 1.5L</b>	<b>Hidrolizado enzimático (antes)</b>	<b>Hidrolizado enzimático (después)</b>	<b>Remoción de FT (%)</b>
Sin filtrar por 10 kDa	46.8	107.2	78.4	26.8
Filtrados por 10 kDa	ND	28.83	15.9	44.8
Concentración estimada*	-	60.4	31.6**	47.6

ND: No determinada; FT: fenoles totales. \* La concentración de fenoles totales estimada se calculó sustrayendo la concentración de fenoles totales medida en el Celluclast 1.5L (antes de la filtración por 10 kDa) de la concentración de fenoles totales medida en el hidrolizado enzimático también antes de la filtración. \*\*El cálculo de este valor se realizó considerando que las enzimas presentes en el Celluclast 1.5L no se adsorbieron a la resina y que se eluyó en su totalidad en el hidrolizado enzimático.

Los valores de la remoción de fenoles totales al pasar el hidrolizado enzimático por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 se muestran en la Tabla 4.3. El primer valor corresponde a la remoción calculada sin remover la contribución de la proteína presente en el Celluclast 1.5L (26.8%). El segundo valor se calculó con los valores de concentración de fenoles totales medidos experimentalmente después de filtrar con el filtro de 10 kDa. El tercer valor se calculó con las concentraciones estimadas de la forma ya descrita. Los valores de remoción para ambos casos fue muy semejante (44.8% y del 47.6%) y mayores que para el caso en que no se eliminó la contribución de la proteína presente en el Celluclast 1.5L. Esta discrepancia se debe a que las enzimas no son retenidas por la resina AMBERLITE™ FXP66 y están aún presente casi en su totalidad en el hidrolizado enzimático eluido a través de la resina AMBERLITE™ FPX66 (Tabla 4.2). Por lo que contribuye a la concentración de fenoles totales lo que se refleja en un rendimiento aparentemente más bajo.

Como puede observarse en la Figura 4.4 y 4.5 la coloración de la primera agua de lavado y del hidrolizado ácido del BAT se perdió durante el tratamiento con la resina

de adsorción AMBERLITE™ FPX66, esto indica que dicha coloración se debió principalmente a los compuestos fenólicos removidos.

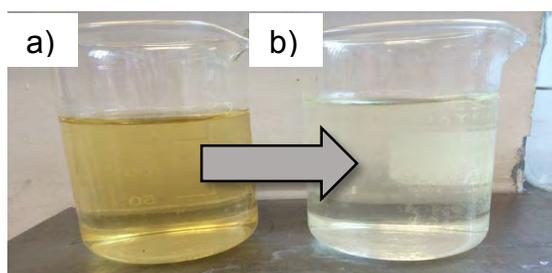


Figura 4.4 Cambio de color durante la remoción de compuestos fenólicos en la primera agua de lavado; a) Primera agua de lavado antes de eluirla por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; b) Primera agua de lavado después de eluirla por la resina.

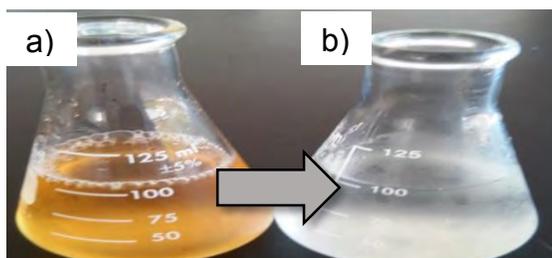


Figura 4.5 Cambio de color durante la remoción de compuestos fenólicos en el hidrolizado ácido; a) hidrolizado ácido antes de eluirlo por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; b) hidrolizado ácido después de eluirlo por la resina.

En la Figura 4.6 se observa que hubo una remoción importante de color al pasar el hidrolizado enzimático por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66, aunque no tan efectiva como en el caso de la primera agua de lavado y del hidrolizado ácido. Sin embargo, se observa que la remoción de la turbidez inicial fue menos efectiva y aun se observa de forma importante en el hidrolizado eluido a través de la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66. Parte de esta turbidez podría deberse a la presencia de la proteína del Celluclast 1.5L, que no es removida del hidrolizado durante su elución por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66. Otra contribución a la turbidez podrían ser los compuestos fenólicos que no fueron retenidos por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

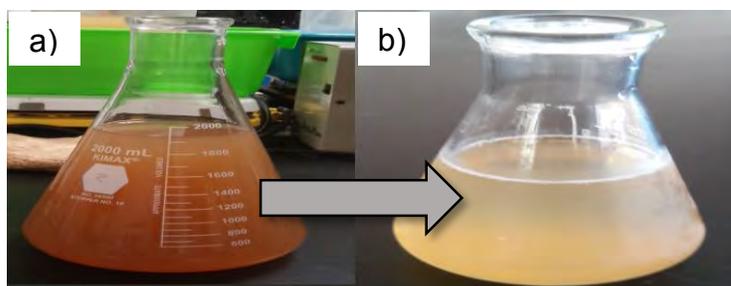


Figura 4.6 Cambio de color durante la remoción de compuestos fenólicos del hidrolizado enzimático; a) hidrolizado enzimático antes de eluirlo por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66; b) hidrolizado enzimático después de eluirlo por la resina.

La caracterización de los concentrados obtenidos a partir de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático del BAT se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Caracterización de los concentrados obtenidos a partir de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático de BAT.

<b>Concentrado</b>	<b>Fenoles totales (mg/L)</b>	<b>AT (mg/L)</b>	<b>AR (mg/L)</b>	<b>DQO (mg/L)</b>
Obtenido de la primera agua de lavado del BAT	4960	15800	8631	57250
Obtenido del hidrolizado enzimático de BAT	1576.3	34971	24650	149500

La concentración alta de fenoles totales presente en el concentrado obtenido a partir de la primera agua de lavado del BAT (Tabla 4.4) se obtuvo a partir de un volumen de 8L que fueron eluidos por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 indicando que la resina removió 18.6 mg/L de fenoles totales, los cuales se concentraron en un volumen final de 30 mL. La concentración de fenoles totales en el concentrado obtenido a partir del hidrolizado enzimático indica que la resina removió del hidrolizado 27 mg/L de fenoles totales (cálculos presentados en el Anexo 3b).

### 4.3.3 Ensayos en lote de producción de hidrógeno

#### 4.3.2.1 Efecto inhibitorio para la producción de hidrógeno de compuestos remanentes en el BAT obtenidos durante el proceso de cocción de la PAT

En la Figura 4.7 y en la Tabla 4.5 se muestran los resultados de la cinética de producción de hidrógeno a partir del hidrolizado enzimático a partir del BAT con y sin lavado previo. Se observa que la cantidad de hidrógeno acumulado ( $H_{max}$ ) es menor cuando el bagazo no es sometido a un proceso de lavado previo. Además, se observó un efecto semejante sobre el RMH (Tabla 4.5), es decir un menor RMH cuando el bagazo no fue lavado. Los RMH observados para los hidrolizados enzimáticos son mayores que los observados para el control con glucosa (Tabla 4.5), lo cual indica una contribución adicional a los azúcares presente en los hidrolizados, proveniente del Celluclast 1.5L, como ya se discutió en el capítulo 3.

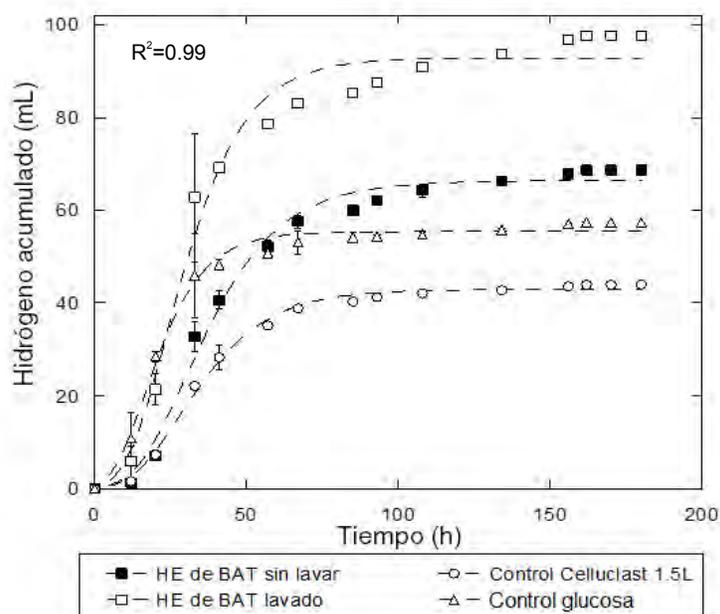


Figura 4.7 Producción acumulada de hidrógeno en lote de hidrolizados enzimáticos a partir de BAT con y sin lavado previo. HE: hidrolizado enzimático. La concentración de AT fue de 6500 mg/L en los hidrolizados como en el control de glucosa. La concentración de Celluclast 1.5L fue de 0.7 mg proteína/mL equivalente a la que se esperaba estuviera presente en los hidrolizados.

Cuando la contribución a la producción de hidrógeno del Celluclast 1.5L se eliminó de los hidrolizados enzimáticos los RMH se corrigieron ( $RMH^{CORR}$ ); siendo menores

al control de glucosa (Tabla 4.5) como era de esperarse. Sin embargo, el RMH obtenido con el hidrolizado enzimático del BAT sin lavar fue notoriamente menor que el obtenido con el hidrolizado enzimático del BAT lavado. Un comportamiento similar se observó en los valores de VVPH (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos a partir de BAT con y sin lavado previo.

Sustrato	pH final	Hmax (mL)	Hmax <sup>CORR</sup> (mL)	$\lambda$ (h)	VVPH (mL H <sub>2</sub> /L-h)	RMH (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)	RMH <sup>CORR</sup> (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)
Control de Glucosa	5.97±0.1	55.3±0.4	-	5.63±1.3	62.79±14	1.50±0.2	-
HE de BAT sin lavar	6.49±0.1	66.34±2.4	23.39±2.4	13.33±1.1	48.10±8.7	1.74±0.1	0.61±0.1
HE de BAT lavado	6.50±0.1	92.83±0.2	49.88±0.2	10.14±1.9	81.73±1.7	2.63±0.1	1.30±0.1

Hmax<sup>CORR</sup> y RMH<sup>CORR</sup> se estimaron eliminando la aportación del Celluclast 1.5L para la producción de hidrógeno. HE: hidrolizado enzimático. Los resultados equivalen al promedio del triplicado que se realizó en los ensayos en lote.

Los resultados anteriores indican que el lavado del BAT incrementa la producción de hidrógeno a partir del hidrolizado enzimático. Este incremento podría deberse a la remoción de compuestos solubles con actividad inhibitoria para la fermentación oscura derivados de las reacciones Maillard (compuestos aldehídos, nitrogenados, sulfurados, piranos y terpenos) generadas durante el proceso de cocción de la PAT (Mancilla-Margalli y López, 2002; Tauer *et al.* 2004).

Sin embargo, dicho incremento en la producción de hidrógeno conlleva el empleo de cantidades importantes de agua empleadas en el proceso de lavado. Por lo tanto, se tendrá que evaluar si en procesos en continuo y al menos a nivel piloto el aumento en la producción de hidrógeno compensa el balance de agua del proceso.

#### 4.3.2.2 Efecto de la remoción de compuestos fenólicos en hidrolizados de BAT sobre la producción de hidrógeno

Los resultados para evaluar el efecto de la remoción de fenoles totales sobre la producción de hidrógeno se muestran en la Figura 4.8 y en la Tabla 4.6. Se observa que después de pasar el hidrolizado enzimático por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 la VVPH fue ligeramente superior. Mientras que el RMH fue ligeramente menor, comparados con los valores obtenidos para el hidrolizado enzimático sin pasar por la resina. Es decir, no hubo una mejoría importante en la producción de hidrógeno. Estos resultados indican que los compuestos removidos durante el tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66, no ejercían un efecto inhibitorio (Figura 4.8). Debido a que la remoción de fenoles totales no fue completa (Tabla 4.2) no se observó un efecto benéfico sobre la producción de hidrógeno debido quizás a que supuestos compuestos inhibitorios no se retuvieron en la resina o se retuvieron en mínima proporción.

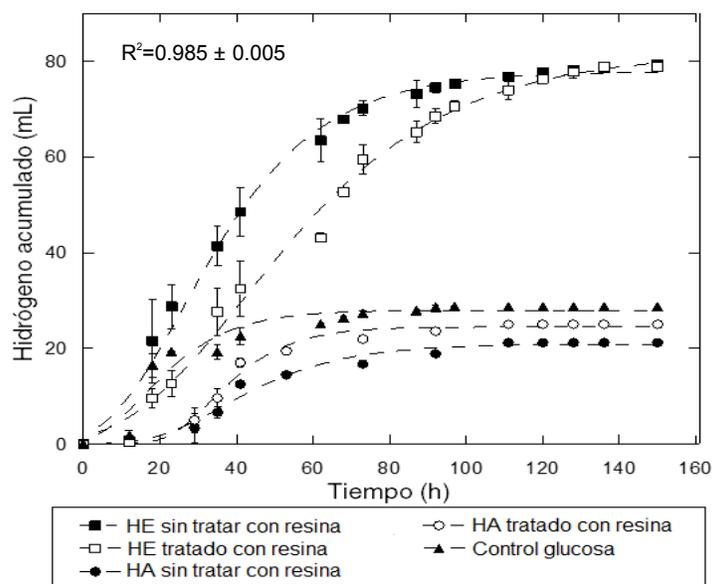


Figura 4.8 Producción acumulada de hidrógeno en lote de hidrolizados sin tratar y tratados con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 para remover compuestos fenólicos. HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido. La concentración de AT fue de 5000 mg/L tanto en los hidrolizados como en el control de glucosa.

Cabe aclarar que el material sólido suspendido presente en los hidrolizados enzimáticos y ácidos fue removido antes del tratamiento para remover compuestos fenólicos, con la finalidad de mantener constante la velocidad de flujo durante su paso por la columna empacada con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66. La eliminación del material sólido suspendido en el hidrolizado enzimático permitió mejorar ligeramente la VVPH ( $99.7 \pm 6.5$  mL H<sub>2</sub> /L-h) (Tabla 4.6) durante los ensayos en lote, en comparación con la VVPH ( $81.7 \pm 1.7$  mL H<sub>2</sub> /L-h) presentada en la Tabla 4.5 utilizando hidrolizado enzimático sin remoción de sólidos.

Tabla 4.6 Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados sin tratar y tratado con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

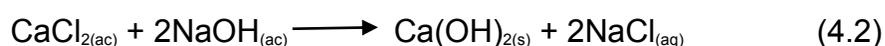
Sustrato	pH final	Hmax (mL)	Hmax <sup>CORR</sup> (mL)	λ (h)	VVPH (mL H <sub>2</sub> / l-h)	RMH (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)	RMH <sup>CORR</sup> (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)
Control de Glucosa	6.21±0.1	27.57±0.3	-	6.0±0.2	50.03±10	1.67±0.1	-
HE sin tratar con resina	6.33±0.1	80.61±9.5	37.17±9.5	11.01±1.7	99.70±6.5	2.89±0.3	1.33±0.1
HE tratado con resina	6.51±0.2	77.82±5.7	35.79±5.7	6.40±2.3	119.30±5.7	2.65±0.2	1.21±0.1
HA sin tratar con resina	6.49±0.1	20.49±3.2	-	20.5±3.4	15.44±1.7	0.96±0.1	-
HA tratado con resina	6.51±0.3	24.27±3.5	-	21.8±0.2	24.38±7.3	1.14±0.2	-

Hmax<sup>CORR</sup> y RMH<sup>CORR</sup> se estimaron eliminando la aportación del Celluclast 1.5L para la producción de hidrógeno; asumiendo no pérdidas de enzima durante el tratamiento con la resina de adsorción; HE: hidrolizado enzimático; HA: hidrolizado ácido. Los resultados equivalen al promedio del triplicado que se realizó en los ensayos en lote.

Por otro lado los compuestos removidos durante el tratamiento con la resina de adsorción del hidrolizado ácido permitió aumentar el RMH y VVPH (Figura 4.8 y

Tabla 4.6) aunque ambos valores aun fueron menores que los obtenidos con glucosa.

Al momento de ajustar pH a 7.5 para realizar los ensayos en lote de producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados ácidos sin tratar y tratados con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 se observó la formación de un precipitado blanco (Figura 4.9). De acuerdo a la Ecuación 4.2 el  $\text{CaCl}_2$  presente en los hidrolizados ácidos se precipitan en forma de hidróxidos de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) al ajustar pH con hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ).



El efecto de los iones de calcio para la producción de hidrógeno se ha encontrado que en concentraciones moderadas (100 mg/L) mejoran la producción de hidrógeno, siendo un elemento clave para la formación de gránulos en biorreactores (Wu *et al.* 2012) pero en exceso (mayor a 300 mg/L) afecta la producción de hidrógeno (Liu *et al.* 2015). Sin embargo la presencia de calcio soluble presente en los hidrolizados ácidos podría ser mínima o nula después de ajustar el pH. No obstante, estos precipitados pueden deberse también a  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnCl}_2$  del medio mineral. Los cuales pueden ser fácilmente ionizados al adicionarse a los hidrolizados ácidos.



Figura 4.9 Formación de precipitados en hidrolizados ácidos al ajustar pH a 7.5 para los ensayos en lote de producción de hidrógeno.

Estos precipitados presentes en los ensayos de producción de hidrógeno, podrían evitar que los microorganismos entren en contacto con el sustrato prolongando la fase lag para la producción de hidrógeno (Liu *et al.* 2015). Esto último podría explicar que la fase lag para la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados ácidos fue mayor comparada con la observada para el control de glucosa.

No obstante, la mayor fase lag observada para los hidrolizados ácidos no solo podría deberse a la presencia de los precipitados sino además a la presencia de pentosas (xilosas) en los hidrolizados, por la remoción de hemicelulosa durante la hidrólisis ácida. En comparación con las hexosas, las pentosas son relativamente más difícil de ser metabolizadas por los microorganismos productores de hidrógeno (Wu *et al.* 2007).

#### 4.3.2.3 Efecto inhibitorio de los concentrados sobre la producción de hidrógeno

En los ensayos realizados con ambos concentrados (obtenidos a partir de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático del BAT), se encontraron resultados contradictorios en cuanto a la inhibición de la producción de hidrógeno (Figura 4.10 y 4.11).

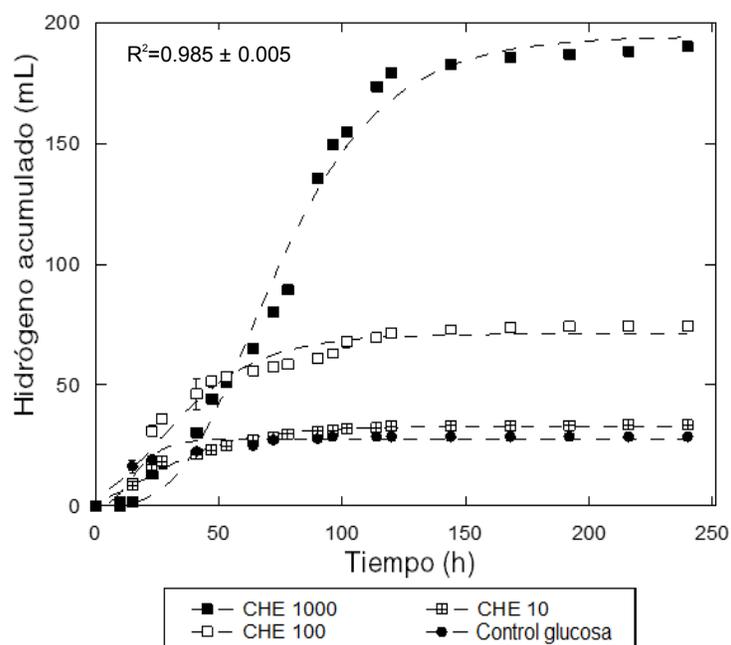


Figura 4.10 Producción acumulada de hidrógeno de los ensayos con el concentrado obtenido del hidrolizado enzimático del BAT (CHE) evaluado a una concentración de 1000, 100 y 10 mg/L de fenoles totales con la adición de 5000 mg/L de glucosa. La concentración del control de glucosa fue de 5000 mg/L sin adición del concentrado.

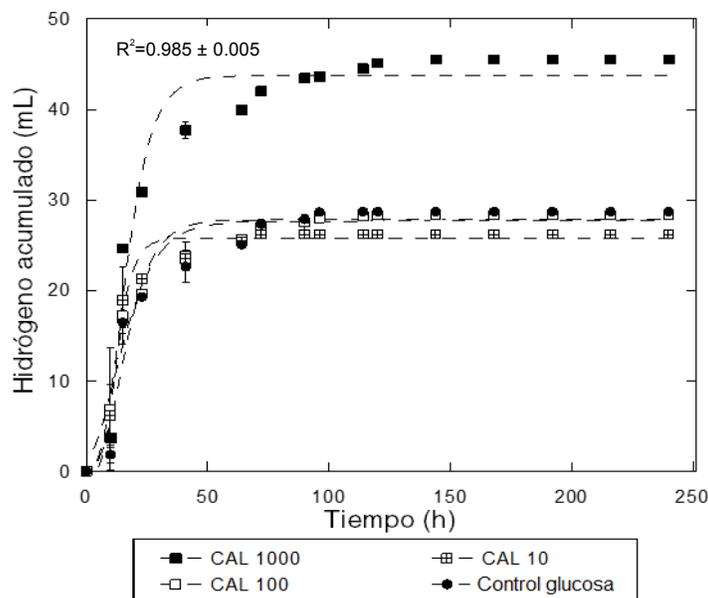


Figura 4.11 Producción acumulada de hidrógeno de los ensayos con el concentrado obtenido de la primera agua de lavado del BAT (CAL) evaluado a una concentración de 1000, 100 y 10 mg/L de fenoles totales con la adición de 5000 mg/L de glucosa. La concentración del control de glucosa fue de 5000 mg/L sin adición del concentrado.

Hay que resaltar el hecho de que además de concentrarse compuestos fenólicos también se concentraron azúcares, presentando una concentración alta de DQO (Tabla 4.4). Por lo que las Hmax fueron superiores al control de glucosa, especialmente en los ensayos con el concentrado obtenidos a partir del hidrolizado enzimático (Figura 4.10 y Tabla 4.7).

En los ensayos con concentrado obtenido del hidrolizado enzimático con la menor concentración de fenoles totales (10 mg/L) mostró valores de VVPH y RMH menores que el control de glucosa. Sin embargo, la concentración más alta de fenoles totales (1000 mg/L) mostró valores más altos de VVPH ( $80.06 \pm 6.1$  mL H<sub>2</sub> /L-h) y RMH ( $3.43 \pm 0.1$  mol H<sub>2</sub>/mol AT consumido), incluso más altos que el control de glucosa ( $44.70 \pm 4.4$  mL H<sub>2</sub> /L-h y  $1.66 \pm 0.1$  mol H<sub>2</sub>/mol AT consumido). De hecho, los datos de la Tabla 4.7 muestran claramente que a mayor concentración de fenoles totales se incrementa la VVPH y el RMH. Esto probablemente se debe a que la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66, además de retener compuestos fenólicos retuvo azúcares y probablemente otros compuestos. Por lo que la producción de hidrógeno

probablemente no solo se debe a los azúcares presentes. También se observó que la fase lag aumento al aumentar la concentración de fenoles (Tabla 4.7), lo cual es similar a lo reportado por Quéméneur *et al.* (2012).

Por otra parte los ensayos con el concentrado obtenido de la primera agua de lavado del BAT provocaron valores de RMH menores que los del control de glucosa. A diferencia del concentrado obtenido del hidrolizado enzimático no se observó un incremento del RMH a mayor concentración de fenoles totales (Tabla 4.7).

Tabla 4.7 Resultados del modelo de Gompertz para los ensayos realizados para la producción de hidrógeno a partir de los concentrados.

Sustrato	AT* (mg/L)	pH final	Hmax (mL)	$\lambda$ (h)	VVPH (ml H <sub>2</sub> /L-h)	RMH (mol H <sub>2</sub> / mol AT consumido)
Control de Glucosa	5000	6.47 ± 0.5	27.84 ± 4.1	6.40 ± 0.8	44.70±4.4	1.66 ±0.2
CHE1000	27190	6.21 ± 1.5	194.29 ± 1.1	32.76 ± 1.8	80.06 ± 6.1	3.43 ± 0.1
CHE100	7960	6.33 ± 0.1	70.47 ± 3.8	7.95 ± 2.9	38.74 ± 14	1.68 ± 0.1
CHE10	5231	6.47 ± 0.1	32.78 ± 1.6	6.89 ± 2.7	28.85 ± 8.9	1.37 ± 0.1
CAL1000	8270	6.25 ± 0.1	42.60 ± 1.6	10.56 ± 0.6	97.66 ± 7.2	1.15 ± 0.1
CAL100	5320	6.46 ± 0.1	27.23 ± 3.3	10.48±2.8	46.89 ± 6.3	1.30 ±0.1
CAL10	5010	6.49 ± 0.1	26.41 ± 1.6	8.76±3.6	40.63 ± 9.4	1.24 ± 1.3

\*Concentración de AT iniciales. CHE: concentrado obtenido a partir del hidrolizado enzimático; CAL: concentrado obtenido a partir de la primera agua de lavado del BAT. 1000, 100 y 10 equivalen a la concentración de fenoles totales presente en los ensayos de producción de hidrógeno. Los resultados equivalen al promedio del triplicado que se realizó en los ensayos en lote.

Resumiendo, en los ensayos en lote para ambos concentrados se observó que a mayor concentración de fenoles totales se incrementó la VVPH. Por otra parte, el RMH se incrementó no se vio afectado de forma importante en los ensayos con el concentrado obtenido de la primera agua de lavado. Pero si se incrementó con la

concentración de fenoles totales en el concentrado obtenido del hidrolizado enzimático. Lo anterior pareciera indicar que en el concentrado además de compuestos fenólicos se concentraron otros compuestos que contribuyeron a la producción de hidrógeno.

#### **4.3.2.4 Formación de metabolitos durante los ensayos en lote para la producción de hidrógeno**

El comportamiento de las rutas metabólicas dependió de las condiciones del sustrato que fue utilizado en los ensayos en lote para la producción de hidrógeno vía fermentación oscura. Dicho comportamiento se muestra en la Figura 4.12.

El efecto del lavado del BAT para eliminar compuestos solubles producidos durante el proceso de cocción de la PAT permitió una mejor producción de hidrógeno a partir del hidrolizado enzimático del BAT, lo cual se debió a que el metabolito predominante fue el acetato, seguido del butirato. La formación de propionato se favoreció en hidrolizados enzimáticos con BAT sin un proceso de lavado previo, impactando en una disminución de la concentración de acetato por lo que la producción de hidrógeno se vio afectada obteniendo un RMH más bajo en comparación con el RMH obtenido a partir del hidrolizado enzimático del BAT lavado.

A pesar de que el hidrolizado enzimático fue sometido al tratamiento con la resina de adsorción, para remover compuestos fenólicos, no mejoró el proceso de producción de hidrógeno. La eliminación de sólidos durante la filtración del hidrolizado enzimático permitió aumentar las VVPH (Tabla 4.5). Donde la concentración del metabolito de butirato aumentó (HE sin tratar por resina, Figura 4.12) en comparación con el hidrolizado enzimático con la presencia de sólidos (HE de BAT lavado). Obteniendo al acetato como metabolito predominante, sin embargo, las concentraciones altas de acetato pudo afectar la producción de hidrógeno impactando en los RMH que se obtuvieron (Van Ginkel y Logan, 2005).

La producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos con y sin remoción de compuestos fenólicos se realizó través de la vía de la acetogénesis ya que la

formación de acetato fue el metabolito que predominó (HA sin tratar por resina y HA tratado por resina Figura 4.12).

El perfil de los ácidos grasos volátiles (AGVs) producidos por el concentrado obtenido de la primera agua de lavado con diferentes concentraciones de fenoles totales (1000, 100 y 10 mg/L) y por el concentrado obtenido del hidrolizado enzimático con concentraciones de fenoles totales de 100 y 10 mg/L, fueron semejantes al control de glucosa. Esto debido a que la concentración de AT presente en dichos ensayos se debió en mayor parte a la glucosa que se adicionó como fuente de carbono.

Por otro lado el perfil de AGVs producidos en los ensayos con concentrado obtenido del hidrolizado enzimático a una concentración de 1000 mg/L de fenoles totales (CHE 1000, Figura 4.12) fue diferente al control de glucosa ya que la concentración de AT se debía en su mayor parte al concentrado. Bajo esta condición se observó que la formación del butirato se vio favorecida y en menor medida la formación de formiato.

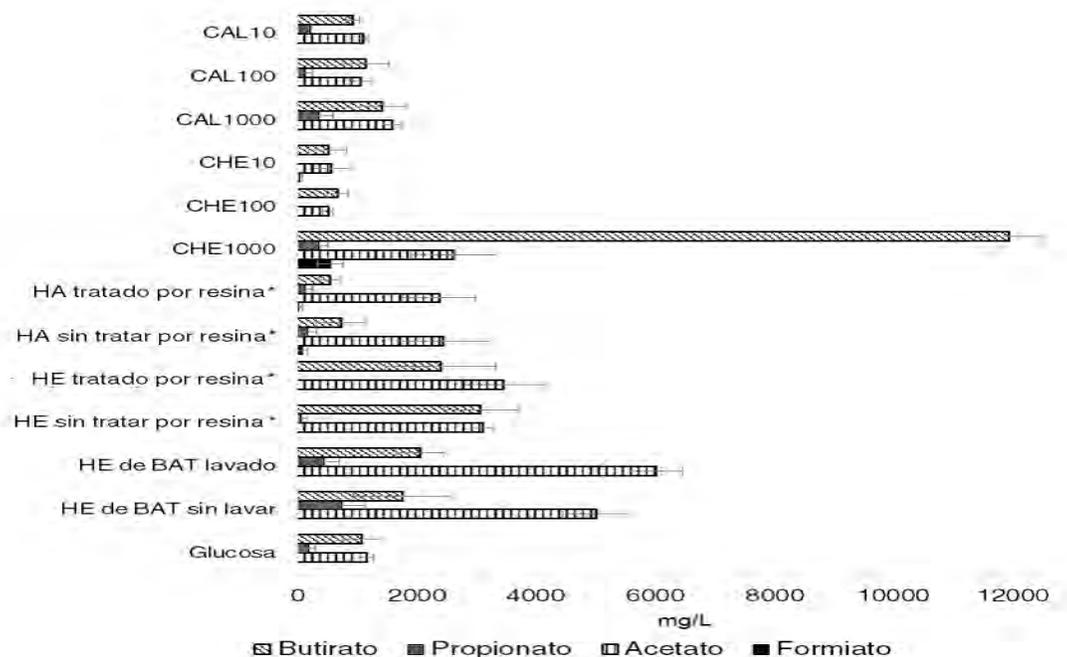


Figura 4.12 Producción de metabolitos durante los ensayos en lote para la producción de hidrógeno. \*Hidrolizados previamente filtrados para el tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

#### **4.4 Conclusiones**

El efecto del lavado del BAT para extraer compuestos solubles remanentes en el BAT producidos durante el proceso de cocción de la PAT permitió incrementar la producción de hidrógeno. Debido a que el concentrado que se obtuvo a partir de la primera agua de lavado del BAT, evaluado a diferentes concentraciones de fenoles totales no presentó actividad inhibitoria para la producción de hidrógeno. Existe la posibilidad de la presencia de otros compuestos solubles derivados de las reacciones Maillard (compuestos nitrogenados, sulfurados, piranos, terpenos) con efecto inhibitorio para el proceso de fermentación oscura, (Tauer *et al.* 2004). Los cuales no fueron retenidos por la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

La resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 fue eficiente para remover compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado enzimático (26.8%-44.8%) e hidrolizado ácido (92%), presentando una pérdida mínima de AT.

La remoción de compuestos fenólicos por medio de la resina AMBERLITE™ FPX66 no mejoró la producción de hidrógeno a partir del hidrolizado enzimático. Esto se confirmó en los estudios de inhibición, ya que el concentrado que se obtuvo de los compuestos retenidos en la resina de adsorción no mostró efecto inhibitorio para el proceso de fermentación oscura.

El tratamiento del hidrolizado ácido con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 mejoró la producción de hidrógeno alcanzando valores del RMH y de la VVPH más altos después del tratamiento. Sin embargo, los valores fueron menores que los valores de RMH y VVPH alcanzados con el sustrato modelo (glucosa).

Los concentrados evaluados a diferentes concentraciones de fenoles totales no fueron inhibitorios para la producción de hidrógeno. Sin embargo, se modificó el patrón de rutas metabólicas de la producción de AGVs, especialmente en los ensayos con el concentrado obtenido del hidrolizado enzimático a una concentración fenoles totales de 1000 mg/L.

## CAPÍTULO 5

### Discusión general, conclusiones generales y perspectivas

#### 5.1 Discusión general

Los experimentos descritos en el capítulo 2 de esta tesis estuvieron dirigidos a verificar la hipótesis I. La cual estableció que el contenido de fibras (celulosa cristalina y amorfa, hemicelulosa y lignina) se vería afectado y que el índice de cristalinidad disminuiría durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*. De acuerdo a los resultados reportados en el capítulo 2 el proceso de cocción y el proceso mecánico utilizando una desgarradora impregnando la piña con agua caliente fueron efectivos removiendo la fracción soluble, constituida principalmente por fructanos, lo cual se reflejó en un aumento de la celulosa y hemicelulosa en el bagazo remanente comparando con la piña de *A. tequilana* cruda. Estas observaciones confirmaron parcialmente la hipótesis I. Sin embargo no fue posible determinar si la celulosa cristalina fue afectada por los proceso de cocción ya que no se pudo calcular el índice de cristalinidad de la celulosa presente en la piña de *A. tequilana*. Por lo que esta parte de la hipótesis no pudo ser verificada. Sin embargo, se ha reportado que para destruir la cristalinidad de la celulosa cristalina se requieren condiciones muy severas. Por ejemplo Deguchi *et al.* 2008 comprobaron experimentalmente que la celulosa se transforma de un estado cristalino a un estado amorfo durante la hidrólisis de la celulosa, en condiciones de 320°C y 25 MPa. Debido a lo anterior no es de esperarse que la cristalinidad de la celulosa cambie durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana*.

Además de lo anterior, los resultados del capítulo 2 mostraron la presencia de cristales de oxalato de calcio en el bagazo de *A. tequilana* como ya había sido reportado por otros autores (Perez-Pimienta *et al.* 2013). La presencia de estos cristales es de especial interés ya que se disolvieron al llevar a cabo una hidrólisis ácida del bagazo de *A. tequilana*. La presencia de los iones de calcio en el hidrolizado ácido es un factor cuyo efecto sobre la fermentación oscura se requiere evaluar en estudios posteriores.

La hidrólisis enzimática del bagazo de *A. tequilana* descrita en el capítulo 2 se realizó de acuerdo a lo establecido en el estudio de Abreu-Sherrer en el 2013. Sin embargo, la remoción de las fracciones de hemicelulosa y celulosa fue mínima por lo que en el capítulo 3 se abordó la optimización de las condiciones de la hidrólisis enzimática de bagazo de *A. tequilana* para la producción de hidrógeno. Dicha optimización permitió una mejor sacarificación de las fibras del bagazo de *A. tequilana*, especialmente de hemicelulosa, ya que su remoción se incrementó de un 7.5% obtenido por Abreu-Sherrer, (2013) a un 26% bajo las condiciones óptimas locales encontradas en este trabajo. Así mismo, la optimización permitió disminuir 41% la concentración de enzimas celulolíticas (Celluclast 1.5L), comparada con la concentración empleada en el trabajo de Abreu-Sherrer, (2013). Esto tiene implicaciones prácticas importantes ya que uno de los mayores costos de la hidrólisis enzimática es el costo de la enzima.

Los experimentos descritos en el capítulo 4 se realizaron con el propósito de verificar la hipótesis II, la cual señalaba que los compuestos solubles presentes en el bagazo de *A. tequilana* formados durante el proceso de cocción de la piña de *A. tequilana* presentaban un efecto inhibitorio sobre la fermentación oscura para la producción de hidrógeno. De acuerdo a los resultados presentados en el capítulo 4 la hipótesis II se acepta. Ya que el hidrolizado realizado con bagazo de *A. tequilana* sometido a un proceso de lavado, para eliminar la presencia de estos compuestos solubles remanentes en el bagazo de *A. tequilana*, permitió incrementar la producción de hidrógeno. Este efecto inhibitorio no se asoció a compuestos fenólicos, puesto que los compuestos fenólicos extraídos de las aguas de lavado no presentaron efecto inhibitorio para la fermentación oscura. Lo anterior implica que una forma de mejorar la producción de hidrógeno es lavando el bagazo de *A. tequilana*. Sin embargo, se tendrá que comparar el costo del agua empleada con el beneficio económico obtenido al incrementarse la producción de hidrógeno en procesos continuos. También tendrá que considerarse, a escala industrial, la posibilidad de emplear agua tratada proveniente del tratamiento de las vinazas para llevar a cabo los lavados del bagazo de *A. tequilana*.

Los experimentos descritos en el capítulo 4 también se realizaron para verificar la hipótesis III, la cual establecía una mejora en los rendimientos y velocidades de producción de hidrógeno a través de la remoción de compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados. Para el hidrolizado ácido la hipótesis III se aceptó ya que de acuerdo a los resultados del capítulo 4, el hidrolizado ácido tratado con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 mostró un aumento en la producción de hidrógeno, incrementando el RMH y VVPH. Sin embargo, para el hidrolizado enzimático la hipótesis III se rechaza, puesto que el hidrolizado enzimático tratado con la resina de adsorción presentó un RMH y una VVPH similar al hidrolizado enzimático sin tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66. Esto se confirmó en los experimentos de inhibición ya que los compuestos removidos con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 no ejercieron un efecto inhibitorio.

## 5.2 Conclusiones generales

1. El proceso de cocción con vapor de la piña de *A. tequilana* resultó ser un tratamiento eficiente para remover la fracción soluble de la piña de *A. tequilana*. Debido a la remoción del tejido del parénquima durante el proceso de cocción, permitiendo que las células fibrosas del esclerénquima estén más expuesta en la estructura del bagazo de *A. tequilana* resultante.
2. La celulosa cristalina no se vio afectada durante los tratamientos de hidrólisis enzimática y ácida del bagazo de *A. tequilana*.
3. La hidrólisis ácida resultó ser un tratamiento eficiente para sacarificar las fibras de bagazo de *A. tequilana* presentando una remoción alta de la fracción de hemicelulosa. Por lo que la sacarificación fue mayor a lo obtenido por la hidrólisis enzimática. Además los cristales de oxalato de calcio presentes en las fibras del bagazo de *A. tequilana* fueron solubilizados durante el tratamiento de hidrólisis ácida.
4. El hidrolizado enzimático del bagazo de *A. tequilana* realizado con las condiciones óptimas locales permitió incrementar modestamente el rendimiento de sacarificación. Sin embargo, se logró disminuir de forma importante la concentración del Celluclast 1.5L empleado en la hidrólisis enzimática.

5. El lavado del bagazo de *A. tequilana* para extraer compuestos solubles remanentes del proceso de cocción de la piña de *A. tequilana* permitió incrementar la producción de hidrógeno.
6. La resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 fue eficiente para remover compuestos fenólicos medidos como fenoles totales presentes en el hidrolizado enzimático (26.8%-44.8%) y en el hidrolizado ácido (92%), presentando una pérdida mínima de azúcares totales. Lo anterior permitió mejorar la producción de hidrógeno del hidrolizado ácido ya que se observó un incremento en los rendimientos y velocidades de producción de hidrógeno. Sin embargo, en el hidrolizado enzimático no se observó una mejora en la producción de hidrógeno.
7. Los concentrados obtenidos a partir de la primera agua de lavado y del hidrolizado enzimático del bagazo de *A. tequilana*, evaluados a una concentración de 1000 mg/L de fenoles totales no son inhibitorios para para la producción de hidrógeno. Sin embargo se modificaron las rutas metabólicas de la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) durante la fermentación oscura.

### **5.3 Perspectivas**

1. Un tratamiento de hidrólisis enzimática para las fibras de bagazo de *A. tequilana* resultantes del tratamiento de hidrólisis ácida podría ser atractiva. Ya que las fibras presentan un alto contenido de celulosa sin cristales de oxalato de calcio, la cual podría hacer a la celulosa más accesible para la hidrólisis enzimática. Sin embargo, debido a que la estructura de la fibra después de la hidrólisis ácida cambió, probablemente es necesario optimizar nuevamente las condiciones de hidrólisis enzimática con el objetivo de maximizar los rendimientos de sacarificación.
2. Es importante estudiar procesos en continuo de producción de hidrógeno en donde se evalúe el empleo del bagazo lavado y de la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66 para mejorar la producción de hidrógeno a partir del hidrolizado ácido.

3. Debido a que los constituyentes del preparado comercial del Celluclast 1.5L presentes en el hidrolizado enzimático aportan de forma importante a la producción de hidrógeno es preponderante analizar y comparar los costos de recuperación y reutilización de las enzimas del Celluclast 1.5L presentes en el hidrolizado, con los incrementos en los RMH y VVPH que producen al estar presentes en el hidrolizado enzimático.
4. Dado que el hidrolizado enzimático filtrado mostró tener un impacto positivo para la producción de hidrógeno es importante realizar los estudios de inhibición a la fracción sólida presentes en el hidrolizado.
5. Debido a que los iones de calcio presentes en el hidrolizado ácido, interfieren en el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para cuantificar azúcares reductores, es necesario implementar un método diferente para cuantificar azúcares reductores en el hidrolizado ácido de bagazo de *A. tequilana*. Así mismo, es necesario estudiar si la presencia de los iones de calcio en el hidrolizado ácido también interfiere con la técnica para medir azúcares totales por el método fenol-sulfúrico.
6. Aunque existen estudios del efecto de la adición de iones de calcio para la producción de hidrógeno en sistemas en continuo (Wu *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015), es necesario evaluar la presencia de los precipitados de  $\text{Ca(OH)}_2$  formados en el hidrolizado ácido al elevar el pH y su efecto para la producción de hidrógeno vía fermentación oscura.

## LITERATURA CITADA

- Abreu Sherrer J.S.** 2013. Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, A.C. SLP, México.
- Achyuthan K. E, Achyuthan A. M, Adams P. D, Dirk S. M, Harper J. C, Simmons B. A, Singh A. K.** 2010. Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. *Molecules* (15) 8641-8688.
- Adney B, Baker J.** 1996. Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory.
- Alemán-Nava G.S, Casiano-Flores V.H, Cárdenas-Chávez D.L, Díaz-Chávez R, Scarlat N, Mahlkecht J, Dallemund J.F, Parra R.** 2014. Renewable energy research progress in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (32) 140–153.
- Almeida J. R. M, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund F.** 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*(82) 340–349.
- Alvira P, Tomás-Pejó M, Ballesteros M, Negro M.J.** 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review *Bioresour Technol* (101) 4851-4861.
- APHA.** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington DC, USA: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Arreola-Vargas J, Celis L. B, Buitrón G, Razo-Flores E, Alatraste-Mondragón F.** 2013. Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: performance and microbial population analysis. *Int J Hydrogen Energy* (38) 13884-13894.
- Arreola-Vargas J.** 2014. Biohydrogen production from lignocellulosic biomass hydrolysates: Evaluation on batch, semi-continuous and continuous systems. Tesis de doctorado. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, A.C. SLP, México.
- Arreola-Vargas J, Ojeda-Castillo V, Snell-Castro R, Corona-González R.I, Alatraste-Mondragón F, Méndez-Acosta H.O.** 2015a. Methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresour Technol* (181) 191–199.
- Arreola-Vargas J, Razo-Flores E, Celis L. B, Alatraste-Mondragón F.** 2015b. Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: Role of hydrolysates constituents. *Int J Hydrogen Energy* (40) 10756-10765.
- Arrizon J, Morel S, Gschaedler A, Monsanb P.** 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chem* (122) 123–130.
- Barakat A, Monlau F, Steyer J.P, Carrere H.** 2012. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour Technol* (104) 90–99.
- Bautista-Justo M, García-Oropeza L, Salcedo-Hernández R, Parra-Negrete L.A.** 2001. Azúcares en agaves (*agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta universitaria* (11) (1) 33-38.
- Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S.** 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (36) 91–106.

- Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J.** 2007. Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* (97) 287-296.
- Bidlack J, Malone M, Benson R.** 1992. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proc. Okla. Acad. Sci* (72) 51-56.
- Bradford M.M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* (72) 248-254.
- Canché-Escamilla G, Quintal-Heredia I, Duarte-Aranda S.** 2014. Mechanical properties of “wood plastic composite” from polyolefins and agave bagasse fibers. *Sustainable and Integral Exploitation of Agave 2014*.
- Cardona C.A, Quintero J. A, Paz I. C.** 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour Technol* (101) 4754–4766.
- 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. *Int J Hydrogen Energy* (37) 5591-5601.
- Caspeta L, Caro-Bermúdez M. A, Ponce-Noyola T, Martínez A.** 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy* (113) 277–286.
- Cedeño C.M, Alvarez-Jacobs J.** 2003 Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. *Tequila Herradura, S.A. de C.V. Ex-Hda San Jose del Refugio, Amatitán, Jalisco, México*.
- Chandel A. K, Kapoor R. K, Singh A, Kuhad R. C.** 2007. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour Technol* (98) 1947–1950.
- Chang A.C.C, Tu Y.H, Huang M.H, Lay C.H, Lin C.Y.** 2011. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolysed rice straw hydrolysate. *Int J Hydrogen Energy* (36) 14280-14288.
- Chen K, Lyu H, Hao S, Luo G, Zhang S, Chen J.** 2015. Separation of phenolic compounds with modified adsorption resin from aqueous phase products of hydrothermal liquefaction of rice straw. *Bioresour Technol* (182) 160–168.
- Chen W, Zhong L, Peng X, Wang K, Chen Z, Sun R.** 2014. Xylan-type hemicellulose supported palladium nanoparticles: a highly efficient and reusable catalyst for the carbon–carbon coupling reactions. *Catal Sci Technol* (4) 1426-1435.
- Cheng C.L, Lo Y.C, Lee K.S, Lee D.J, Lin C.Y, Chang J.S.** 2011. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresour Technol* (102) 8514-8523.
- Cheng C.L, Chang J. S.** 2011. Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas sp.* CL3 for fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol* (102) 8628–8634.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT).** 2012. Estadísticas oficiales de producción de tequila y consumo de agave del año 2011. <http://www.crt.org.mx>. (Consultado junio, 2015).
- Contreras-Dávila C.A.** 2015. “Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de Agave tequilana Weber”. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, A.C. SLP, México.
- Crespo-Gonzalez M.R, Gonzalez-Eguiarte D. R, Rodríguez-Macías R, Rendon-Salcido L. A, del Real-Laborde I, Torres-Morán J.P.** 2013. Evaluación de la composta de bagazo de agave como componente de sustratos para producir plántulas de agave azul tequilero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (4) (8) 1161-1173.

- Das D, Veziroglu T. N, Khanna N.** 2008. Recent developments in biological hydrogen production processes. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* (14) 57–67.
- Davila-Vazquez G, Alatraste-Mondragón F, de León Rodríguez A, Razo-Flores E.** 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. *Int J Hydrogen Energy* (33) 4989–4997.
- Deguchi S, Tsujii B, Horikoshi K.** 2008. Crystalline-to-amorphous transformation of cellulose in hot and compressed water and its implications for hydrothermal conversion. *Green Chem* (10) 191–196.
- De Mancilha, I.M., Karim, M.N.** 2003. Evaluation of ion-exchange resins for removal of inhibitory compounds from corn stover hydrolyzate for xylitol fermentation. *Biotechnology. Prog* (19) 1837–1841.
- De Vrije T, De Haas G.G., Tan G.B, Keijsers E.R.P, Claassen P.A.M.** 2002. Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *Int J Hydrogen Energy* (27) 1381–1390.
- 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 *Anal Chem* (28) 350-356.
- Duff S.J.B, Murray W.D.** 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol* (55) 1-33
- Esau K.** 1985. *Anatomía Vegetal*. 3ra edición. Ediciones OMEGA, S.A., Barcelona.
- Fang H.H.P, Li C, Zhang T.** 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy* (31) 683 – 692.
- Flamm G, Glinsmann W, Kritchevsky D, Prosky L, Roberfroid M.** 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition* (41) (5) 353-362.
- Finch A.S, Mackie T.D, Sund C.J, Summer J.J.** 2011. Metabolite analysis of *Clostridium acetobutylicum*: Fermentation in a microbial fuel cell. *Bioresour Technol* (102) 312-315.
- FitzPatrick M.A.** 2011. Characterization and processing of lignocellulosic biomass in ionic liquids. A thesis submitted to the Department of Chemical Engineering. Queen's University Kingston, Ontario, Canada.
- García-Peña E.I, Guerrero-Barajas C, Ramírez D, Arriaga-Hurtado L. G.** 2009. Semi-continuous biohydrogen production as an approach to generate electricity *Bioresour Technol* (100) 6369-6377.
- Gómez Tovar F.** 2008. Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, A.C. SLP, México.
- Gonzalez L. H.** 2013. Obtención de los nutraceuticos presentes en la piña del agave tequilero mediante dilución diferencial. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN-Michoacán.
- Guo X. M, Trably E, Latrille E, Carrere H, Steyer J. P.** 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int J Hydrogen Energy* (35) 10660-10673.
- Hatano K. I, Aoyagi N, Miyakawa T, Tanokura M, Kubota K.** 2013. Evaluation of nonionic adsorbent resins for removal of inhibitory compounds from corncob hydrolysate for ethanol fermentation. *Bioresour Technol* (149) 541–545.

- Howard R.L., Abotsi E, Jansen van Rensburg, Howard S.** 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol* (2) (12) 602-619
- Ilarslan H, Palmer R. G, Horner H. T.** 2001. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Annals of Botany* (88) 243–257.
- Infante D, Gonzalez del Campo A, Villaseñor J, Fernández F. J.** 2012. Kinetic model and study of the influence of pH, temperature and undissociated acids on acidogenic fermentation. *Biochemical Engineering Journal* (66) 66–72.
- Iñiguez G, Acosta N, Martínez L, Parra J, González O.** 2005. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Rev. Int. Contam. Ambient* (21) 37-50.
- Ishii T.** 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* (127) 111-127.
- Jönsson L. J, Alriksson B, Nilvebrant N. O.** 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. I. *Biotechnology for Biofuels* (6) (16) 1-10.
- Kalogirou S.** 2004. Solar thermal collectors and applications. *Progress in Energy Combust Science* (30) 231-295.
- Kestur S, Flores-Sahagun T. H.S, Pereira L, Dos Santos J, Mazzaro I, Mikowski A.** 2013. Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites: Part A* (45) 153–161.
- Keys J.E, Van Soest P.J, Young E.P.** 1969. Comparative study of the digestibility of forage cellulose and hemicellulose ruminants and nonruminants. *J Anim Sci* (29) 11-15.
- Kumar P, Barrett D. M, Delwiche M. J, Stroeve P.** 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res* (48) 3713–3729.
- Kumar G, Bakonyi P, Periyasamy S, Kima S.H, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K.** 2015. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (44) 728–737.
- Kyung-Won J, Dong-Hoon K, Sang-Hyoun K, Hang-Sik S.** 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol* (102) 8612–8620.
- Lamas R, Sandoval G. C, Osuna A. A, Prado R, Gschaedler A. C.** 2004. Cocimiento y Molienda. In A. C. Gschaedler Mathis (Ed.), *Ciencia y Tecnología del Tequila* (pp. 41–60). Guadalajara: CIATEJ.
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N., Jonsson, L.J.** 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol* (77-99) 91-103.
- Lee H. S, Rittmann B.E.** 2009. Evaluation of Metabolism Using Stoichiometry in Fermentative Biohydrogen. *Biotechnol Bioeng* (102) 749–758.
- Leung D. W. M, Thorpe T. A.** 1984. Interference by edta and calcium ions of the 3,5-dinitrosalicylate reducing sugar assay. *Phytochemistry* (23) 2949–2950.
- Liu C.H, Chang C.Y, Cheng C.L, Lee D.J, Chang J.S.** 2012. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. *Int J Hydrogen Energy* (37)15458–64.
- Liu Q, Chen W, Zhang X, Yu L, Zhou J, Xu Y, Qian G.** 2015. Phosphate enhancing fermentative hydrogen production from substrate with municipal solid waste composting leachate as a nutrient. *Bioresour Technol* (190) 431–437.
- Lo Y. C, Su Y-C, Cheng C. L, Chang J. S.** 2011. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. *Int J Hydrogen Energy* 2011; 36:13955-13963.

- Lopez M.G, Mancilla-Margalli N.A, Mendoza-Diaz G.** 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J Agric Food Chem* (51) 7835-7840.
- Lowry O. H, Rosebrough N. J, Farr A. L, Randall R. J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (75) 265-275.
- Mancilla-Margalli N, López M.** 2002. Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *J Agric Food Chem* (50) 806–812.
- Martinez A, Rodriguez M. E, Wells M. L, York S. W, Preston J. F, Ingram L. O.** 2001. Detoxification of Dilute Acid Hydrolysates of Lignocellulose with Lime. *Biotechnology. Prog* (17) 287-293.
- Mateo S., Roberto I.C., Sanchez S., Moya A. J.** 2013. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Industrial Crops and Products* (49) 196–203.
- McCann M. C, Wells B, Roberts K.** 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell Wall. *Journal of Cell Science* (96) 323-334.
- McMillan, J.D.** 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: ACS symposium series: ACS Publications 292-324.
- Miller, G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* (31) 426-428.
- Mitchell V. D, Taylor C.M, Bauer S.** 2014. Comprehensive Analysis of Monomeric Phenolics in Dilute Acid Plant Hydrolysates. *Bioenerg. Res* (7) 654–669.
- Monlau F, Sambusiti C, Barakat A, Quéméneur M, Trably E, Steyer J.P, Carrère H.** 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances* (32) 934–951.
- Moran-Salazar R, Marino-Marmolejo E. N, Rodriguez-Campos J, Davila-Vazquez G, Contreras-Ramos S.** 2015. Use of agave bagasse for production of an organic fertilizer by pretreatment with *Bjerkandera adusta* and vermicomposting with *Eisenia fetida*. *Environmental Technology*. DOI: 10.1080/09593330.2015.1108368.
- Mussatto S. I, Roberto C.** 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour Technol* (93) 1–10.
- Narvaez Z.J, Sanchez T.F.** 2009. Agaves as a raw material, recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnol* (3) (3) 1-7.
- Nath, K, D. Das.** 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* (65) 520-529.
- Nieves R. A, Ehrman C. I, Adney W. S, Elander R. T, Himmel M. E.** 1998. Technical Communication: Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (14) 301-304.
- Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H.** 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1  $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc* (124) 9074-9082.
- Nilvebrant N. O, Reimann A, Larsson S, Jönsson L. J.** 2001. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates with Ion-Exchange Resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (91–93) 35-49.
- Nissilä M. E, Lay C. H, Puhakka L. A.** 2014. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates -A review. *Biomass and Bioenergy* (67) 145-159.
- Nobel, P. S.** 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, New York.

- Oh, Y.K., S.M. Raj, G.Y. Jung, S. Park.** 2011. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresour Technol* (102) 8357-8367.
- Orozco R. L, Redwood M. D, Leeke G. A, Bahari A, Santos R. C. D, Macaskie L. E.** 2012. Hydrothermal hydrolysis of starch with CO<sub>2</sub> and detoxification of the hydrolysates with activated carbon for bio-hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy* (37) 6545-6553.
- Park S, Baker J. O., Himmel M. E., Parilla P. A., Johnson D. K.** 2010. Cellulose Crystallinity Index: Measurement Techniques and their Impact on Interpreting Cellulase Performance. *Biotechnology for Biofuels* (3) 1-10.
- Perez-Pimienta J.A, Lopez-Ortega M. G, Varanasi P, Stavila V, Cheng G, Singh S, Simmons B.A.** 2013. Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Bioresour Technol* (127) 18–24.
- Perez-Pimienta J. A, Lopez-Ortega M. G, Chavez-Carvayar J. A, Varanasi P, Stavila V, Cheng G, Singh S, Simmons B. A.** 2015. Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *Biomass and Bioenergy* (75) 180-88.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A.** 2002. *Microbiology*, fifth ed. McGraw-Hill, Boston.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G.** 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Review* (3) 29–60.
- Quéméneur M, Hamelin J, Benomar S, Guidici-Ortoni MT, Latrille E, Steyer JP, Trably E.** 2011. Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-culture dark fermentation of mono-, di- and tri-saccharides. *Int J Hydrogen Energy* (33) 11654-11665.
- Quéméneur M, Hamelin J, Barakat A, Steyer J.P, Carrère H, Trably E.** 2012. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* (37) 3150-3159.
- Ramírez-Cortina C. R, Alonso-Gutiérrez M. S, Rigal L.** 2012. Tratamiento alcalino de los residuos agroindustriales de la producción del tequila, para su uso como complemento de alimento de rumiantes. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica* (5) (2) 69-72.
- Ren N, Wang A, Cao G, Xu J, Gao L.** 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* (27) 1051–1060.
- Rios M, Kaltschmitt M.** 2013. Bioenergy potential in Mexico—status and perspectives on a high spatial distribution. *Biomass Conv. Bioref* (3) 239–254.
- Rodríguez-Macías., R., S. Pascoe, N.F. Zamora, J. Álvarez de la Cuadra, E. Salcedo Pérez.** 2001. Evaluación de sustratos vegetales elaborados a partir de residuos de la industria tequilera. *Memorias del I Congreso Nacional de Agricultura Sustentable*. Veracruz, México 257-259.
- Sainio T, Turku I, Heinonen J.** 2011. Adsorptive removal of fermentation inhibitors from concentrated acid hydrolyzates of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* (102) 6048–6057.
- Sandhu A. K, Gu L.** 2013. Adsorption/Desorption Characteristics and Separation of Anthocyanins from Muscadine (*Vitis rotundifolia*) Juice Pomace by Use of Macroporous Adsorbent Resins. *J Agric Food Chem* (61) 1441–1448.
- Saucedo-Luna, J, Castro-Montoya A. J, Martínez-Pacheco M, Campos-García J.** 2010. Diseño de un bioproceso para la obtención de etanol anhidro a partir de bagazo del *Agave tequilana* Weber. *Ciencia Nicolaita No. Especial* 2010.
- Scheller H.V. y Ulvskov P.** 2010. Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology* (61) 263-289.

- Schwartz, T.J., Lawoko, M.** 2010. Removal of acid-soluble lignin from biomass extracts using Amberlite XAD-4 resin. *BioResources* (5) (4) 2337–2347.
- Singleton V. L, Orthofer R, Lamuela-Raventós R. M.** 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology* (299) 152-178.
- Siqueira M. R, Reginatto V.** 2015. Inhibition of fermentative H<sub>2</sub> production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. *Renewable Energy* (80) 109-116.
- Smith H.** 1977. *The Molecular Biology of Plant Cells*. Botanical Monographs. University of California Press (14) 7-8.
- Tauer A, Elss S, Frischmann M, Tellez P, Pischetsrieder M.** 2004. Influence of Thermally Processed Carbohydrate/Amino Acid Mixtures on the Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* (52) 2042-2046.
- Timell T.E.** 1964. The acid hydrolysis of glycosides. I General conditions and the effect of the nature of the aglycone. *Canadian Journal of Chemistry* (42) 1456-1472.
- Van Ginkel S, Logan B. E.** 2005. Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. *Environ. Sci. Technol* (39) 9351-9356.
- Várnai A, Viikari L, Marjamaa K, Siika-aho M.** 2011. Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. *Bioresour Technol* (102) 1220-1227.
- Vasconcelos de Sá L. R, Cammarota M. C, Corrêa de Oliveira T, Morais Oliveira E. M, Matos A, Ferreira-Leitao V. S.** 2013. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *Int J Hydrogen Energy* (38) 2986-2997.
- Weil J. R., Dien B., Bothast R., Hendrickson R., Mosier N. S., Ladisch M.R.** 2002. Removal of Fermentation Inhibitors Formed during Pretreatment of Biomass by Polymeric Adsorbents. *Ind. Eng. Chem. Res* (41) 6132-6138.
- Wu S. Y, Lin C. Y, Lee K. S, Hung C. H, Chang J. S, Lin P. J, Chang F. Y.** 2008. Dark Fermentative Hydrogen Production from Xylose in Different Bioreactors Using Sewage Sludge Microflora. *Energy & Fuels*. DOI: 10.1021/ef700286s.
- Wu S. Y, Chu C. Y, Shen Y. C.** 2012. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. *Int J Hydrogen Energy* (37) 15496 -15502.
- Xu J, Chen H.** 2009. Coupling Recovery Strategy of Cellulase in Hydrolyzate after Hydrolysis with Tannin Flocculation and PEG Desorption. *Applied Biochemistry and Microbiology* (45) (3) 344-347.
- Yang B, Dai Z, Ding S. Y, Wyman C. E.** 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* (2) (4) 421–450.
- Yoshida M, Liu Y, Uchida S, Kawarada K, Ukagami Y, Ichinose H, Kaneko S, Fukuda K.** 2008. Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to Monosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem* (72) (3) 805–810.
- Zhong R, Ye Z.H.** 2007. Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* (10) 564–572.
- Zwietering M. H, Jongenburger I, Rombouts F. M, and Van't Riet K.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* (56) (6) 1875-1881.

## Anexo 1

Resultados de los ensayos evaluados en diferentes condiciones para la hidrólisis enzimática.

---

Ensayo	Temperatura (°C)	pH	Sustrato (g/L)	Enzima (mg proteína/mL)	Concentración de AR (mg AR/mL)	Velocidad de producción de AR (mg AR/mL-h)	Rendimiento (mg AR/g Sustrato)
1	50	4	40	0.3	1.15	0.010	28.75
2	50	5	40	0.3	2.85	0.029	71.25
3	50	6	40	0.3	1.46	0.036	36.5
4	50	5	0	0.3	0	0	0
5	50	5	40	0.3	3.24	0.027	81
6	45	4.5	20	0.1	1.14	0.005	57
7	55	5.5	60	0.1	4.48	0.032	74.66
8	55	4.5	60	0.1	3.33	0.039	55.5
9	45	5.5	20	0.5	2.79	0.078	139.5
10	45	4.5	20	0.5	2.11	0.006	105.5
11	50	5	40	0.7	3.59	0.081	89.75
12	50	5	40	0	0	0	0
13	55	4.5	20	0.1	1.21	0.013	60.5
14	50	5	80	0.3	6.89	0.060	86.12
15	50	5	40	0.3	3.58	0.022	89.5
16	45	5.5	20	0.1	2.19	0.017	109.5
17	45	4.5	60	0.5	5.44	0.016	90.66
18	55	5.5	20	0.5	1.57	0.040	78.5
19	55	4.5	20	0.5	2.01	0.005	100.5
20	55	5.5	60	0.5	4.61	0.018	76.83
21	55	5.5	20	0.1	1.51	0.030	75.5
22	45	5.5	60	0.1	4.97	0.012	82.83
23	45	5.5	60	0.5	7.13	0.024	118.83
24	40	5	40	0.3	4.1	0.013	102.5
25	50	5	40	0.3	3.91	0.021	97.75
26	55	4.5	60	0.5	4.43	0.013	73.83
27	45	4.5	60	0.1	3.99	0.009	66.5
28	60	5	40	0.3	2.66	0.024	66.5

---

## Anexo 2a

ANOVA generado para la variable de respuesta de velocidad de producción de AR (mg AR/mL-h).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0.0000881667	1	0.0000881667	0.30	0.5919
B:pH	0.00160067	1	0.00160067	5.49	0.0357
C:Sustrato	0.000322667	1	0.000322667	1.11	0.3121
D:Enzima	0.00125706	1	0.00125706	4.31	0.0583
AA	0.000119048	1	0.000119048	0.41	0.5341
AB	0.00013225	1	0.00013225	0.45	0.5126
AC	0.00021025	1	0.00021025	0.72	0.4113
AD	0.00087025	1	0.00087025	2.98	0.1078
BB	0.0000284234	1	0.0000284234	0.10	0.7599
BC	0.00099225	1	0.00099225	3.40	0.0881
BD	0.00055225	1	0.00055225	1.89	0.1921
CC	0.0000112088	1	0.0000112088	0.04	0.8476
CD	0.00046225	1	0.00046225	1.58	0.2303
DD	0.000459033	1	0.000459033	1.57	0.2318
Error total	0.00379328	13	0.000291791		
Total (corr.)	0.0114681	27			

R-cuadrada = 66.9232 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 31.302 por ciento

Error estándar del est. = 0.0170819

Error absoluto medio = 0.00904615

Estadístico Durbin-Watson = 2.27303 (P=0.8021)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.208751

## Anexo 2b

ANOVA generado para la variable de respuesta de la concentración de AR (mg AR/mL).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	3.7525	1	3.7525	5.58	0.0344
B:pH	1.60684	1	1.60684	2.39	0.1461
C:Sustrato	59.0007	1	59.0007	87.76	0.0000
D:Enzima	8.15767	1	8.15767	12.13	0.0040
AA	0.803476	1	0.803476	1.20	0.2941
AB	0.644006	1	0.644006	0.96	0.3456
AC	0.472656	1	0.472656	0.70	0.4169
AD	0.596756	1	0.596756	0.89	0.3633
BB	2.81042	1	2.81042	4.18	0.0617
BC	0.363006	1	0.363006	0.54	0.4755
BD	0.117306	1	0.117306	0.17	0.6830
CC	0.954454	1	0.954454	1.42	0.2548
CD	0.363006	1	0.363006	0.54	0.4755
DD	0.66928	1	0.66928	1.00	0.3366
Error total	8.73984	13	0.672296		
Total (corr.)	89.8578	27			

R-cuadrada = 90.2737 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 79.7992 por ciento

Error estándar del est. = 0.819936

Error absoluto medio = 0.416633

Estadístico Durbin-Watson = 1.93089 (P=0.3034)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.0285251

## Anexo 2c

ANOVA generado para la variable de respuesta del rendimiento (mg AR/g sustrato).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	2531.76	1	2531.76	2.51	0.1369
B:pH	1088.91	1	1088.91	1.08	0.3174
C:Sustrato	303.739	1	303.739	0.30	0.5922
D:Enzima	5262.92	1	5262.92	5.23	0.0397
AA	1125.01	1	1125.01	1.12	0.3098
AB	838.682	1	838.682	0.83	0.3781
AC	21.3906	1	21.3906	0.02	0.8864
AD	353.064	1	353.064	0.35	0.5639
BB	947.332	1	947.332	0.94	0.3498
BC	10.3041	1	10.3041	0.01	0.9210
BD	223.652	1	223.652	0.22	0.6453
CC	318.279	1	318.279	0.32	0.5836
CD	104.244	1	104.244	0.10	0.7528
DD	46.3848	1	46.3848	0.05	0.8334
Error total	13092.0	13	1007.08		
Total (corr.)	26972.7	27			

R-cuadrada = 51.4621 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0.0 por ciento

Error estándar del est. = 31.7345

Error absoluto medio = 17.0272

Estadístico Durbin-Watson = 2.14989 (P=0.5978)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.202788

## Anexo 3a

Determinación de las concentraciones de DQO, azúcares totales (AT) y fenoles totales (FT) presentes en la primera agua de lavado de BAT después del tratamiento con la resina de adsorción AMBERLITE™ FPX66.

$$\frac{540.5 \text{ mg DQO}}{L} - \frac{57250 \frac{\text{mg FT}}{L} (0.03L)}{8L} = 325.82 \frac{\text{mg DQO}}{L}$$

$$\frac{331.39 \text{ mg AT}}{L} - \frac{15800 \frac{\text{mg FT}}{L} (0.03L)}{8L} = 272.14 \frac{\text{mg AT}}{L}$$

$$\frac{130 \text{ mg FT}}{L} - \frac{4960 \frac{\text{mg FT}}{L} (0.03L)}{8L} = 111.4 \frac{\text{mg FT}}{L}$$

## Anexo 3b

Cálculo de remoción de fenoles totales (FT) en la primera agua de lavado (a) y en el hidrolizado enzimático (b) adsorbidos durante el tratamiento con la resina de adsorción.

$$\frac{\left( \frac{\text{mg FT}}{L \text{ del concentrado}} \right) (\text{volumen del concentrado}(L))}{\text{Volumen de hidrolizados tratados por la resina de adsorción}(L)} = \frac{\text{mg FT}}{L \text{ de hidrolizado tratado}}$$

$$(a) \frac{4960 \frac{\text{mg FT}}{L} (0.03L)}{8L} = 18.6 \frac{\text{mg FT}}{L}$$

$$(b) \frac{1576.3 \frac{\text{mg FT}}{L} (0.06L)}{3.5L} = 27.02 \frac{\text{mg FT}}{L}$$