



IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Deslignificación y sacarificación con mezclas
enzimáticas del bagazo de *Agave tequilana* Weber
para la producción de hidrógeno y metano”**

Tesis que presenta

Karen Lizeth Galindo Hernández

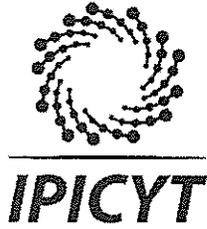
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosí, S.L.P. Septiembre de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de hidrógeno y metano***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Karen Lizeth Galindo Hernández** y aprobada el **quince de septiembre de dos mil diecisiete** 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. Elías Razo Flores
Director de la tesis

Dr. Felipe Alatraste Mondragón
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Jorge Arreola Vargas
Miembro del Comité Tutorial

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Miembro del Comité Tutorial

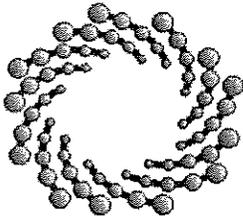


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-692654)

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética, CEMIE-Bio, Clúster Biocombustibles Gaseosos 247006



IPICYT

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 045 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 15 días del mes de septiembre del año 2017, se reunió a las 12:05 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatríste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT
Dr. Jorge Arreola Vargas	Sinodal externo	UTJ

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

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Karen Lizeth Galindo Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Designificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de hidrógeno y metano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Elías Razo Flores

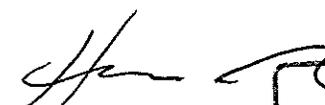
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:15 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 15 días del mes de septiembre de 2017.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicado con todo mi amor y admiración a mis padres, por brindarme su amor y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida y en especial durante esta etapa. Gracias por ser mi luz y los pilares de mi vida.

A mis hermanas, por ser mi motor y motivación para alcanzar todas mis metas. Gracias por su amor incondicional e iluminarme con sus sonrisas y abrazos.

A mi familia, especialmente a mi abuela Guadalupe, por cuidarme y brindarme su cariño desde la distancia, gracias por todo.

A Rodolfo, gracias por tu amistad sincera e invaluable, por tu apoyo en los momentos difíciles, por todos los conocimientos y proyectos que compartiste conmigo.

A Irma, gracias por tu valiosa amistad, por apoyarme siempre y brindarme tus conocimientos.

A Gaby y Kelly, gracias por brindarme su apoyo y amistad inigualable, por acompañarme a lo largo de esta etapa en los momentos buenos y malos.

Agradecimientos

Al Dr. Elías Razo Flores por abrirme las puertas en su grupo de investigación, por compartirme sus conocimientos y experiencias reflejados en este trabajo. Por brindarme su confianza, apoyo, consejos, paciencia y orientación durante esta etapa. Sin duda contribuyó en gran medida a mi crecimiento personal y profesional.

Al Dr. Felipe Alatraste Mondragón por brindarme sus conocimientos y orientarme en todo momento durante la realización de este trabajo. Gracias por su paciencia y confianza brindadas.

A la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García por todo su apoyo, tanto personal como profesional, y por todo el conocimiento y motivación brindados durante esta etapa.

Al Dr. Jorge Arreola Vargas, por sus comentarios acertados durante la realización de este trabajo, que sin duda lo enriquecieron en gran medida.

Al Dr. Luis Arellano, por su motivación y apoyo oportunos al inicio de esta etapa.

Al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, a la M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz, a la M. en C. Alejandra Colunga Álvarez, al Lic. Mario Delgado Cardozo, a la QFB. Elizabeth Cortés Cedillo, por su gran ayuda y apoyo técnico.

A la I.Q. María del Carmen Rocha Medina y a la I.Q. María Guadalupe Ortega Salazar por su disponibilidad y ayuda durante el análisis de muestras en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA).

A María Guadalupe Arriaga Castillo, por todo su apoyo administrativo y por su amistad.

A mis compañeros y amigos de generación, especialmente a Hugo, Andy, Ricardo, Augusto, Francisco, Javier y Antonio por siempre brindarme su apoyo y motivarme en los momentos oportunos durante esta etapa.

A mis compañeros del grupo de investigación, por los buenos momentos y por tantas enseñanzas, gracias por su cariño y apoyo brindados.

A mis amigos de la DCA y de Biología Molecular, Carlos Contreras, Ernesto Mascot, Víctor Hugo, Edgardo, Nohemí, Erika, Carlos Flores, Tonatíuh, Ana Karen, Ángel, Cecy, Víctor, Marco, Joel, Gaby y Kelly; gracias por su gran apoyo, las aventuras y los excelentes momentos que compartimos.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Tabla de contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bioenergía y biocombustibles	2
1.2 Producción de hidrógeno y metano	3
1.3 Materia prima	5
1.4 Pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino	7
1.5 Hidrólisis enzimática	9
1.6 Sinergismo y antagonismo enzimático	11
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
2.1 Hipótesis	12
2.2 Objetivo general	13
2.3 Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Biomasa lignocelulósica	14
3.2 Materiales	14
3.2.1 Solución de peróxido de hidrógeno alcalino al 2%	14
3.2.2 Enzimas y buffer	14
3.2.3 Inóculo y medios minerales	15
3.3 Estrategia experimental: deslignificación, sacarificación y producción de biocombustibles	16
3.4 Etapa 1: pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino	17
3.5 Etapa 2: hidrólisis enzimática	17
3.5.1 Hidrólisis individual con celulasa	18

3.5.2 Hidrólisis individual con hemicelulasa	18
3.5.3 Hidrólisis con mezcla enzimática	19
3.5.4 Hidrólisis secuencial (celulasa → hemicelulasa)	21
3.5.5 Hidrólisis secuencial (hemicelulasa → celulasa)	21
3.5.6 Hidrólisis en reactor	21
3.6 Etapa 3: Cinéticas de producción de hidrógeno y metano en lote	21
3.7 Métodos analíticos	22
3.7.1 Demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos volátiles, sólidos suspendidos totales, sólidos totales volátiles, sólidos totales, azúcares totales	22
3.7.2 Ácidos grasos volátiles	22
3.7.3 Análisis de la composición del gas	23
3.7.4 Carbono orgánico total	23
3.7.5 Análisis termogravimétrico	23
3.7.6 Determinación de compuestos inhibitorios	23
3.8 Criterios de evaluación para cada etapa	24
3.8.1 Etapa 1: Pretratamiento	24
3.8.2 Etapa 2: Hidrólisis enzimática	24
3.8.3 Etapa 3: Producción de hidrógeno y metano en lote	24
 CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 26
4.1 Efecto del tiempo de reacción del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino en el bagazo de <i>A. tequilana</i>	26
4.2 Efecto del uso de mezclas enzimáticas e hidrólisis secuenciales en la sacarificación del bagazo de <i>A. tequilana</i> pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino	33
4.2.1 Evaluación de las mejores condiciones para la hidrólisis con mezcla	34
4.2.2 Tratamientos enzimáticos	37
4.2.3 Hidrólisis enzimática en reactor	40
4.3 Pruebas de producción de hidrógeno en lote	42
4.4 Pruebas de producción de metano en lote	45
 CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	 48
5.1 Conclusiones	48
5.2 Perspectivas	49
 REFERENCIAS	 50
 Anexo 1	 56
Anexo 2	56
Anexo 3	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Producción de hidrógeno y metano a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de <i>Agave tequilana</i> .	5
Tabla 1.2 Porcentajes de deslignificación y recuperación de holocelulosa obtenidos con diversos pretratamientos alcalinos en diferentes sustratos lignocelulósicos.	8
Tabla 1.3 Rendimientos de azúcares obtenidos en procesos de hidrólisis enzimática reportados en la literatura.	10
Tabla 3.1 Composición del medio mineral anaerobio utilizado en los ensayos de producción de metano en lote.	15
Tabla 3.2 Factores y niveles experimentales evaluados en el diseño factorial Plackett-Burman durante la determinación de las condiciones de hidrólisis enzimática con actividad celulasa y hemicelulasa.	19
Tabla 3.3 Factores y niveles experimentales evaluados en el diseño central compuesto durante la determinación de las mejores condiciones de hidrólisis con la mezcla de enzimas.	20
Tabla 3.4. Ecuaciones utilizadas para la evaluación de la etapa de hidrólisis enzimática.	24
Tabla 3.5 Ecuaciones utilizadas para la evaluación de los parámetros cinéticos de la etapa de producción de hidrógeno y metano.	25
Tabla 4.1 Porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina obtenidos en el bagazo de <i>A. tequilana</i> sin pretratamiento y después del pretratamiento a 1.5 y 6 h.	30
Tabla 4.2 Resultados obtenidos de la determinación de carbono orgánico total en las muestras de bagazo con y sin pretratamiento, y de los residuos líquidos generados en el pretratamiento a 1.5 y 6 h.	31
Tabla 4.3 Concentración de azúcares totales y demanda química de oxígeno en las hidrólisis con enzimas individuales	34

Tabla 4.4 Condiciones que predicen los máximos valores de azúcares totales y rendimiento para la hidrólisis enzimática arrojadas por el diseño central compuesto, evaluado en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II.	37
Tabla 4.5 Condiciones de hidrólisis seleccionadas para la mezcla de enzimas a partir de los ensayos arrojados por el diseño central compuesto.	37
Tabla 4.6 Rendimientos, porcentajes de sacarificación y productividades obtenidos en cada tratamiento de hidrólisis enzimática evaluado durante la etapa 2.	39
Tabla 4.7 Comparación de los porcentajes de deslignificación y productividades de bagazo de agave reportadas en la literatura.	40
Tabla 4.8 Condiciones utilizadas durante la hidrólisis con mezclas enzimáticas.	41
Tabla 4.9. Composición del hidrolizado enzimático producido en el reactor en lote.	42
Tabla 4.10 Parámetros cinéticos calculados mediante la ecuación de Gompertz para los ensayos de producción de hidrógeno a partir del hidrolizado obtenido del tratamiento con la mezcla de enzimas.	43
Tabla 4.11 Ácidos grasos volátiles producidos durante la cinética de producción hidrógeno en lote.	44
Tabla 4.12 Parámetros cinéticos calculados mediante la ecuación de Gompertz para los ensayos de producción de metano a partir de los hidrolizados obtenidos del tratamiento enzimático con mezcla de enzimas.	46
Tabla 4.13 Ácidos grasos producidos durante la cinética de metano en lote.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema general del proceso de digestión anaerobia	4
Figura 1.2 Mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno alcalino durante la deslignificación del bagazo de <i>A. tequilana</i> .	9
Figura 3.1 Estrategia experimental para la evaluación del efecto de deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de <i>A. tequilana</i> en la producción de hidrógeno y metano. ① Etapa 1: Pretratamiento con PHA, ② Etapa 2: Hidrólisis enzimática y ③ Etapa 3: Producción de H ₂ y CH ₄ en lote.	16
Figura 4.1 Termogramas obtenidos a partir del análisis termogravimétrico del estándar de celulosa microcristalina y el estándar de lignina.	27
Figura 4.2 Termogramas obtenidos de las muestras de bagazo de agave sin pretratamiento (A) y pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino a 1.5 h (B) y 6 h (C).	29
Figura 4.3 Balance de masa con base en los porcentajes de pérdida de peso obtenidos antes y después del pretratamiento del bagazo de <i>A. tequilana</i> con PHA durante 1.5 y 6 h determinados mediante termogravimetría y COT de las fracciones sólida y líquida obtenidas, respectivamente	32
Figura 4.4 Comparación de cambios físicos obtenidos en el bagazo de <i>A. tequilana</i> sin pretratamiento y pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino a 1.5 y 6 h.	33
Figura 4.5 Diagrama de Pareto obtenido mediante el diseño factorial de Plackett-Burman en el cual se representan los factores significativos a evaluarse en un diseño central compuesto.	34
Figura 4.6 Modelo de superficie de respuesta de la concentración de azúcares totales (g AT/L), variando la concentración de sustrato (g F1/L) y la concentración de enzima Celluclast 1.5L (mg proteína/mL buffer), evaluados a una temperatura de 40 °C y pH 5.	35
Figura 4.7 Modelo de superficie de respuesta del rendimiento (mg AT/g F1), variando la concentración de sustrato (g F1/L) y la concentración de enzima	36

Celluclast 1.5L (mg proteína/mL buffer), evaluados a una temperatura de 40 °C y pH 5.

Figura 4.8 Concentraciones de azúcares totales y DQO_{sol} obtenidas en los tratamientos evaluados durante la etapa de hidrólisis enzimática. 38

Figura 4.9 Producción acumulada de hidrógeno en lote a partir del hidrolizado obtenido del tratamiento con la mezcla de enzimas: celulasa más hemicelulasa. 42

Figura 4.10 Balance de equivalentes de electrones generados durante la producción acumulada de hidrógeno en lote. 44

Figura 4.11 Producción acumulada de metano en lote a partir del hidrolizado obtenido del tratamiento con la mezcla de enzimas: celulasa más hemicelulasa. 45

Figura 4.12 Balance de equivalentes de electrones generados durante la producción acumulada de metano en lote. 47

Resumen

Deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de *Agave tequilana* Weber para la producción de hidrógeno y metano

Palabras clave: bagazo agave, lignina, hidrólisis enzimática, fermentación oscura, digestión anaerobia.

El bagazo de *A. tequilana* Weber es un sustrato potencial para la producción de hidrógeno y metano por su alto contenido de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa). Sin embargo, la presencia de la lignina y la estructura heterogénea de la hemicelulosa impiden que exista una disponibilidad adecuada de dichos polisacáridos. Por ello, es necesario aplicar un pretratamiento seguido de una hidrólisis enzimática con una mezcla de enzimas, que logren tanto la eliminación de la lignina como la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa. En el presente trabajo se evaluó la producción de hidrógeno y metano en lote a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave deslignificado con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) y sacarificado mediante procesos de hidrólisis secuenciales y una mezcla de enzimas (celulasas y hemicelulasas). Los resultados obtenidos del pretratamiento con PHA indicaron que es posible remover 97% de la lignina del bagazo de agave, y recuperar 88% de la celulosa y hemicelulosa. Además, durante la etapa de hidrólisis enzimática se demostró que al usar una mezcla de enzimas incrementa tanto el rendimiento de azúcares totales (AT) (292.1 ± 4.7 mg AT/g bagazo) como la productividad de sacarificación (24.3 ± 0.2 mg AT/g bagazo-h), a diferencia de los obtenidos en un proceso de hidrólisis empleando sólo celulasas (205 mg AT/g bagazo y 17 mg AT/g bagazo-h, respectivamente). El hidrolizado obtenido mejoró ligeramente el rendimiento molar de hidrógeno e incrementó 2.5 veces el rendimiento global de la producción de hidrógeno (123 L H₂/kg bagazo) respecto a lo obtenido con el tratamiento por celulasas. No obstante, en la producción de metano no se observó una mejora en el proceso, debido a que el rendimiento de producción fue bajo (0.08 ± 2 L CH₄/g DQO añadido) en comparación con el rendimiento teórico de metano (0.35 L CH₄/g DQO). En conclusión, en el presente trabajo se demostró que el uso de mezclas enzimáticas tiene un impacto positivo en los rendimientos y productividades de sacarificación, así como en la producción de hidrógeno.

Abstract

Delignification and saccharification with enzymatic blends of *Agave tequilana* Weber bagasse for the production of hydrogen and methane

Key words: agave bagasse, lignin, enzymatic hydrolysis, dark fermentation, anaerobic digestion.

Agave tequilana Weber bagasse is a potential substrate for hydrogen and methane production, due to its high content of polysaccharides (cellulose and hemicellulose). However, the presence of lignin and the heterogeneous structure of hemicellulose hinders the availability of such polysaccharides. For these reasons, it is necessary to apply a pretreatment followed by an enzymatic hydrolysis with a mixture of enzymes, achieving the elimination of lignin and the hydrolysis of hemicellulose and cellulose. The aim of the present work was to evaluate the batch production of hydrogen and methane from hydrolysates of delignified agave bagasse with alkaline hydrogen peroxide (AHP) and saccharified by a sequential hydrolysis process using a mixture of enzymes composed by cellulases and hemicellulases. The results obtained during the pretreatment with AHP indicated that it is possible to delignify the agave bagasse up to 97% and recover 88% of cellulose and hemicellulose. The results of the enzymatic hydrolysis stage revealed that using such a mixture of enzymes the yield of total sugars (TS) (292.1 ± 4.7 mg TS/g bagasse) and saccharification productivity (24.3 ± 0.2 mg TS/g bagasse-h) were increased, compared to that obtained with the treatment by cellulases (205 mg TS/g bagasse and 17 mg AT/g bagasse-h, respectively). The hydrolyzate obtained from the saccharification process with the enzymatic mixture slightly improved the hydrogen molar yield and increased the overall yield of hydrogen production (123 L H₂/kg bagasse) by 2.5 times compared to that obtained with the treatment by cellulases. However, there was no improvement in the methane production, because the production yields were low (0.08 ± 2 L CH₄/g COD added) compared to the theoretical methane yield (0.35 L CH₄/g COD). In conclusion, the present work showed that the use of enzymatic mixtures has a positive impact on the yields and productivities of saccharification, as well as on the production of hydrogen.

Capítulo 1. Introducción

La gran dependencia de combustibles fósiles para la producción de energía a nivel mundial, ha contribuido a la aparición de problemas ambientales como el calentamiento global, ocasionado principalmente por la emisión de gases de efecto invernadero. Asimismo, ha provocado la contaminación de suelos y mantos acuíferos causados por accidentes ocurridos durante la extracción, transporte o refinación de estos combustibles fósiles (Bundhoo *et al.* 2015; García-Bustamante & Masera-Cerutti, 2016). Lo anterior ha conllevado a considerar el desarrollo de fuentes de energía renovables, con las cuales se logre una transición energética en la que se sustituya el uso de combustibles fósiles y así minimizar los problemas ambientales mencionados anteriormente. Tal es el caso de la producción de biocombustibles gaseosos como el hidrógeno y el metano, a partir de biomasa, específicamente residuos lignocelulósicos.

El bagazo de agave es un residuo potencial para la producción de hidrógeno y metano, tanto por ser muy abundante en México como por tener un alto contenido en polisacáridos, como la celulosa y la hemicelulosa (Arreola-Vargas *et al.* 2016; Contreras-Dávila *et al.* 2017). Para poder usar esta biomasa en la producción biológica de hidrógeno y metano es necesario llevar a cabo un proceso de hidrólisis, en el que los polisacáridos sean convertidos a monosacáridos con el fin de obtener un sustrato más disponible para los microorganismos (Arreola-Vargas *et al.* 2015a; Contreras-Dávila *et al.* 2017; Velázquez-Valadez *et al.* 2016). Uno de los procesos de hidrólisis de amplio interés es la sacarificación enzimática, debido a que durante el proceso no se generan compuestos inhibitorios para la producción de hidrógeno y metano, a diferencia de otros tratamientos de sacarificación (Arreola-Vargas *et al.*, 2015; Velázquez-Valadez *et al.*, 2016). Sin embargo, uno de los principales problemas de este tratamiento es el bajo rendimiento de sacarificación que se obtiene (Velázquez-Valadez *et al.*, 2016). Esto debido a la estructura tan compleja que posee el bagazo de agave y a que en su composición se encuentran la lignina y la hemicelulosa, las cuales funcionan como barreras para el acceso de las enzimas por su carácter recalcitrante y su estructura heterogénea (Van Dyk & Pletschke,

2012). Para solucionar lo anterior, distintas investigaciones se han enfocado en establecer diversos trenes de tratamiento que logren hidrolizar una mayor cantidad de polisacáridos y con ello obtener mayores rendimientos de sacarificación (Arreola-Vargas *et al.* 2015a; Hernández-Salas *et al.* 2009; Pérez-Pimienta *et al.* 2017; Velázquez-Valadez *et al.* 2016). Es por ello que en el presente trabajo se propuso aplicar un pretratamiento al bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul con el cual se lleve a cabo la remoción de lignina y posteriormente aplicar un tratamiento enzimático que logre incrementar los rendimientos de sacarificación.

1.1. Bioenergía y biocombustibles

Existe una amplia gama de fuentes de energía alternativas tales como la energía eólica, solar, marítima, geotérmica y la bioenergía. La bioenergía es toda aquella energía producida a partir de biomasa y presenta importantes ventajas si es gestionada adecuadamente (García-Bustamante & Masera-Cerutti, 2016). Entre estas ventajas están la reducción significativa de las emisiones de gases de efecto invernadero y otros beneficios ambientales potenciales, oportunidades para el desarrollo económico y social en comunidades rurales y urbanas, solución a los problemas de eliminación o reducción de los residuos debido al uso de los mismos como sustrato para los procesos de producción de ese tipo de energía, una mayor contribución en el suministro de energía primaria global, entre otros (Howells *et al.* 2013; García-Bustamante & Masera-Cerutti, 2016). En este sentido, los biocombustibles son producidos a partir de biomasa, por lo cual representan una fuente de bioenergía importante (Carrillo-Reyes *et al.* 2014; Viikari *et al.* 2007).

El hidrógeno es un biocombustible gaseoso que destaca por su alto contenido energético por unidad de peso (122-142 kJ/g) (Argun & Kargi, 2011; Guo *et al.* 2010). Asimismo, cumple con las características de ser un combustible amigable con el ambiente ya que durante su combustión sólo se producen agua y calor como desechos. Además, puede ser utilizado directamente para producir electricidad mediante celdas de combustible, y para fines industriales, domésticos y de transporte (Buitrón *et al.* 2016; Davila-Vazquez *et al.* 2008).

Por otro lado, el biogás, compuesto por 55-74% (v/v) CH₄ y 25-45% (v/v) CO₂ (Weiland, 2010), también destaca por ser un biocombustible gaseoso que puede ser producido a partir de una gran variedad de sustratos orgánicos, tales como los residuos sólidos (p. ej., residuos agrícolas, domésticos, etc.), aguas residuales industriales y domésticas, entre otros (Buitrón *et al.* 2016). Además, una vez que ha sido refinado, puede ser utilizado para la generación de calor y electricidad o bien, como sustituto del gas natural y biocombustible para vehículos (Zhen *et al.* 2016).

1.2. Producción de hidrógeno y metano

El hidrógeno y el metano pueden ser generados mediante un proceso biológico llamado digestión anaerobia, el cual consta de 4 etapas principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 1.1). La primera etapa consiste en la acción de bacterias hidrolíticas, cuyas enzimas facilitan la hidrólisis de moléculas orgánicas complejas, tales como carbohidratos, proteínas y lípidos, liberando monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos grasos que sirven como fuente de carbono y energía para los microorganismos. En la segunda etapa, acidogénesis, se lleva a cabo la fermentación de estos productos monoméricos en productos finales como el acetato, formiato, metanol, H₂ y CO₂. En una tercera etapa, conocida como acetogénesis, ocurre la oxidación de los productos de la acidogénesis a acetato, hidrógeno y CO₂. Por último, en la metanogénesis, ocurre la formación de metano por medio de dos grupos de arqueas. Estas pueden ser metanógenas hidrogenotróficas, que llevan a cabo la producción de metano mediante la reducción de H₂ y CO₂, o metanógenas acetoclásticas, las cuales producen metano a partir de la descarboxilación del acetato (O'Flaherty *et al.* 2006).

Para el caso de la producción de H₂ se suprime la etapa de metanogénesis mediante la aplicación de diversos tipos de tratamientos al inóculo con el fin de evitar el consumo de H₂. A este proceso se le conoce como fermentación oscura (Davila-Vazquez *et al.* 2008).

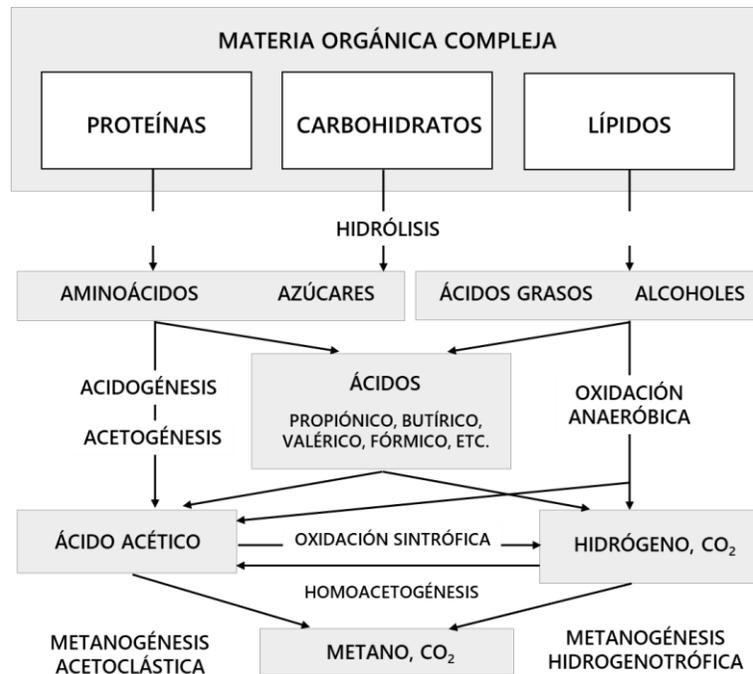


Figura 1.1 Esquema general del proceso de digestión anaerobia (Modificado de Cendales & Jiménez, 2014; Sun et al. 2014).

Actualmente, los sistemas reportados para la producción de hidrógeno y biogás a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *A. tequilana* han sido en sistemas en lote (Arreola-Vargas *et al.* 2015b; López-Gutiérrez, 2015; Abreu-Sherrer, 2013) y continuos, ya sea en tanques agitados (CSTR) o filtros percoladores (TBR) (Abreu-Sherrer, 2013; Contreras-Dávila *et al.* 2017). En la Tabla 1.1 se muestran los rendimientos molares y las velocidades volumétricas reportados, tanto para la producción de hidrógeno como para la de biogás. Cabe mencionar que los sustratos utilizados en estos sistemas, tanto en lote como en continuo, fueron hidrolizados que se obtuvieron con un tratamiento enzimático empleando un solo tipo de enzimas (celulasas). Con excepción del trabajo realizado por Abreu-Sherrer (2013), en el que se utilizaron dos tipos de actividades enzimáticas de manera individual: celulasas (Celluclast 1.5 L) y hemicelulasas (Viscozyme L).

Tabla 1.1 Producción de hidrógeno y metano a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana*.

Biocombustible	Sustrato	Sistema	Rendimiento	Velocidad volumétrica	Referencia
Hidrógeno	5 g AT/L	Lote	1.21 mol H ₂ /mol glucosa	79.5 mL H ₂ /L-h	López-Gutiérrez, 2015
Hidrógeno	4.1 g AT/L	Lote	1.31 mol H ₂ /mol glucosa	60 mL H ₂ /L-h	Abreu Sherrer, 2013
Hidrógeno	1.8-8.9 g AT/L	Lote	1.2-3.4 mol H ₂ /mol glucosa	72.5-100 mL H ₂ /L-h	Arreola-Vargas <i>et al.</i> 2016
Metano	8-40.1 g DQO/L	Lote Una etapa	0.02-0.09 L CH ₄ / g DQO	450-840 mL CH ₄ /L-d	
Hidrógeno	39.9-60.3 g DQO/L-d	Continuo CSTR	0.35-1.35 mol H ₂ /mol glucosa	33-105 mL H ₂ /L-h	Contreras-Dávila <i>et al.</i> 2017
	17.3-52.9 g DQO/L-d	Continuo TBR	0.34-1.53 mol H ₂ /mol glucosa	11-143 .mL H ₂ /L-h	
Hidrógeno	10.1-44.6 g DQO/L-d	Continuo CSTR	0.35-0.74 mol H ₂ /mol glucosa	2-72 mL H ₂ /L-h	Abreu Sherrer, 2013

AT: azúcares totales; DQO: demanda química de oxígeno; CSTR: reactor continuo de tanque agitado; TBR: reactor filtro percolador

1.3 Materia prima

Con respecto a las materias primas utilizadas para la producción de hidrógeno y biogás se han utilizado diversos compuestos orgánicos, entre ellos la biomasa lignocelulósica. Esta destaca por su gran abundancia, por incluirse en el ciclo natural del carbono y por poseer un alto contenido de polisacáridos (Arreola-Vargas *et al.* 2013; Arreola-Vargas *et al.* 2016; Kumar *et al.* 2015).

El bagazo de *Agave tequilana* Weber var. azul es un residuo lignocelulósico agroindustrial generado en grandes cantidades por la industria tequilera en México, una vez que se lleva a cabo la extracción de los jugos fermentables de la piña del agave. De acuerdo con el Consejo Regulador del Tequila, el consumo promedio de *Agave tequilana* en los últimos cinco años (2012-2016) para la producción de tequila

se estimó en 831 000 toneladas (CRT, 2016), de las cuales 40% corresponde al bagazo de agave (Cedeño-Cruz & Alvarez-Jacobs, 1991).

El bagazo de agave está compuesto por tres fracciones principales, celulosa (31-43% p/p), hemicelulosa (11-22 % p/p) y lignina (11-20% p/p), embebidas en una matriz heterogénea (Corona-González *et al.* 2016; Iñiguez-Covarrubias *et al.* 2001; Saucedo-Luna *et al.* 2011). La fracción de celulosa consiste en cadenas de glucosa unidas por enlaces β -1,4 y por enlaces de hidrógeno, formando microfibrillas de celulosa. Estas microfibrillas pueden ser amorfas, de fácil degradación, o cristalinas, recalcitrantes a la degradación (Kestur *et al.* 2013; Montiel *et al.* 2016; Perez-Pimienta *et al.* 2013; Van Dyk & Pletschke, 2012). La hemicelulosa es un grupo de polisacáridos heterogéneo constituido por hexosas (manosa, galactosa y glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa) (Xuebing & Zhang, 2012). Finalmente, la lignina es un heteropolímero amorfo muy recalcitrante constituido por tres unidades de fenilpropano: alcohol coniferílico (unidad G), alcohol sinapílico (unidad S) y alcohol p-cumarílico (unidad H) (Zhou *et al.* 2016).

Existen diversas aplicaciones en las cuales se ha utilizado el bagazo de agave, tales como la fabricación de ladrillos, relleno de colchones, compostaje, fertilizantes, alimento para ganado y biosorbentes de metales pesados (Crespo *et al.* 2013; Velazquez-Jimenez *et al.* 2013; Rodríguez-Macías *et al.* 2010; Rodríguez *et al.* 2013; Iñiguez *et al.* 2011; García-Reyes *et al.* 2009). No obstante, debido a los grandes volúmenes que se generan, estas aplicaciones no representan un impacto importante en la utilización de este material, ocasionando la generación de tiraderos clandestinos o su utilización inadecuada en campos agrícolas y con ello otros problemas, como contaminación ambiental por lixiviados, malos olores, infestación de hongos, plagas, etc. (Rodríguez-Macías *et al.* 2010; Rodríguez *et al.* 2013; Iñiguez *et al.* 2011; García-Reyes *et al.* 2009).

En este sentido, resulta claro el gran potencial de aprovechamiento del bagazo de *A. tequilana* como sustrato para la producción de H₂ y biogás. Sin embargo, el principal impedimento para su utilización directa es la necesidad de remover la fracción recalcitrante (lignina) de este material, con el fin de incrementar la

biodisponibilidad de las fracciones de hemicelulosa y celulosa (Karimi & Taherzadeh, 2016).

Se ha reportado que la lignina proporciona una barrera física que limita la accesibilidad de las celulasas o hemicelulasas a sus respectivos sustratos (Jung *et al.* 2000; Palonen *et al.* 2004; Várnai *et al.* 2011). Además, las celulasas se adsorben de forma no específica a la lignina, lo que reduce la efectividad del proceso de sacarificación enzimática (Qi *et al.* 2011; Tu *et al.*, 2009). Asimismo, la lignina puede inhibir directamente las enzimas hidrolíticas y bloquear el acceso de la celulasa a la cadena de celulosa (Berlin *et al.* 2006; Hidaka *et al.* 1984; Jing *et al.* 2009). Por otro lado, en algunas investigaciones se indica que no es sólo la presencia de la lignina la que causa un impacto en la sacarificación enzimática, sino el tipo de lignina que se tenga y la distribución de la misma (Merino & Cherry, 2007; Zhang & Lynd, 2004). Es por ello que se sugiere aplicar un pretratamiento al material lignocelulósico que logre eliminar esta fracción recalcitrante (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Posteriormente, es necesario llevar a cabo un proceso de sacarificación enzimática en el que se hidrolicen los oligómeros presentes en la celulosa y hemicelulosa, y se obtengan los monosacáridos que servirán como sustrato para el proceso de fermentación (Karimi & Taherzadeh, 2016; Van Dyk & Pletschke, 2012).

1.4. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino

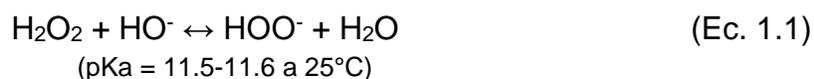
Entre los diversos pretratamientos alcalinos que existen, destaca el pretratamiento de deslignificación oxidativa con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) por lograr un alto porcentaje de remoción de lignina y recuperación de celulosa y hemicelulosa (holocelulosa) en diversos sustratos lignocelulósicos (Tabla 1.2). Además, durante el proceso no se generan compuestos inhibitorios para los procesos de fermentación y digestión anaerobia, como los furfurales, y se logra incrementar los rendimientos de sacarificación enzimática (Cuervo *et al.* 2009; Singh *et al.* 2015; Gould, 1985; Sun *et al.* 2000; Sun *et al.* 2001; Wilkinson *et al.* 2014).

Tabla 1.2 Porcentajes de deslignificación y recuperación de holocelulosa obtenidos con diversos pretratamientos alcalinos en diferentes sustratos lignocelulósicos.

Pretratamiento alcalino	Sustrato	Deslignificación (%)	Recuperación holocelulosa* (%)	Referencia
Permanganato de potasio	Mazorca de maíz	47	56	Ma <i>et al.</i> 2015
Peróxido de hidrógeno alcalino	Mazorca de maíz	75	81	Su <i>et al.</i> 2015
Amoníaco acuoso	Rastrojo de maíz	55	85	Kim & Lee, 2005
Peróxido de hidrógeno alcalino	Aserrín	88	60	Ayeni <i>et al.</i> 2013
Peróxido de hidrógeno alcalino	Paja de cebada	72	94	Sun <i>et al.</i> 2001
Peróxido de hidrógeno alcalino	Bagazo de <i>Agave tequilana</i>	82	96	Velázquez-Valadez <i>et al.</i> 2016

*Holocelulosa: Suma de las fracciones de celulosa y hemicelulosa

El mecanismo de acción que ocurre durante el pretratamiento con PHA consiste en la saponificación de los enlaces éter y éster α -bencilo que unen a la lignina y la hemicelulosa, logrando su solubilización (Figura 1.2) (Wilkinson *et al.* 2014). Este mecanismo se lleva a cabo debido a la formación de los radicales hidroxilo ($^{\circ}\text{OH}$) y superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y el anión hidroperóxido ($^{\cdot}\text{OOH}$) altamente oxidativos, generados a partir de la disociación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de hidróxido de sodio (NaOH) a un pH alcalino de 11.5 (Ec. 1.1 y 1.2) (Gould, 1984; Su *et al.* 2015; Sun *et al.* 2001).



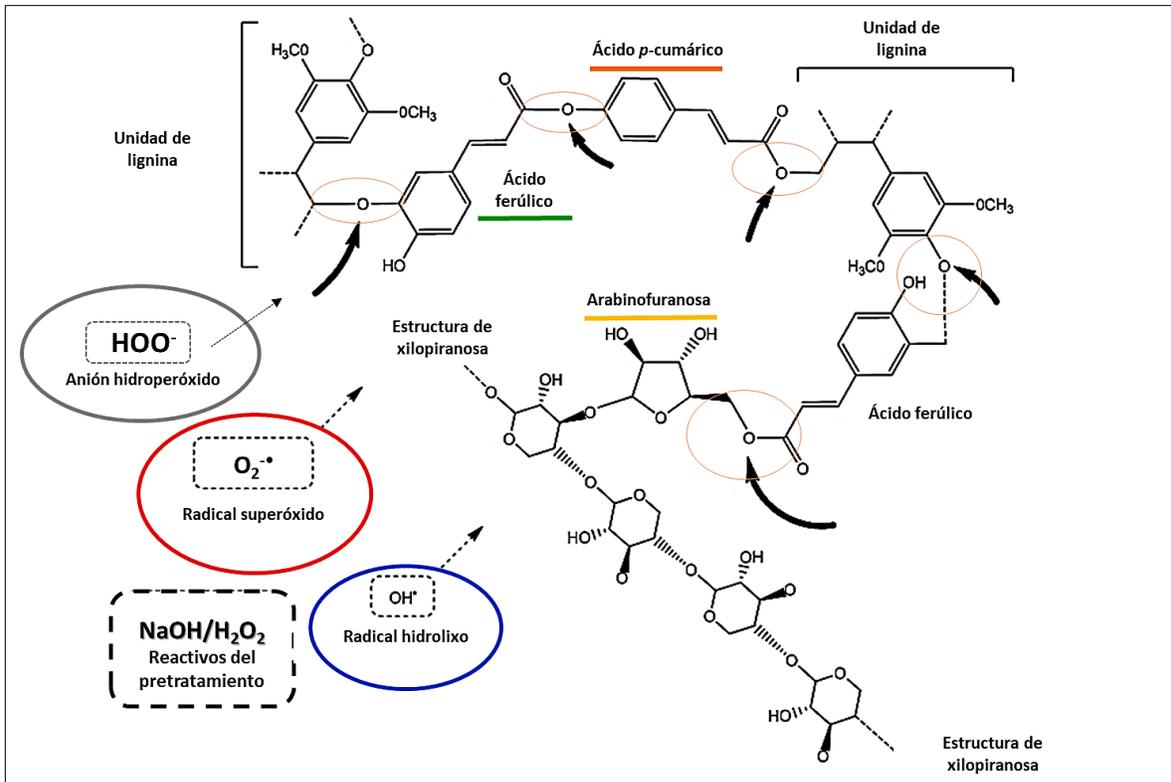


Figura 1.2 Mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno alcalino durante la deslignificación del bagazo de *A. tequilana* (Modificado de Sun *et al.* 2000; Wilkinson *et al.* 2014).

Una vez que la lignina es removida, se debe llevar a cabo un proceso de sacarificación enzimática, con el cual se hidrolizan los polisacáridos contenidos en el bagazo de agave y se obtenga un sustrato simple para el proceso de fermentación (Li *et al.* 2016; Perez-Pimienta *et al.* 2016; Saucedo-Luna *et al.* 2011; Van Dyk & Pletschke, 2012).

1.5 Hidrólisis enzimática

De manera general, se sabe que en un proceso de sacarificación enzimática se requieren tres tipos de enzimas para la hidrólisis de celulosa a monómeros de glucosa, las cuales son endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y las β -glucosidasas. En este caso, las celobiohidrolasas atacan los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa mientras que las endoglucanasas cortan internamente las cadenas de celulosa y reducen el grado de polimerización. Por

último, las β -glucosidasas liberan unidades de celobiosa y rompen los enlaces β -1,4-glucosídicos (Gómez-Tovar, 2008; Teeri, 1997; Van Dyk & Pletschke, 2012).

En un proceso de hidrólisis convencional se usa sólo un grupo de enzimas, celulasas principalmente, no obstante, éstas no logran escindir la estructura heterogénea de la hemicelulosa puesto que, por su composición más variada en comparación con la celulosa, requiere un gran número de enzimas con distintas actividades para lograr una hidrólisis completa, ocasionando que los rendimientos de sacarificación sean bajos (Tabla 1.3) (Van Dyk & Pletschke, 2012). En este sentido, existen estudios como el de Selig et al. (2009) y el de Gao et al. (2011) en los que se reporta que existe un aumento importante en la conversión de glucanos al adicionar xilanasas o hemicelulasas a las mezclas enzimáticas utilizadas durante la sacarificación. Lo anterior sugiere que al hidrolizar la hemicelulosa de manera simultánea con la celulosa o de forma secuencial es posible incrementar los rendimientos de sacarificación enzimática. Por lo que la utilización de xilanasas o hemicelulasas es una oportunidad de mejora para los rendimientos de azúcares obtenidos en el proceso.

Tabla 1.3 Rendimientos de azúcares obtenidos en procesos de hidrólisis enzimática reportados en la literatura.

Biocombustible	Pretratamiento	Tratamiento enzimático	Rendimiento Azúcares	Referencia
Bioetanol	Ácido	Celulasas con suplemento de glucosidasa	248 mg AT/g bagazo	Saucedo-Luna <i>et al.</i> , 2010
Hidrógeno	-	Celluclast 1.5 L	207 mg AT/ g bagazo	Abreu-Sherrer, 2013
Hidrógeno	-	Celluclast 1.5 L	270 mg AT/g bagazo	Contreras-Dávila, 2015
Hidrógeno	-	Celluclast 1.5 L	205 mg AT/g bagazo	López-Gutiérrez, 2015
Bioetanol	Alcalino (NaOH-H ₂ O ₂)	Celluclast 1.5 L, Novozyme 188, Viscozyme L, Cellic CTec3, Cellic HTec 3)	~878 mg AT/g bagazo	Velázquez-Valadez et al. 2016
Metano	-	Celluclast 1.5 L	222 mg AT/ g bagazo	Arreola-Vargas et al. 2016

Celluclast 1.5 L (celulasas), Novozyme 188 (β -glucosidasa), Viscozyme L (hemicelulasas), Cellic CTec3 (celulasas y hemicelulasas), Cellic HTec 3 (hemicelulasas). AT: azúcares totales

1.6 Sinergismo y antagonismo enzimático

El sinergismo enzimático, es un término utilizado para describir la acción cooperativa entre las enzimas durante el proceso de sacarificación, con el fin de llevar a cabo un proceso eficiente. De tal forma que existe sinergismo cuando el grado total de hidrólisis de una mezcla de enzimas es mayor que la suma de los grados de hidrólisis observados por las enzimas individuales (Andersen *et al.*, 2008).

El sinergismo enzimático se puede calcular mediante la ecuación modificada de Andersen *et al.*, (2008) (Ec. 1.3) en la cual se calcula un grado de sinergismo y se involucra la formación de producto (p.ej., suma de todos los azúcares solubles) o a las velocidades de hidrólisis generales. De esta manera, si el cociente de la ecuación 1.3 es mayor a 1 se determina que existe sinergismo, de lo contrario se determina que se trata de antagonismo o que no existe sinergismo (Eriksson, Karlsson & Tjerneld, 2002).

$$GS = \frac{(AT)_{enzima1} + (AT)_{enzima2}}{\alpha(AT)_{enzima1} + \beta(AT)_{enzima2}} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Donde: α y β corresponden a la fracción molar de la enzima 1 y la enzima 2 (respectivamente) en la mezcla enzimática. AT es la concentración de azúcares totales obtenidos (g/L) con cada una de las enzimas.

Actualmente, hay pocos estudios sobre el sinergismo o antagonismo que presentan las mezclas de enzimas utilizadas en la sacarificación enzimática de la celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, para fines de este trabajo se destaca el estudio de Andersen *et al.* (2008), en donde se utilizan diferentes mezclas enzimáticas compuestas por celulasas y hemicelulasas para degradar celulosa hinchada y celulosa microcristalina (Avicel), encontrando que existe un grado de sinergismo entre las enzimas de las mezclas durante la degradación de celulosa hinchada, así como efectos competitivos en la degradación de Avicel. Lo anterior resulta de gran interés para esta investigación y para los procesos a escala industrial debido a la necesidad que existe de definir mezclas de enzimas que presenten sinergismo, con

lo cual se minimicen las concentraciones de las mismas en las mezclas, y se pueda lograr un ahorro en el uso de dichas enzimas.

Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos

El bagazo de agave es un residuo potencial para la producción de hidrógeno y metano por ser muy abundante y por tener un alto contenido de polisacáridos, como la celulosa y la hemicelulosa. Sin embargo, el principal impedimento para su utilización directa en los procesos de fermentación y digestión anaerobia es la presencia de la lignina, debido a que por su carácter recalcitrante funge como una barrera para la accesibilidad de las enzimas durante el proceso de sacarificación enzimática. Actualmente existen diversos pretratamientos fisicoquímicos que se enfocan en la deslignificación del material lignocelulósico, entre éstos destaca el pretratamiento de deslignificación oxidativa con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA), por producir bajas o nulas concentraciones de compuestos inhibitorios para los procesos de fermentación y digestión anaerobia y por lograr un alto porcentaje de remoción de lignina. Por otro lado, se ha reportado que una vez que la lignina es eliminada, al final del proceso de hidrólisis enzimática se genera una alta concentración de oligosacáridos y por consecuencia rendimientos de azúcares bajos; probablemente por causa de una hidrólisis incompleta de la hemicelulosa. Debido a lo anterior, resulta interesante implementar mezclas enzimáticas que tengan actividades celulolíticas y hemicelulolíticas, que logren un aumento importante en la conversión de glucanos durante el proceso de sacarificación del bagazo previamente deslignificado con PHA. Por consiguiente, al producir mayor cantidad de azúcares totales (AT) que, al ser utilizados como sustrato en la producción de hidrógeno y metano, mejoren sustancialmente los rendimientos de los procesos.

2.1 Hipótesis

La deslignificación del bagazo de *A. tequilana* con PHA y el uso posterior de una mezcla enzimática con actividades de celulasas (Celluclast 1.5 L) y hemicelulasas (Viscozyme L), permitirá hidrolizar de manera más eficiente los polímeros de

celulosa y hemicelulosa, incrementando el rendimiento de sacarificación. Por lo que el uso de dichos hidrolizados como sustrato para la producción de hidrógeno y metano, vía fermentación oscura y digestión anaerobia, aumentarán los rendimientos de producción de ambos procesos.

2.2 Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de mezclas enzimáticas sobre la sacarificación del bagazo de agave pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino para la producción de hidrógeno y metano a partir de los hidrolizados obtenidos.

2.3 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tiempo de reacción del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino sobre la deslignificación del bagazo de agave.
2. Comparar el efecto del uso de mezclas enzimáticas e hidrolisis secuenciales sobre el rendimiento y la productividad de la sacarificación del bagazo de agave pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino.
3. Estudiar el rendimiento de sacarificación de las celulasas y hemicelulasas en mezcla para determinar si existe actividad sinérgica o antagónica entre las mismas.
4. Evaluar los rendimientos de producción de hidrógeno y metano a partir de la fermentación de los hidrolizados enzimáticos obtenidos del bagazo de *A. tequilana* pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Biomasa lignocelulósica

El bagazo de *A. tequilana* utilizado fue obtenido de “Casa Herradura”, ubicada en Amatitán, Jalisco. Fue secado a temperatura ambiente y reducido a un tamaño de partícula entre ~1 y 5 cm de longitud. Cabe mencionar que el bagazo utilizado provino de un proceso de cocción tradicional en hornos de mampostería, llevado a cabo durante la producción de tequila.

3.2 Materiales

3.2.1 Solución de peróxido de hidrógeno alcalino al 2%

Durante el pretratamiento se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno alcalino al 2 % (p/v), la cual se preparó mediante la dilución de 66 mL de H₂O₂ (30% p/p) grado reactivo en 1000 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 5M.

3.2.2 Enzimas y buffer

La enzima con actividad celulolítica empleada durante los ensayos de hidrólisis enzimática fue la mezcla comercial Celluclast[®] 1.5L de *Trichoderma reesei* (Novozyme, BIOTECSA, presentación 10 L), que tiene actividades celulolíticas de celulasa, β-glucanasa y celobiohidrolasa.

La enzima con actividad hemicelulolítica empleada durante los ensayos de hidrólisis enzimática fue la mezcla comercial Viscozyme[®] L de *Aspergillus sp.* (Novozyme, V2010, presentación 250 mL). Ésta enzima es un complejo multienzimático que presenta actividades hemicelulolíticas principalmente: hemicelulasa y xilanasa. Sin embargo, también presenta actividades de arabinasa, celulasa y β-glucanasa.

Se utilizó un buffer de citratos para todos los tratamientos de hidrólisis enzimática, el cual se preparó mediante la disolución de 6.7 g de ácido cítrico y 5.3 g de citrato de sodio en un volumen de 1000 mL de agua destilada. Dicho buffer fue ajustado al pH correspondiente en cada tratamiento de hidrólisis enzimática con NaOH 5M y/o HCl 5M.

3.2.3 Inóculo y medios minerales utilizados

El inóculo utilizado para los ensayos en lote de producción de hidrógeno y metano fue lodo granular anaerobio proveniente de la planta de tratamiento de vinazas de “Casa Herradura” ubicada en Amatitán, Jalisco. El contenido de sólidos totales fue de 0.12 g/L y de sólidos volátiles totales fue de 0.11 g/L.

En los ensayos de producción de hidrógeno se aplicó un tratamiento al inóculo, con el fin de eliminar las arqueas metanogénicas y sólo conservar las bacterias hidrogenogénicas. Para ello, se disgregó el lodo granular anaerobio con una malla del No. 20 y se trató térmicamente en una estufa a 105 °C durante 24 h o hasta obtener un inóculo seco. Posteriormente, dicho inóculo se molió en un mortero, hasta conseguir una muestra en polvo. En los ensayos de producción de metano en lote, se utilizó como inóculo el lodo granular anaerobio sin tratamiento térmico, pero acondicionado a la temperatura de trabajo (35 °C) durante 12 h.

En los ensayos de producción de hidrógeno se utilizó el medio mineral de fosfatos reportado por Arreola-Vargas *et al.* (2013) con la siguiente composición (g/L): 4.5 NH₄H₂PO₄, 11.9 Na₂HPO₄, 0.125 K₂HPO₄, 0.1 MgCl₂•6H₂O, 0.015 MnSO₄•6H₂O, 0.025 FeSO₄•5H₂O, 0.005 CuSO₄•5H₂O, 0.075 ZnCl₂.

En los ensayos de producción de metano en lote se utilizó el medio básico anaerobio modificado de Angelidaki & Sanders, (2004), con la composición mostrada en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Composición del medio mineral anaerobio utilizado en los ensayos de producción de metano en lote (modificado de Angelidaki & Sanders, 2004).

Solución	Composición (g/L)	Volumen (mL/L)
A (Medio base)	100 NH ₄ Cl, 10 NaCl, 10 MgCl ₂ •6H ₂ O, 5 CaCl ₂ •2H ₂ O	10
B (Solución de fosfato)	200 K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	2
C (Solución de metales traza)	2 FeCl ₂ •4H ₂ O, 0.05 H ₃ BO ₃ , 0.05 ZnCl ₂ , 0.05 CuCl ₂ •2H ₂ O, 0.038 MnCl ₂ •4H ₂ O, 0.05 (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O, 0.05 AlCl ₃ , 0.05 CoCl ₂ •6H ₂ O, 0.092 NiCl ₂ •6H ₂ O, 0.5 EDTA, 1 mL de HCl concentrado, 0.1 Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O	1

3.3 Estrategia experimental: deslignificación, sacarificación y producción de biocombustibles

La estrategia experimental se dividió en tres etapas principales (Figura 3.1). En la primera etapa el bagazo de *A. tequilana* se sometió a un pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (pH 11.5), bajo las condiciones descritas por Su *et al.* (2015), con un tiempo de reacción de 1.5 h y 6 h, obteniendo una fracción sólida deslignificada a la cual se le nombró fracción 1 (F1). En la segunda etapa la F1 del mejor pretratamiento de deslignificación se sometió a cinco tratamientos enzimáticos distintos. En el tratamiento 1 y 2 se utilizaron como controles las enzimas celulasa y hemicelulasa de manera individual, respectivamente. En el tratamiento 3 se utilizó una mezcla de estas dos enzimas. En los tratamientos 4 y 5 se llevaron a cabo dos hidrólisis enzimáticas secuenciales distintas, utilizando primero la celulasa, después la hemicelulasa y viceversa, esto con el fin de ser comparadas con los tratamientos enzimáticos anteriores (1, 2 y 3). Por último, en la tercera etapa la producción de hidrógeno y metano en lote se evaluó a partir del hidrolizado obtenido del mejor tratamiento de la segunda etapa.

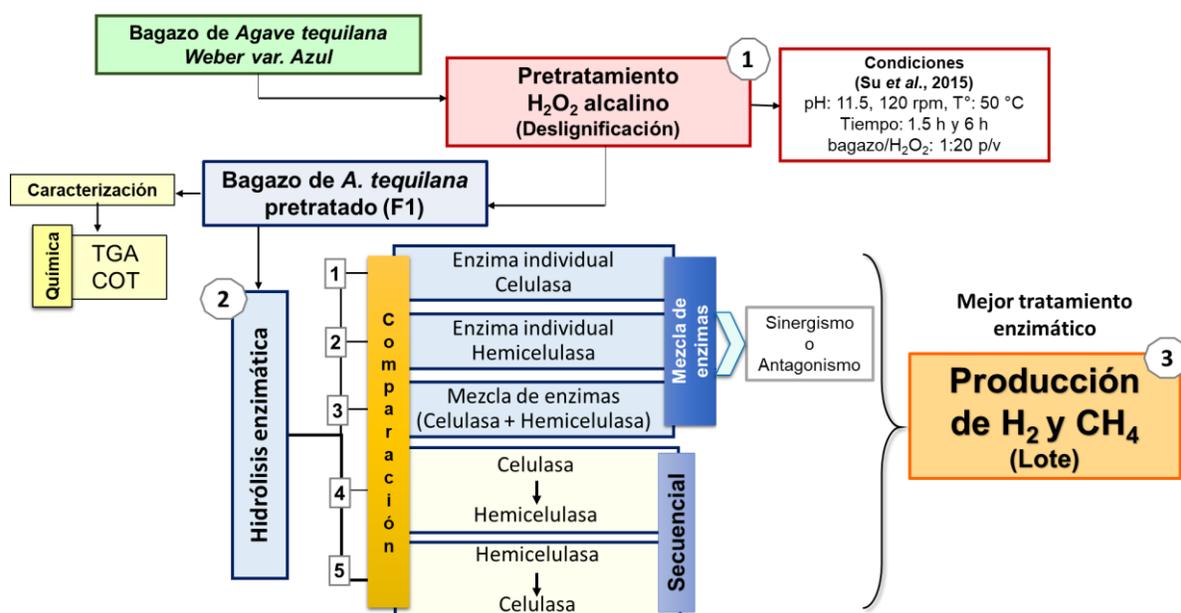


Figura 3.1 Estrategia experimental para la evaluación del efecto de deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de *A. tequilana* en la producción de hidrógeno y metano. ① Etapa 1: Pretratamiento con PHA, ② Etapa 2: Hidrólisis enzimática y ③ Etapa 3: Producción de H₂ y CH₄ en lote.

3.4 Etapa 1: pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA)

En esta etapa se evaluó el efecto del tiempo de reacción durante el pretratamiento con PHA sobre la deslignificación del bagazo de *A. tequilana*. Para ello, se empleó la metodología establecida por Su *et al.* (2015). Primero, se colocaron 21.46 g bagazo de *A. tequilana* (equivalentes a 20 g ST) en un vaso de precipitado de 1000 mL con una solución de PHA al 2% (p/v) en una relación 1:20 (p/v). La suspensión sólido/líquido se ajustó a un pH de 11.5 con NaOH 5M y se incubó a 50 °C, 120 rpm y a dos tiempos de reacción, 1.5 y 6 h. Posteriormente, la suspensión se filtró, obteniéndose dos fracciones: una líquida (lignina y hemicelulosa removidas) y una sólida (fibras enriquecidas con celulosa y hemicelulosa). La fracción sólida (F1) se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secó a 60 °C. Cada experimento se realizó por triplicado. La fracción líquida se caracterizó por medio del contenido de carbono orgánico total y la fracción sólida se caracterizó mediante un análisis termogravimétrico y por carbono orgánico total. Ambas metodologías se describen en las secciones 3.7.4 y 3.7.5, respectivamente. Cabe mencionar que los tiempos de reacción empleados en este trabajo fueron seleccionados con base en estudios previos donde se reportan porcentajes de deslignificación mayores a 90% y recuperación de holocelulosa mayores a 85%, al pretratar olote de maíz (Su *et al.* 2015) y penca de agave (Munguía-Aguilar, 2016) con PHA durante 1.5 y 6 h.

3.5 Etapa 2: hidrólisis enzimática

En la hidrólisis enzimática se compararon cinco tratamientos distintos (Figura 3.1) con el objetivo de evaluar el efecto del uso de una mezcla de celulasas y hemicelulasas en el proceso de hidrólisis, y determinar si existe sinergismo o antagonismo entre ellas, así como el efecto de un tratamiento secuencial. Las variables de respuesta de los cinco tratamientos fueron los azúcares totales y la demanda química de oxígeno (DQO). Cada tratamiento se realizó por triplicado con sus respectivos controles de bagazo y enzima, con el fin de conocer la contribución de azúcares totales obtenidos de ambos elementos en la mezcla de reacción. Para todos los controles de bagazo pretratado o F1 utilizados en los cinco tratamientos,

se empleó la misma relación sustrato/buffer de los ensayos de cada tratamiento. En el caso de los controles de enzima se adicionó la misma relación enzima/buffer de los ensayos de cada tratamiento.

3.5.1 Hidrólisis individual con celulasa

En este tratamiento se utilizaron las condiciones óptimas de hidrólisis reportadas por López Gutiérrez (2015). Se suspendió 5.25 g de F1 en 150 mL de buffer de citratos 50 mM a pH 5.5, por 40 °C durante 12 h. Se utilizaron matraces de 250 mL a un volumen de trabajo de 150 mL. La enzima Celluclast 1.5 L fue añadida a una concentración de 0.7 mg proteína/mL de medio (buffer), usando específicamente 2.7 mL de enzima en cada matraz. En los controles de bagazo pretratado, se suspendió 5.25 g de F1 en 150 mL de buffer de citratos sin añadir enzima. En los controles de enzima, se usó 50 mL de buffer de citratos y 0.9 mL de enzima Celluclast 1.5 L sin adicionar bagazo pretratado; en este caso se usó un menor volumen de trabajo para evitar un mayor gasto de enzima. El experimento y sus respectivos controles de bagazo y enzima se realizaron por triplicado.

3.5.2 Hidrólisis individual con hemicelulasa

En este tratamiento se usaron las condiciones óptimas de hidrólisis para la enzima hemicelulasa encontradas por Cifuentes-López, (2016). Se suspendieron 9 g de F1 en 150 mL buffer de citratos 50 mM a pH 4.5, por 40 °C durante 12 h. La enzima Viscozyme L se añadió a una concentración de 1.3 mg proteína/mL de medio (buffer), usando específicamente 5.3 mL de enzima. En los controles de bagazo pretratado, se suspendió 9 g de F1 en 150 mL de buffer de citratos sin añadir enzima. En los controles de enzima, se usó 50 mL de buffer de citratos y 1.8 mL de enzima Viscozyme L sin adicionar bagazo pretratado. El experimento y sus respectivos controles de bagazo y enzima se realizaron por triplicado.

3.5.3 Hidrólisis con mezcla enzimática

Para este tratamiento se determinaron las mejores condiciones de hidrólisis que permitieron la mayor sacarificación del bagazo deslignificado usando ambas enzimas mediante un diseño factorial Plackett-Burman, empleando el programa Design-Expert 7.0.0. Los factores y niveles experimentales evaluados en el diseño factorial se muestran en la Tabla 3.2. La variable de respuesta para este diseño fue la concentración de azúcares totales y se evaluó mediante un diagrama de Pareto, el cual arrojó los factores más significativos de hidrólisis con la mezcla de enzimas.

Tabla 3.2 Factores y niveles experimentales evaluados en el diseño factorial Plackett-Burman durante la determinación de las mejores condiciones de hidrólisis con la mezcla de enzimas.

FACTORES	NIVELES		
	Mínimo	Máximo	Unidades
pH	4.5	5.5	-
Concentración sustrato [S]	20	80	g/L
Concentración enzima celulasa [C]	0.5	1.5	mg proteína/ mL buffer
Concentración enzima hemicelulasa [H]	0.1	1.3	mg proteína/ mL buffer

Posteriormente se utilizaron esos factores significativos en un diseño central compuesto con puntos axiales utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI.II, con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de hidrólisis del bagazo pretratado con la mezcla de enzimas. Los factores y niveles utilizados en el diseño compuesto central se muestran en la Tabla 3.3. Cabe mencionar que la variable de respuesta evaluada en este diseño experimental fue el rendimiento de sacarificación, calculado a partir de las concentraciones de azúcares totales obtenidas en cada experimento.

Tabla 3.3 Factores y niveles experimentales evaluados en el diseño central compuesto durante la determinación de las mejores condiciones de hidrólisis con la mezcla de enzimas.

Factores	Niveles			Puntos axiales		
	Mínimo	Máximo	Unidades	Mínimo	Máximo	Unidades
pH	4.5	5.5	-	4.16	5.84	-
Concentración sustrato [S]	20	80	g/L	-0.45	100.45	g/L
Concentración enzima celulasa [C]	0.5	1.5	mg proteína/ mL buffer	0.16	1.84	mg proteína/ mL buffer

Los ensayos arrojados por el diseño compuesto central y sus respectivos controles de bagazo y enzima se realizaron en una sola réplica, en un volumen de trabajo de 50 mL. El volumen de cada enzima añadida en los ensayos del modelo central compuesto se determinó con base en la Ec. 3.1.

$$VE = \frac{[Pe]}{[Pce]} \times Vte \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde:

VE= Volumen de la enzima a añadir en cada ensayo

[Pe]= Concentración de proteína fijada para el ensayo (mg proteína/mL buffer)

[Pce]= Concentración de proteína contenida en el preparado de la enzima comercial (mg proteína/mL enzima)

Vte = Volumen de trabajo del ensayo

Las condiciones evaluadas en los ensayos de hidrólisis con mezclas enzimáticas fueron las siguientes: 7.5 g F1 en 150 mL de buffer de citratos, una concentración de enzima Celluclast 1.5 L de 1.84 mg proteína/mL buffer, una concentración de enzima Viscozyme L de 0.1 mg proteína/mL buffer, pH 5, 40°C y una agitación de 120 rpm. Cabe mencionar que la concentración de sustrato y de las enzimas celulasa y hemicelulasa se determinaron a partir de los resultados obtenidos en los diseños experimentales de Plackett-Burman y el diseño central compuesto.

A las mejores condiciones de hidrólisis con la mezcla de enzimas se le determinó el grado de sinergismo enzimático con base en la ecuación modificada de Andersen *et al.*, (2008) (Ec. 1.3).

3.5.4 Hidrólisis secuencial (celulasa → hemicelulasa)

En este tratamiento se llevó a cabo una hidrólisis secuencial utilizando primeramente la enzima celulasa con las condiciones óptimas mencionadas en la sección 3.5.1, y posteriormente, la enzima hemicelulasa bajo las condiciones óptimas mencionadas en la sección 3.5.2.

3.5.5 Hidrólisis secuencial (hemicelulasa → celulasa)

En este tratamiento también se llevó a cabo una hidrólisis secuencial, sin embargo, primero se usó la enzima hemicelulasa con las condiciones óptimas mencionadas en la sección 3.5.2 y, posteriormente, se usó la enzima celulasa bajo las condiciones óptimas mencionadas en la sección 3.5.1.

3.5.6 Hidrólisis en reactor

Una vez seleccionado el mejor tratamiento de hidrólisis enzimática en términos de productividad de azúcares totales, se preparó un volumen de hidrolizado de aproximadamente 6 L en un reactor de vidrio (SEV-Prendo, modelo: U1 TPLC/FAM-10000. Puebla, México) con un volumen nominal de 10 L con agitación mecánica en un rango de 300-150 rpm. Las condiciones de hidrólisis utilizadas fueron las del mejor tratamiento enzimático seleccionado.

3.6 Etapa 3: cinéticas de producción de hidrógeno y metano en lote

Los ensayos de producción de hidrógeno y metano en lote se llevaron a cabo en un equipo con sistema automático de potencial de metano (AMPTS II. Bioprocess control. Lund, Suecia), empleando botellas de vidrio de 600 mL, con un volumen de trabajo de 360 mL y un espacio de cabeza de 240 mL. Las condiciones operacionales aplicadas en los ensayos de producción de hidrógeno y metano fueron: temperatura de incubación de 37 °C, tiempo de mezclado de 1 min a 120 rpm seguido de 3 min sin agitación, a pH 7.5 y 7 para hidrógeno y metano, respectivamente. Las botellas de ambos ensayos se purgaron con gas N₂ durante 90 segundos para garantizar las condiciones anaerobias.

En los ensayos de producción de hidrógeno se utilizó una relación sustrato/inóculo de 2.7 g AT/g SV, una concentración de sustrato de 5 g AT/L y medio mineral. El sustrato que se usó fue el hidrolizado enzimático obtenido del mejor tratamiento (en términos de productividad) evaluado en la etapa 2. Este tratamiento se evaluó por triplicado. Además, se evaluó un control endógeno donde sólo se empleó inóculo tratado térmicamente y medio mineral de fosfatos.

Por otro lado, en los ensayos de producción de metano se utilizó una relación 1:2 sustrato/inóculo, para lo cual se utilizaron 5 g DQO/L de sustrato y 10 g SV/L de inóculo. El sustrato utilizado fue el hidrolizado enzimático obtenido del mejor tratamiento (en términos de productividad de azúcares totales) evaluado en la segunda etapa. El tratamiento se evaluó por triplicado. Además, se evaluó un control endógeno donde sólo se empleó inóculo y medio mineral anaerobio.

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos volátiles, sólidos suspendidos totales, sólidos totales volátiles, sólidos totales, azúcares totales.

Las determinaciones de demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se llevaron a cabo mediante métodos estándar (APHA, 1998), mientras que la determinación de azúcares totales (AT) se realizó por el método fenol-sulfúrico (DuBois *et al.* 1956).

3.7.2 Ácidos grasos volátiles

La determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV) se realizó mediante electroforesis capilar con un equipo Agilent modelo G1600A (Waldbronn, Alemania), de acuerdo a lo descrito anteriormente (Davila-Vazquez *et al.* 2009).

3.7.3 Análisis de la composición del gas

El hidrógeno y metano se determinaron mediante un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890N (Waldbronn, Alemania), equipado con detector de conductividad térmica, de acuerdo a lo descrito anteriormente (Davila-Vazquez *et al.* 2009).

3.7.4 Carbono orgánico total

Para determinar el contenido de carbono orgánico total (COT) del bagazo de *A. tequilana* con y sin pretratamiento, y del residuo líquido del pretratamiento con PHA, se usó un equipo Shimadzu modelo TOCVSS/TNM-1 (Japón) equipado con un módulo de muestras sólidas (SSM-5000A). Se utilizaron 40 mg de muestra pulverizada (bagazo con y sin pretratamiento) y se procesaron por triplicado durante 6 min a 900 °C utilizando aire (500 mL/min) como gas acarreador.

3.7.5 Análisis termogravimétrico

Para la caracterización del bagazo de *A. tequilana*, pretratado y no pretratado, se llevó a cabo un análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) en el analizador TGA Setaram modelo Setsys Evolution (Francia). Se analizaron 25 mg de cada muestra a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El intervalo de temperatura utilizado fue de 25-800 °C con una atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 mL/min (Munguía-Aguilar, 2016). Previo al análisis, las muestras fueron secadas en una estufa a 60 °C por 24 h. De cada análisis se obtuvo un termograma, en el cual se expresa el porcentaje de pérdida de peso (%_{pp}) y la tasa de pérdida de peso (%_{pp}/°C) en el eje Y, y la temperatura (°C) en el eje X.

3.7.6 Determinación de compuestos inhibitorios

Se determinaron los derivados de furanos hidroximetilfurfural (HMF) y furfural, así como los compuestos fenólicos vanilina y siringaldehído mediante HPLC de acuerdo al método descrito por Arreola-Vargas *et al.* (2013), empleando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent (Alemania) (4.6 x 150 mm 5µm), utilizando una fase móvil agua/acetronitrilo (92/8 %v/v) a un flujo de 0.8 mL/min y a una temperatura de 40 °C, el pH de las muestras se ajustó a 4.4. Las muestras utilizadas fueron los hidrolizados obtenidos de los cinco tratamientos evaluados durante la segunda etapa.

3.8 Criterios de evaluación para cada etapa

3.8.1 Etapa 1: pretratamiento

Para la evaluación de la etapa de pretratamiento se analizaron los estándares de celulosa microcristalina y de lignina mediante termogravimetría. Posteriormente, se compararon los termogramas de los estándares y de las muestras de bagazo sin pretratamiento y con pretratamiento. Con base en los termogramas obtenidos se calcularon los porcentajes de deslignificación y recuperación de holocelulosa. Posteriormente, se realizó el balance de masa de los tiempos de reacción de 1.5 y 6 h evaluados durante la etapa del pretratamiento. Por último, se realizó una prueba estadística t-student para determinar si existía diferencia significativa entre ambos tiempos de pretratamiento.

3.8.2 Etapa 2: hidrólisis enzimática

La evaluación de la segunda etapa se llevó a cabo mediante la comparación de los rendimientos de sacarificación, porcentajes de sacarificación y las productividades obtenidas en cada tratamiento evaluado en esta etapa. Las ecuaciones utilizadas para calcular los parámetros antes mencionados se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Ecuaciones utilizadas para la evaluación de la etapa de hidrólisis enzimática.

$RS = \frac{[AT]}{[S]} \times 1000$	Ec. 3	Donde: <ul style="list-style-type: none">▪ RS: Rendimiento de sacarificación (mg AT/g bagazo)▪ THE: Tiempo de duración del tratamiento de hidrólisis enzimática (h)▪ [AT]: Concentración de azúcares totales liberados (g/L)▪ AT: Masa de azúcares totales liberados (g)▪ [S]: Concentración de sustrato inicial, bagazo de agave, (g/L)▪ 0.9 es el factor de corrección para compensar la adición de una molécula de agua durante la hidrólisis▪ 1000 es el factor de conversión a mg▪ 100 es el factor para obtener el porcentaje
$\text{Porcentaje desacarificación} = \frac{AT \times 0.9 \times 100}{[S]}$	Ec. 4	
$\text{Productividad} = \frac{RS}{THE}$	Ec. 5	

3.8.3 Etapa 3: producción de hidrógeno y metano en lote

Los parámetros cinéticos para los ensayos de producción de hidrógeno y metano se calcularon mediante la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 6), la cual

se ajustó a través del software Matlab R2014a (8.3) (Davila-Vazquez *et al.* 2009; Fang *et al.* 2006; Zwietering *et al.* 1990). Las ecuaciones utilizadas para calcular los parámetros cinéticos y su descripción se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Ecuaciones utilizadas para la evaluación de los parámetros cinéticos de la etapa de producción de hidrógeno y metano.

$H(t) = Hmax * exp \left\{ -exp \left[\frac{2.71828 Rmax}{Hmax} \right] (\lambda - t) + 1 \right\}$	Ec. 6	Donde
$RMH = \frac{\text{Moles de hidrógeno producido}}{\text{moles de glucosa consumida}}$	Ec. 7	H(t): Es el hidrógeno o metano total producido en el tiempo de ensayo (mL/L) Hmax: Es la producción máxima acumulada de hidrógeno o metano (L H ₂ /L o LCH ₄ /L) Rmax: Es la velocidad máxima de producción de hidrógeno o metano (LH ₂ /L-h o LCH ₄ /L-h)
$RM = \frac{Hmax}{\text{Sustrato consumido}}$	Ec. 8	Λ: Es la fase lag o tiempo de aclimatación de los microorganismos (h) t: Tiempo transcurrido en el experimento (h)
$VPM = \frac{Rmax}{Vt} * 24h$	Ec. 9	RMH: Rendimiento molar de hidrógeno (mol H ₂ /mol glucosa consumida) Rm: Rendimiento de producción de metano (LCH ₄ /g DQO consumida) VPM: Velocidad de producción de metano (LCH ₄ /L-d) Vt: Volumen de total de reacción

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Efecto del tiempo de reacción del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino en el bagazo de *A. tequilana*

Para conocer el efecto del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino en el bagazo de *A. tequilana* se emplearon dos tiempos de reacción: 1.5 h y 6 h. Las fracciones sólidas se caracterizaron mediante TGA y las fracciones líquidas por COT.

Previo a lo anterior, se caracterizaron los estándares de celulosa microcristalina y de lignina, cuyos termogramas se muestran en la Figura 4.1. Como se observa, la gasificación de la celulosa microcristalina ocurre en un intervalo de temperatura de 300-360 °C, y la gasificación de la lignina ocurre en dos intervalos de temperatura, de 200-400 °C y de 600-700 °C. Cabe mencionar que la temperatura de gasificación de la hemicelulosa (~360°C) fue obtenida de la literatura (Monteiro *et al.* 2012), debido a la falta de un estándar específico.

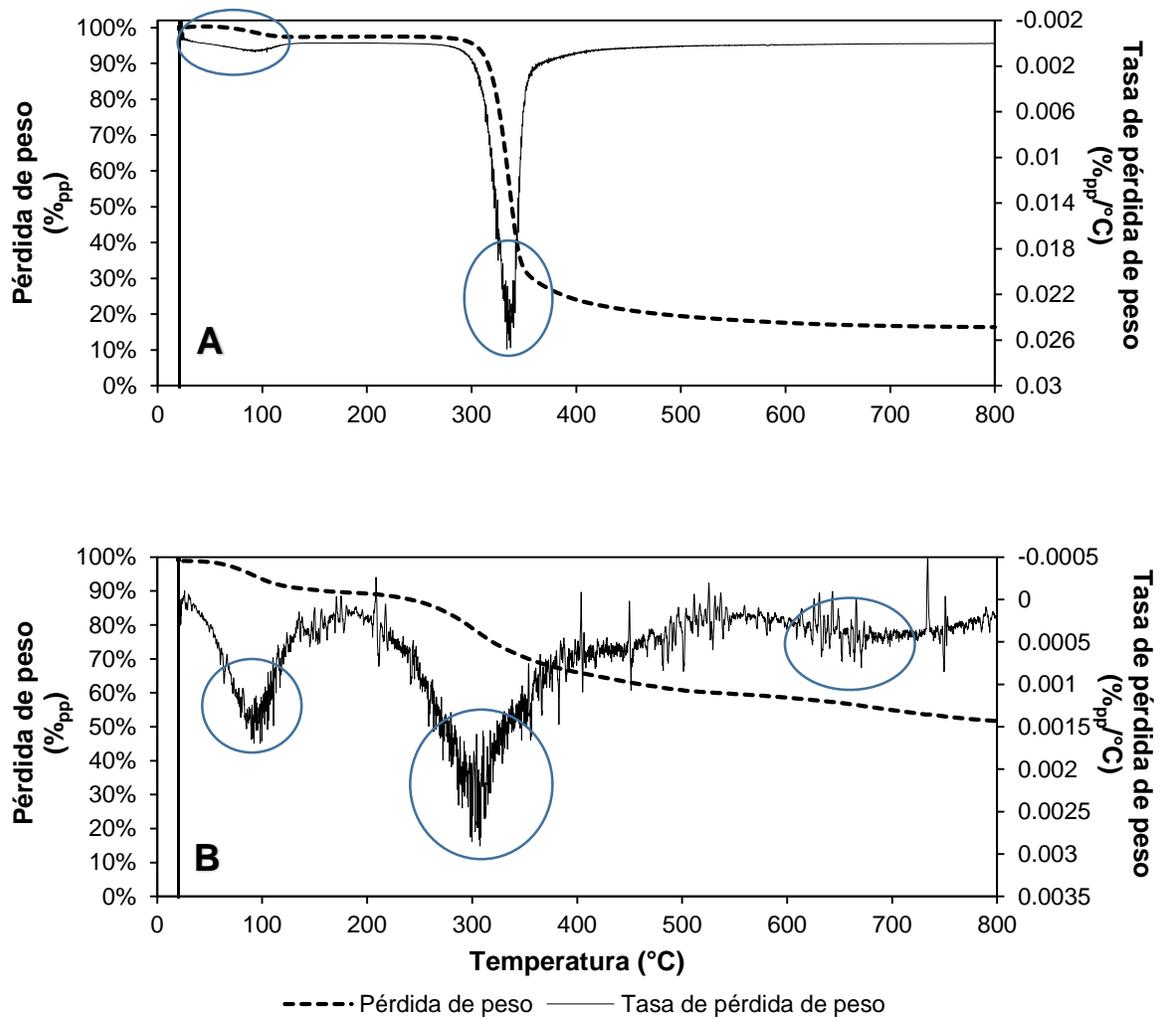


Figura 4.1 Termogramas obtenidos de los estándares de celulosa microcristalina (A) y lignina (B). Los círculos indican las temperaturas de gasificación de algunos compuestos contenidos en las muestras analizadas.

Los resultados de los termogramas obtenidos de las fracciones sólidas tratadas y no tratadas se muestran en la Figura 4.2. En el termograma de bagazo sin pretratamiento se observa la pérdida de peso de cinco compuestos distintos en diferentes intervalos de temperatura, lo cual significa que esos compuestos se gasificaron en esos intervalos de temperatura.

La primera pérdida de peso se observó en un intervalo de temperatura de 20 a 120°C, el cual corresponde a la pérdida de la humedad (Monteiro *et al.* 2012) y su porcentaje de pérdida de peso fue del 5%. Cabe mencionar que este porcentaje se

restó a la masa inicial de la muestra de bagazo sin pretratamiento durante la realización del balance de masa, puesto que fue expresado en peso seco.

La segunda pérdida de peso se observó en un intervalo de temperatura de 220 °C a 300°C, éste corresponde a la gasificación de pequeños compuestos fenólicos a partir de la escisión de los enlaces β -éter y de las cadenas laterales del polímero de lignina (Zhou *et al.* 2016). Posteriormente, la tercera gasificación aparece en un intervalo de temperatura de 305 °C a 360 °C, éste corresponde a la gasificación de la celulosa (Monteiro *et al.* 2012). Lo que se consideró como una cuarta gasificación se observa en el intervalo de temperatura de 360 °C a 530 °C, éste corresponde a la hemicelulosa (Monteiro *et al.* 2012). Por último, la quinta pérdida de peso se observa en el intervalo de temperatura de 610 a 670 °C, y éste corresponde a la gasificación de una lignina más termoestable (Zhou *et al.* 2016).

Además, al comparar los termogramas de las muestras de bagazo pretratado a 1.5 h, 6 h y del bagazo sin pretratamiento (Figura 4.2), se observa que no se presenta la gasificación de la lignina en el intervalo de temperatura de 250-300°C en los termogramas de las muestras de bagazo pretratado (a 1.5 y 6 h), lo cual sugiere que el pretratamiento con PHA fue efectivo. No obstante, sigue presente la lignina más termoestable, ya que en ambos termogramas se presenta una pérdida de peso en el intervalo de temperatura de 610 a 670°C (Zhou *et al.* 2016).

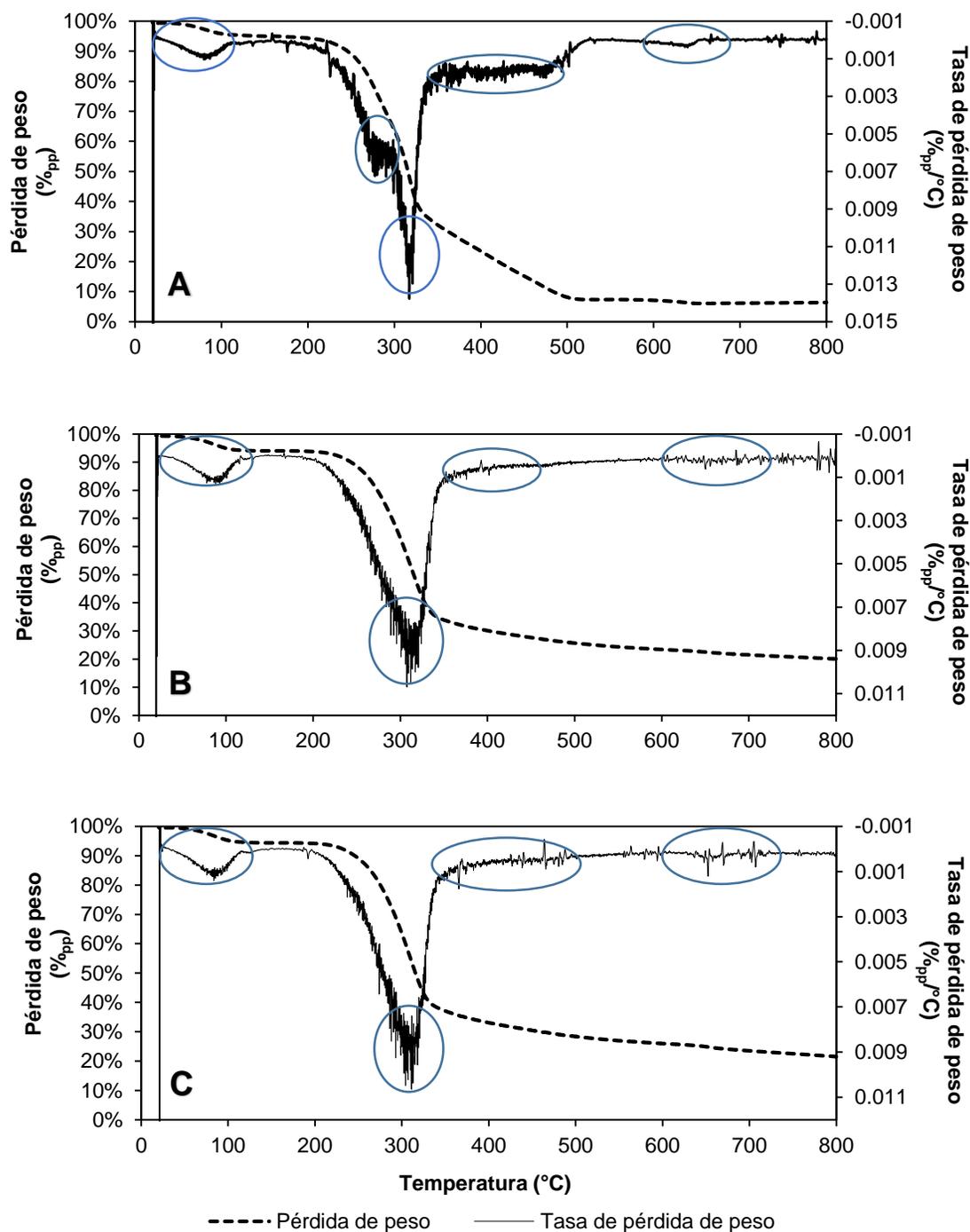


Figura 4.2 Termogramas obtenidos de las muestras de bagazo de agave sin pretratamiento (A) y pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino a 1.5 h (B) y 6 h (C). Los círculos indican las temperaturas de gasificación de cada compuesto contenido en la muestra analizada.

La caracterización de las muestras de bagazo de *A. tequilana* sin pretratamiento y pretratado con PHA a 1.5 h y 6 h, se muestra en la Tabla 4.1. Se presentan los porcentajes de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas obtenidos mediante el análisis de la pérdida de peso a partir de los termogramas de la Figura 4.2. Como se observa, el porcentaje de lignina disminuyó considerablemente lo cual confirma que el pretratamiento fue efectivo. Por otro lado, hubo un enriquecimiento en el porcentaje de holocelulosa en el caso del bagazo pretratado a 1.5 h y 6 h comparado con el bagazo sin pretratamiento, puesto que la suma de los porcentajes de celulosa y hemicelulosa (holocelulosa) es mayor en las muestras de bagazo pretratado comparado con las muestras de bagazo sin pretratamiento. Lo anterior, se debe a que el análisis se lleva a cabo en términos de porcentajes, por lo que, al disminuir considerablemente el porcentaje de la lignina, incrementa en gran medida el porcentaje de estas dos fracciones. Estos porcentajes son de utilidad al aplicarlos a la masa del bagazo inicial y a la masa final del bagazo pretratado, lo que permite calcular el balance de masa.

Tabla 4.1 Porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina obtenidos en el bagazo de *A. tequilana* sin pretratamiento y después del pretratamiento a 1.5 y 6 h.

Muestra	Holocelulosa		Lignina (%)	Cenizas (%)
	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)		
Bagazo sin pretratamiento	25	31	39	5
Bagazo pretratado 1.5 h	61	11	2	20
Bagazo pretratado 6 h	53	17	4	21

Por otro lado, los resultados del análisis de COT de las fracciones líquidas muestran que hubo una remoción de carbono de 56% para el tiempo de reacción de 1.5 h y de 53% para el tiempo reacción de 6 h (Tabla 4.2). Esto sugiere que tales porcentajes de COT corresponden a la lignina removida del bagazo inicial.

Tabla 4.2. Resultados obtenidos de la determinación de carbono orgánico total en las muestras de bagazo con y sin pretratamiento, así como de los residuos líquidos generados en el pretratamiento a 1.5 y 6 h.

Tratamiento	Entradas		Salidas (g COT)			Balance	
	Sustrato inicial (g bagazo)	g COT equivalentes	Fracción sólida recuperada	Residuo líquido	Lavados	Suma (g COT)	%
1.5 h	20	10.44	5.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.8	10.3	98.9
6 h			5.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.1 ± 1.1	10.4	99.3

El balance de masa del pretratamiento del bagazo de *A. tequilana* con peróxido de hidrógeno alcalino (Figura 4.3), se elaboró con base en los porcentajes de pérdida de peso obtenidos en los análisis de TGA (Tabla 4.1) y de carbono orgánico total (Tabla 4.2). Los resultados demuestran que después de aplicar el pretratamiento con PHA durante 1.5 h se logró recuperar 88% de holocelulosa y deslignificar el bagazo hasta en 97%, esto con respecto a la masa inicial de estas fracciones contenidas en el bagazo sin pretratamiento. Por otro lado, después de aplicar el pretratamiento con PHA a 6 h se logró recuperar 83% de holocelulosa y deslignificar el bagazo hasta en un 93%. Lo anterior, parece indicar que existe un efecto del tiempo de reacción en el pretratamiento con PHA. No obstante, la prueba estadística de t-student con un nivel de confianza de 95%, muestra que no existe diferencia significativa entre los tiempos de reacción evaluados en el pretratamiento con PHA; por lo tanto, se seleccionó el tiempo de reacción más corto de 1.5 h.

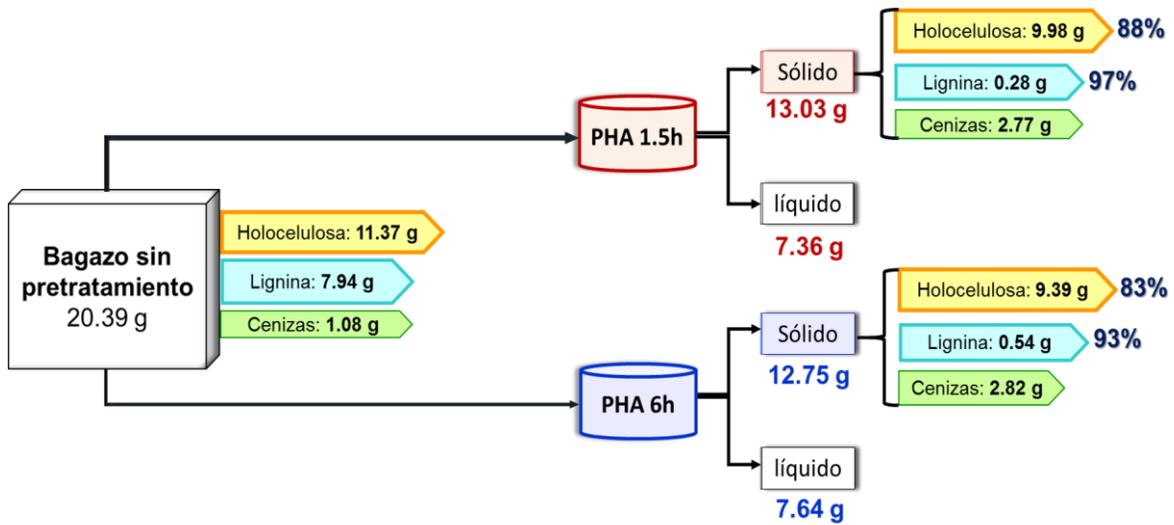


Figura 4.3. Balance de masa con base en los porcentajes de pérdida de peso obtenidos antes y después del pretratamiento del bagazo de *A. tequilana* con PHA durante 1.5 y 6 h determinados mediante termogravimetría y COT de las fracciones sólida y líquida obtenidas, respectivamente.

El porcentaje de deslignificación del pretratamiento sugiere que ocurrió una oxidación significativa de la lignina debida a la acción de los radicales libres hidroxilo (OH^\cdot) y superóxido (O_2^\cdot) y el anión hidroperóxido (HOO^-), formados en el medio alcalino (Su *et al.* 2015; Sun *et al.* 2001). Los radicales y el anión rompen los enlaces éster y éter entre la lignina y la hemicelulosa, y oxidan directamente las cadenas laterales de la lignina. En la Figura 4.4, se muestra de manera gráfica los cambios físicos que se presentaron en el bagazo de *A. tequilana* con y sin pretratamiento.

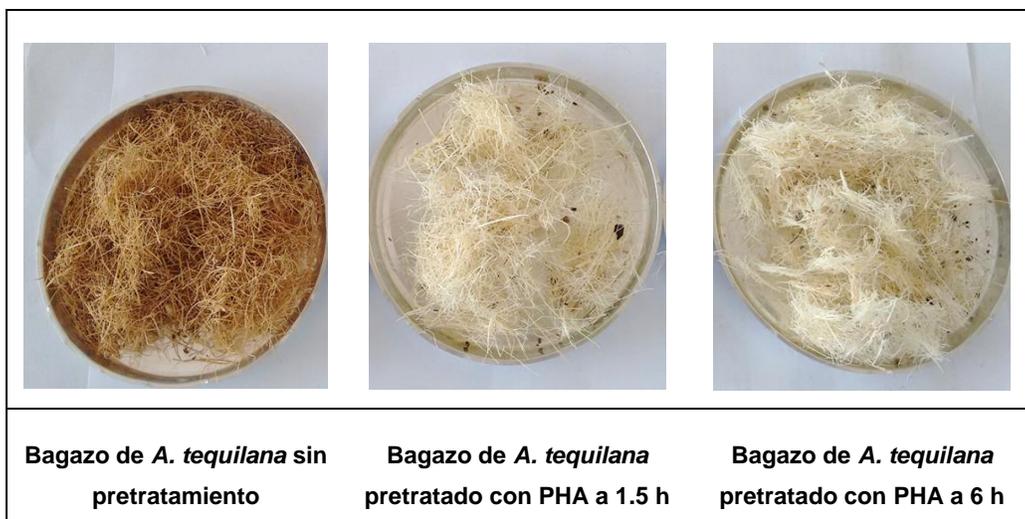


Figura 4.4 Comparación de cambios físicos obtenidos en el bagazo de *A. tequilana* sin pretratamiento y pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino a 1.5 y 6 h.

Los porcentajes de deslignificación obtenidos en este trabajo son mayores al porcentaje reportado por Velázquez-Valadez *et al.* (2016), el cual fue de 82.6% empleando un proceso secuencial con NaOH y H₂O₂ al 6%. Las diferencias encontradas con respecto a ese trabajo sugieren que durante el segundo paso del pretratamiento secuencial no se ajustó el pH (hasta 11.5) por lo que no hubo una liberación suficiente de radicales hidroxilos (°OH) e hidroperoxilos (°OOH) que atacaran a la lignina, reflejándose en un porcentaje de deslignificación más bajo a los obtenidos en el presente estudio.

4.2 Efecto del uso de mezclas enzimáticas e hidrólisis secuenciales en la sacarificación del bagazo de *A. tequilana* pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino

Una vez obtenido el tiempo de reacción adecuado para el pretratamiento con PHA del bagazo de *A. tequilana* (1.5 h), toda la fibra utilizada en la etapa 2 de la estrategia experimental fue pretratada bajo las condiciones descritas en la sección 3.4.

Los resultados de los tratamientos de hidrólisis con enzimas individuales se muestran en la Tabla 4.3. Los azúcares totales obtenidos con las enzimas individuales muestran que, a pesar del pretratamiento y el uso de un tipo de enzima, no se logra un porcentaje de sacarificación importante (24.4 % con celulasa y 7.1%

con hemicelulasa). Es por ello que se decidió evaluar un tratamiento de hidrólisis con mezclas e hidrólisis secuenciales, combinando ambas enzimas.

Tabla 4.3 Concentración de azúcares totales y demanda química de oxígeno obtenidas en las hidrólisis con enzimas individuales.

Tratamiento	Azúcares totales (g/L)	DQO (g/L)	Rendimiento (mg AT/g bagazo)	% Sacarificación
Celulasa	9.5 ± 0.9	18.1 ± 0.3	173.74 ± 17.1	24.4 ± 2.4
Hemicelulasa	4.7 ± 0.1	12.78 ± 0.3	50.73 ± 0.9	7.1 ± 0.1

4.2.1 Evaluación de las mejores condiciones para la hidrólisis con mezcla

Antes de llevar a cabo el tratamiento de hidrólisis con la mezcla de enzimas celulasa más hemicelulasa se evaluaron distintas condiciones de hidrólisis mediante dos diseños de experimentos tal como se especificó en la sección 3.5.3. El primero fue un diseño factorial de Plackett-Burman y el segundo fue un diseño compuesto central. Los resultados del diseño factorial de Plackett Burman se representan mediante un diagrama de Pareto (Figura 4.5), en el cual se indican los factores que tienen un efecto significativo en la evaluación de las condiciones de hidrólisis con la mezcla, que en este caso fueron la concentración de sustrato, la concentración de enzima celulasa y el pH.

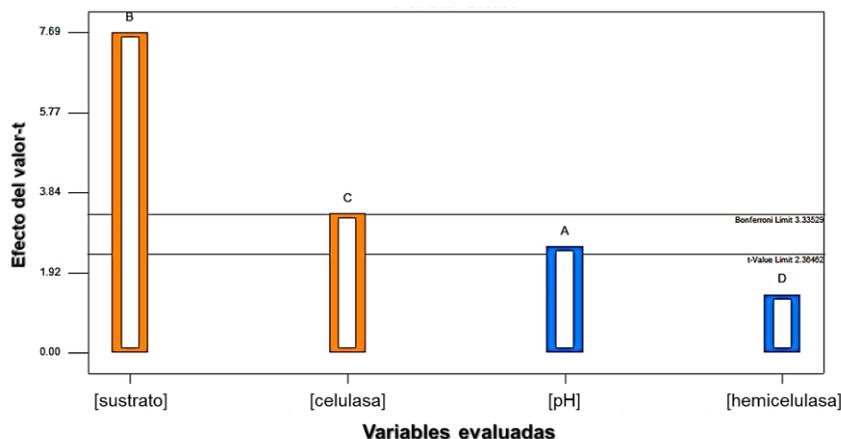


Figura 4.5 Diagrama de Pareto obtenido mediante el diseño factorial de Plackett-Burman en el cual se representan los factores significativos a evaluarse en un diseño central compuesto.

El color naranja de los factores de concentración de sustrato y enzima celulasa mostrado en el diagrama de Pareto (Figura 4.5), indicó que entre mayor sea el valor de estos factores se obtendría una mayor concentración de azúcares totales. Mientras que el color azul de los factores pH y concentración de la enzima hemicelulasa indicó que entre menor sea el valor de estos factores se obtendría una mayor concentración de azúcares totales. Con base en lo anterior, los factores y niveles que se evaluaron en el diseño central compuesto se muestran en la Tabla 3.3. Asimismo, se decidió fijar la concentración de proteína de la enzima hemicelulasa con el valor mínimo, el cual fue de 0.1 mg proteína/mL de buffer; ya que la concentración de hemicelulasa no tuvo un efecto significativo en el diseño de Plackett-Burman.

El diseño central compuesto arrojó 16 ensayos (Anexo 1), los cuales fueron evaluados mediante la metodología de superficie de respuesta, evaluando los azúcares totales y el rendimiento de sacarificación (Figura 4.6 y 4.7).

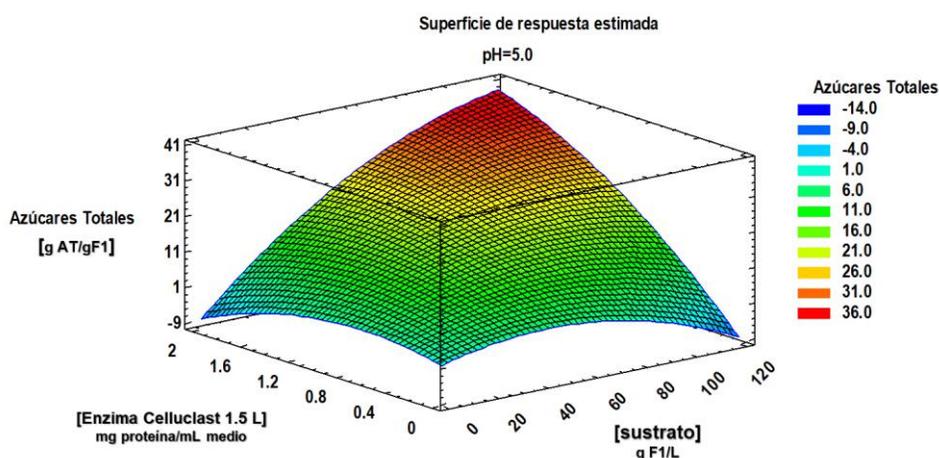


Figura 4.6. Modelo de superficie de respuesta de la concentración de azúcares totales (g AT/L), variando la concentración de sustrato (g F1/L) y la concentración de enzima Celluclast 1.5L (mg proteína/mL buffer), evaluados a una temperatura de 40 °C y pH 5.

Los ANOVAS obtenidos muestran que la variabilidad de los resultados de la concentración de azúcares totales se explica en un 93% (Anexo 2), y para el caso de los resultados de los rendimientos se explica en un 82% (Anexo 3).

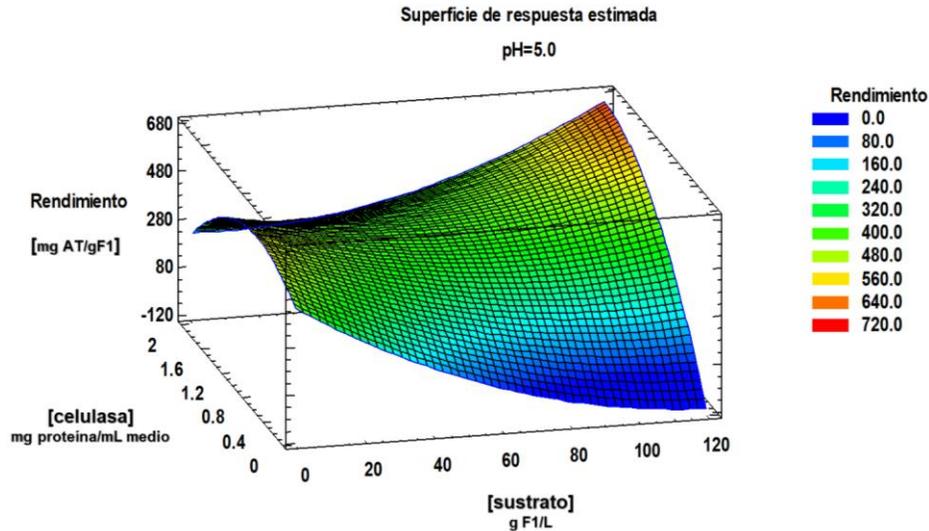


Figura 4.7. Modelo de superficie de respuesta del rendimiento (mg AT/g F1), variando la concentración de sustrato (g F1/L) y la concentración de enzima Celluclast 1.5L (mg proteína/mL buffer), evaluados a una temperatura de 40 °C y pH 5.

Las superficies de respuesta indican que utilizando la mayor concentración de sustrato y de enzima celulasa (Celluclast 1.5 L) se obtiene la mayor concentración de azúcares totales y el mayor rendimiento de sacarificación. Estas condiciones fueron evaluadas y los resultados de azúcares totales y rendimiento de sacarificación se muestran en la Tabla 4.4. No obstante, los valores predichos por el modelo para ambas variables de respuesta fueron mayores en comparación con los obtenidos experimentalmente. Esto puede deberse a que las mejores condiciones se encontraron en los puntos axiales evaluados en el diseño de composición central.

Por otro lado, al evaluar las condiciones que arroja el modelo (Tabla 4.4) se presentaron problemas de agitación debido a las altas concentraciones de sustrato utilizadas. Esto ya ha sido reportado por Gómez-Tovar, (2008) en donde menciona que utilizar altas concentraciones de sustrato ocasiona problemas de agitación durante la hidrólisis, resultando en una concentración de azúcares baja en comparación con lo predicho por el modelo estadístico.

Tabla 4.4 Condiciones que predicen los máximos valores de azúcares totales y rendimiento para la hidrólisis enzimática arrojadas por el diseño central compuesto, evaluado en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II.

Variable de respuesta evaluada	[Sustrato] (g/L)	[Celulasa] (mg proteína/mL)	[Hemicelulasa] (mg proteína/mL)	pH	Valores predichos por el modelo	Valores experimentales
Concentración de azúcares totales	100.45	1.84	0.1	4.16	41.4 g AT/L	26.4 g AT/L
Rendimiento	100.45	1.84		5.84	424.6 mg AT/g F1	279 mg AT/g F1

Debido a lo anterior, se decidió seleccionar otra condición evaluada en los diferentes ensayos que arrojó el diseño de composición central (Anexo 1), con la cual se obtuvo el mejor rendimiento de sacarificación y se utilizó una menor concentración de bagazo pretratado. Las condiciones seleccionadas y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Condiciones de hidrólisis seleccionadas para la mezcla de enzimas a partir de los ensayos arrojados por el diseño central compuesto.

[Sustrato] (g/L)	[Celulasa] (mg proteína/mL)	[Hemicelulasa] (mg proteína/mL)	pH	[azúcares totales]	Rendimiento
50	1.84	0.1	5	21.81 g AT/L	436 mg AT/g F1

4.2.2 Tratamientos enzimáticos

En la Figura 4.8 se muestran las concentraciones de azúcares totales y DQO_{sol} obtenidas en los cinco tratamientos evaluados. Estos resultados son los valores netos obtenidos en cada determinación, es decir, a los valores obtenidos de AT y DQO_{sol} del hidrolizado se les restó la contribución de AT y DQO_{sol} de las enzimas. Como se observa, los resultados de la mezcla (celulasa + hemicelulasa) y los de la hidrólisis secuencial (hemicelulasa \rightarrow celulasa) son equivalentes. Esto sugiere que, efectivamente, a pesar de haber eliminado a la lignina, el acceso a la celulosa continúa obstaculizado debido a la presencia de la hemicelulosa y, a su vez, sugiere

que el uso de enzimas accesorias, como la hemicelulasa es suficiente para superar esta problemática (Van Dyk & Pletschke, 2012; Várnai *et al.* 2011).

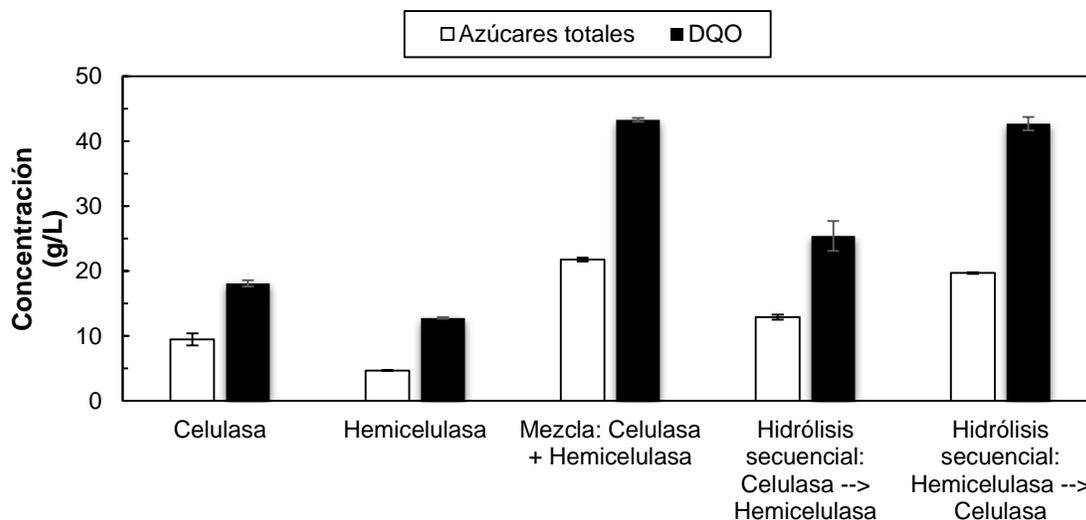


Figura 4.8 Concentraciones de azúcares totales y DQO_{sol} obtenidas en los tratamientos evaluados durante la etapa de hidrólisis enzimática.

En la Tabla 4.6 se muestran los rendimientos, productividades y porcentajes de sacarificación obtenidos en los cinco tratamientos evaluados durante la segunda etapa de la estrategia experimental. Como se observa el tratamiento con un mejor rendimiento y porcentaje de sacarificación fue la hidrólisis secuencial Hemicelulasa → Celulasa, seguido del tratamiento con la mezcla de enzimas celulasa más hemicelulasa. Comparando estos tratamientos con las hidrólisis individuales, es decir, sólo utilizando celulasa o hemicelulasa, se observa un incremento importante en el rendimiento y porcentaje de sacarificación. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Selig *et al.* (2009), en donde se observa un incremento en la conversión de glucanos una vez que el material lignocelulósico es tratado con enzimas hemicelulolíticas y celulolíticas. Por lo tanto, se sugiere que al utilizar mezclas enzimáticas e hidrólisis secuenciales con actividades celulolíticas y hemicelulolíticas se logra la escisión de diversos enlaces en la estructura de la hemicelulosa y, por consiguiente, un incremento en la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas y una mayor conversión de glucosa y xilosa (Kumar & Wyman, 2009).

Tabla 4.6 Rendimientos, porcentajes de sacarificación y productividades obtenidos en cada tratamiento de hidrólisis enzimática evaluado durante la etapa 2.

Tratamiento	Rendimiento (mg AT/g Bagazo)*	Eficiencia de recuperación (mg AT/g holocelulosa)	Productividad (mg AT/g bagazo-h)*	Sacarificación (%)	Grado de sinergismo
Celulasa	173.4 ± 17.1	237.9 ± 23.4	14.5 ± 1.4	24.4 ± 2.4	NA
Hemicelulasa	50.73 ± 0.9	69.6 ± 1.2	4.2 ± 0.1	7.1 ± 0.1	NA
Celulasa + Hemicelulasa	292.1 ± 4.7	400 ± 2.4	24.3 ± 0.2	39.2 ± 0.2	1.5
Celulasa → Hemicelulasa	211.07 ± 15	288.3 ± 20.4	8.8 ± 0.8	29.6 ± 2.1	NA
Hemicelulasa → Celulasa	305.68 ± 7.4	417.5 ± 10.1	12.7 ± 0.4	42.8 ± 1	NA

*Valores calculados a partir de los resultados netos de los azúcares totales obtenidos en cada tratamiento, restando la contribución de las enzimas.

NA: No aplica

No obstante, es importante resaltar que en los tratamientos de hidrólisis secuenciales el tiempo de incubación requerido se duplica a 24 h, a diferencia de los otros tratamientos con enzimas individuales y en mezclas, en los que se emplea un periodo de incubación de 12 h. Por lo tanto, al hacer un análisis de las productividades obtenidas, es claro que el tratamiento con la mezcla enzimática es mucho más efectivo, 24.3 ± 0.2 mg AT/g bagazo-h.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en esta tesis con los reportados en la literatura se observa que se logró un incremento significativo en la producción de azúcares totales (Tabla 4.7). Estas diferencias en productividad, se deben al uso de una mezcla de enzimas, a excepción del trabajo de Velázquez-Valadez *et al.* (2016), en el cual también utilizaron una mezcla de enzimas. Las diferencias entre las productividades obtenidas por esos autores y esta tesis se deben a los porcentajes de deslignificación obtenidos en ambos estudios.

Tabla 4.7 Comparación de los porcentajes de deslignificación y productividades de bagazo de agave reportadas en la literatura.

Trabajos realizados	Deslignificación (%)	Productividad (mg AT/g bagazo-h)
Velázquez-Valadez et al. 2016	82.6	12.2 ± 3
Saucedo-Luna et al. 2010	-	6.3 ± 2
López-Gutiérrez, 2015	-	17.2 ± 2
Este trabajo	97	24.3 ± 0.2

Asimismo, se determinó que existe actividad sinérgica en la mezcla de enzimas utilizadas ya que se obtuvo un cociente mayor a 1, tal como se observa en la Tabla 4.7. Este resultado es interesante, debido a que en un tratamiento de hidrólisis enzimática industrial para biomasa lignocelulósica es necesario implementar mezclas enzimáticas que presenten un comportamiento sinérgico, con el fin de utilizar el mínimo número de enzimas que logren maximizar dicho proceso de hidrólisis (Meyer *et al.* 2009). Además, se ha reportado que para establecer una mezcla enzimática es necesario contar con enzimas base, como las celobiohidrolasas, la endoglucanasa y la β -glucosidasa y, posteriormente, adicionar enzimas accesorias, como la endo- β -1,4-xilanasa y la β -xilosidasa, entre otras (Banerjee *et al.* 2010). Lo anterior sugiere que la mezcla enzimática utilizada en esta investigación fue adecuada para llevar a cabo una hidrólisis eficiente, puesto que se incluyeron los tres tipos de enzimas base, descritas anteriormente, y como enzima accesoria la endo- β -1,4-xilanasa contenida en la mezcla comercial utilizada como hemicelulasa. Además, cabe mencionar que no se encontraron compuestos inhibitorios en el hidrolizado, ya que se midió la concentración de compuestos derivados de furanos (furfural e hidroximetilfurfural) y de compuestos fenólicos (vanilina y siringaldehído), siendo nulas.

4.2.3 Hidrólisis enzimática en reactor

Una vez seleccionado el mejor tratamiento de hidrólisis enzimática en términos de productividad (tratamiento de hidrólisis con la mezcla enzimática), se prepararon 6

L de hidrolizado en un reactor con un volumen de trabajo de 10 L y con agitación mecánica, bajo las condiciones de hidrólisis seleccionadas (Tabla 4.8).

Tabla 4.8 Condiciones utilizadas durante la hidrólisis con mezclas enzimáticas.

Factores	Valores	Unidades
[S]	50	g/L
Temperatura	40	°C
Velocidad de agitación	120	rpm
pH	5	-
[Celulasa]	1.84	mg proteína/mL medio
[Hemicelulasa]	0.1	mg proteína/mL medio
Tiempo de incubación	12	h
Buffer citratos	50	mM

El hidrolizado se caracterizó mediante la determinación de azúcares totales y DQO_{sol} , los valores obtenidos fueron de 27.2 ± 1.2 g/L y 45.1 ± 1.6 g/L, respectivamente. A partir de estas concentraciones, se calcularon los porcentajes de contribución para cada elemento que compone el hidrolizado: fracción 1 (F1, bagazo pretratado con PHA a 1.5 h), enzima y mezcla (F1 + enzima), los cuales se muestran en la Tabla 4.9. Comparando las concentraciones de azúcares totales y DQO obtenidas en los ensayos con matraz (21.78 g AT/L y 43.28 g DQO/L, respectivamente) y en el reactor, se puede observar que existe un ligero incremento en ambas concentraciones, lo cual sugiere que la agitación que se generó durante la hidrólisis en reactor logró una mayor liberación de los azúcares contenidos en las fibras de bagazo pretratado, probablemente debido al mayor contacto que hubo entre la enzima y el bagazo pretratado. Además, se sugiere que la disminución del tamaño de partícula del material, propiciado por la agitación mecánica, incrementó el área de contacto para la acción de las enzimas y por consiguiente aumentó la concentración de azúcares liberados.

Tabla 4.9 Composición del hidrolizado enzimático producido en el reactor en lote.

Elemento	Concentración azúcares totales (g AT/L)	Contribución de azúcares totales (%)	Concentración DQO (g DQO/L)	Contribución de DQO (%)
Hidrolizado enzimático	27.2 ± 1.2	79	45.1 ± 1.6	80
Enzima	5.8 ± 0.4	17	7.3 ± 0.5	13
Bagazo pretratado (F1)	1.4 ± 0.2	4	4.0 ± 0.8	7
Total	34.4 ± 1.2	100	56.4 ± 1.6	100

4.3 Pruebas de producción de hidrógeno en lote

Los resultados obtenidos en los ensayos de producción de hidrógeno en lote a partir del hidrolizado del tratamiento con la mezcla enzimática (celulasa + hemicelulasa) se muestran en la Figura 4.9. Éste produjo un volumen acumulado de hidrógeno de 1370.6 ± 39.3 mL H₂/L en tan solo 64 h.

Por otro lado, el control endógeno evaluado en los ensayos de producción de hidrógeno no produjo un volumen acumulado de hidrógeno superior a los 9 mL, por lo que el contador de volumen acumulado del equipo del AMPTS II no logró registrarlo, descartándose dicho control.

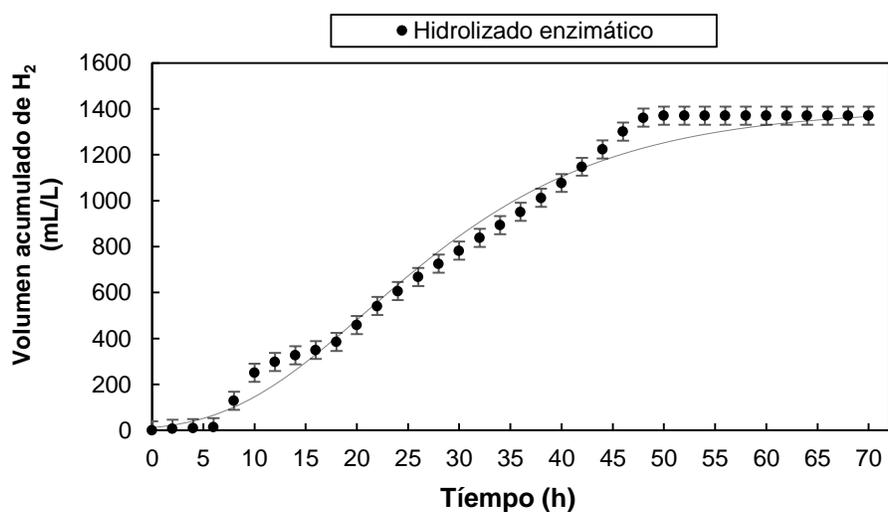


Figura 4.9 Producción acumulada de hidrógeno en lote a partir del hidrolizado obtenido del tratamiento con la mezcla de enzimas: celulasa más hemicelulasa.

En la Tabla 4.10 se muestran los parámetros cinéticos calculados a partir de la ecuación modificada de Gompertz (rendimiento molar de hidrógeno, RMH; velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, VVPH; volumen máximo acumulado de producción de hidrógeno, Hmax; y la fase lag, λ), así como el rendimiento del proceso y el pH obtenido al final de los ensayos. Los resultados demuestran que al utilizar un hidrolizado enzimático producido a partir de un tratamiento con mezcla de enzimas es posible incrementar 2.5 veces la producción de hidrógeno por kg de bagazo, en comparación con un hidrolizado proveniente de un tratamiento con un solo tipo de enzima (Tabla 4.11). Asimismo, fue posible incrementar ligeramente los rendimientos molares en comparación con los reportados en el trabajo de López-Gutiérrez, (2015), donde utilizaron un solo tipo de enzima. Lo anterior demuestra que la deslignificación del bagazo de *A. tequilana* y la hidrólisis del mismo con una mezcla de enzimas tuvo un efecto positivo en los rendimientos molares y globales de la producción de hidrógeno.

Tabla 4.10 Parámetros cinéticos calculados mediante la ecuación de Gompertz para los ensayos de producción de hidrógeno a partir del hidrolizado obtenido del tratamiento con la mezcla de enzimas.

Muestra	Hmax (mL/L)	VVPH (mL H ₂ /L-h)	RMH (mol H ₂ / mol AT consumido)	Rendimiento proceso (L H ₂ /kg bagazo)	λ (h)	pH final
Hidrolizado enzimático	1401.6±13	38.67±0.9	3.0±0.12	123±13	7.6±1.3	5.23±0.1
López- Gutiérrez, 2015	2687±9.5	99.7±6.5	2.89±0.3	49±0.01	11±1.7	6.33±0.1

Por otro lado, los metabolitos generados durante la cinética de producción de hidrógeno (Tabla 4.11) fueron únicamente acetato y butirato. Motte *et al.* (2014) propusieron una relación molar de H₂/(Ac+Bu) como un indicador de consumo de H₂ en cultivos mixtos, donde relaciones con coeficientes menores a 2 sugieren la presencia de otras rutas metabólicas en las que se consume H₂ (Contreras-Dávila, 2015). En este sentido, se calculó dicha relación para los ensayos con hidrolizado enzimático de esta investigación obteniéndose un valor de 2.5, lo cual sugiere que

no se favorecieron rutas metabólicas consumidoras de hidrógeno, lográndose un proceso eficiente.

Tabla 4.11 Ácidos grasos volátiles producidos durante la cinética de producción hidrógeno en lote.

Muestra	Acético (mg/L)	Láctico (mg/L)	Butírico (mg/L)
Hidrolizado enzimático	3453.2 ± 47.8	N.D.	3334 ± 26.6

N.D. = No detectado

Por último, en la Figura 4.10 se muestra el balance de equivalentes de electrones para los ensayos de producción de hidrógeno con hidrolizado enzimático. Se observó, que el mayor porcentaje de electrones fue destinado a la formación de butirato (39%), seguido de acetato (21%), los cuales favorecen las rutas metabólicas de producción de hidrógeno durante la fermentación oscura. Por otro lado, en el ensayo control de glucosa/xilosa, se observa que se destinó un mayor porcentaje de electrones a la formación de biomasa y otros compuestos no identificados, lo cual podría explicar tanto la menor producción de hidrógeno como los menores rendimientos molares obtenidos en comparación con el hidrolizado enzimático.

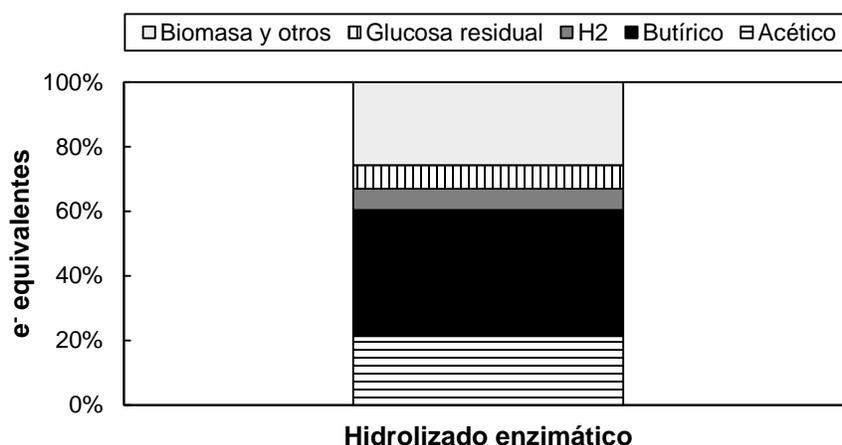


Figura 4.10 Balance de equivalentes de electrones generados durante la producción acumulada de hidrógeno en lote.

4.4 Pruebas de producción de metano en lote

Los resultados obtenidos en los ensayos de producción de metano en lote a partir del hidrolizado de la mezcla enzimática (celulasa más hemicelulasa) se muestran en la Figura 4.11. Éste produjo un volumen acumulado de metano de 411.94 ± 2.9 mL/L a las 76 h.

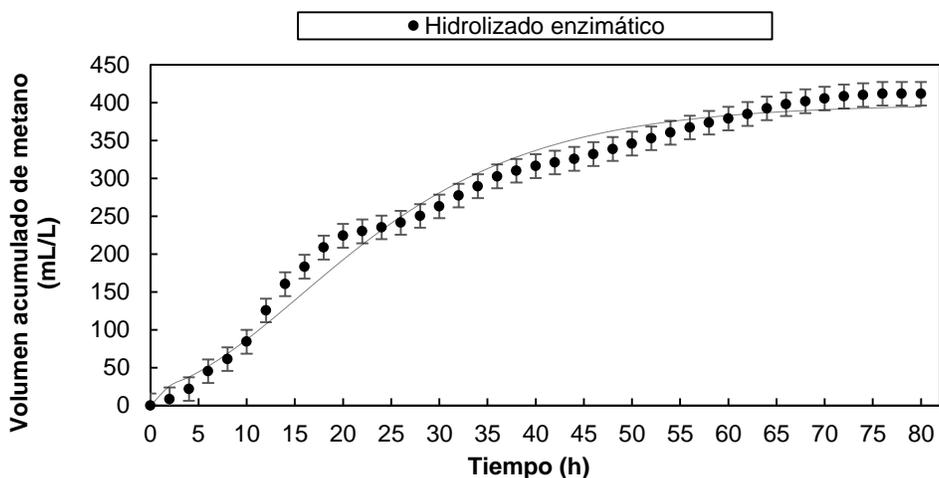


Figura 4.11 Producción acumulada de metano en lote a partir del hidrolizado obtenido del tratamiento con la mezcla de enzimas: celulasa más hemicelulasa.

En la Tabla 4.12 se muestran los parámetros cinéticos calculados a partir de la ecuación modificada de Gompertz (rendimiento, velocidad de producción, volumen máximo acumulado de metano: H_{max} y λ), así como el rendimiento del proceso y el pH obtenido al final de los ensayos. Como se puede observar, las mejoras alcanzadas en el hidrolizado enzimático obtenido en la segunda etapa no se reflejaron en los rendimientos obtenidos (en L CH_4 /g DQO añadido), en comparación con los reportados por Arreola-Vargas *et al.* (2016) y con el rendimiento teórico de metano, el cual es de 0.35 L CH_4 /g DQO.

Tabla 4.12 Parámetros cinéticos calculados mediante la ecuación de Gompertz para los ensayos de producción de metano a partir de los hidrolizados obtenidos del tratamiento enzimático con mezcla de enzimas.

Muestra	Hmax (L/L)	Velocidad de producción de metano (L CH ₄ /L-d)	Rendimiento (L CH ₄ /g DQO añadido)	Rendimiento proceso (L CH ₄ /Kg bagazo)	λ (h)	pH final
Hidrolizado enzimático	0.40±0.01	0.24±0.001	0.08±2	48±0.2	2.1±0.7	5.34±0.7
Arreola-Vargas, 2016	~0.7	0.48	0.09	80	~2	-

No obstante, al comparar los rendimientos globales obtenidos en los procesos evaluados por Arreola-Vargas *et al.* (2016) y en este trabajo, se observa que los resultados son muy cercanos, ya que bajo las condiciones de esta investigación se logró producir 80% de metano acumulado por kg de bagazo del producido en el trabajo de Arreola-Vargas *et al.* (2016). Las diferencias pueden deberse a que en ambos estudios se utilizaron concentraciones de DQO diferentes, siendo más alta (8 g DQO/L) en el estudio de Arreola-Vargas *et al.* (2016).

Por otro lado, los ácidos grasos generados que no se consumieron durante la metanogénesis se muestran en la Tabla 4.13. Los resultados sugieren que la digestión anaerobia pudo inhibirse por la acumulación de la alta concentración de propiónico generada durante el proceso, mayor a 900 mg/L que ha sido reportada como inhibitoria para el proceso de metanogénesis (Wang *et al.* 2009b). Asimismo, se ha reportado que la formación de subproductos como ácidos grasos de cadena larga pueden afectar la producción de metano (Arreola-Vargas *et al.* 2016). No obstante, dichos metabolitos no fueron determinados en este estudio.

Tabla 4.13 Ácidos grasos producidos durante la producción acumulada de metano en lote.

Muestra	Fórmico (mg/L)	Acético (mg/L)	Propiónico (mg/L)	Butírico (mg/L)
Hidrolizado enzimático	17.2±1.6	1353.6±14.1	1554.5±26.9	288.7±20.1

Finalmente, en la Figura 4.12 se muestra el balance de equivalentes de electrones para el ensayo con hidrolizado enzimático. Se observa que el mayor porcentaje de

electrones fue destinado a la producción de biomasa y otros compuestos no determinados (~50%). De 18 a 26% de los electrones disponibles permanece como glucosa residual, entre 6 y 10% se destinó a la formación de acético, entre 10 y 12 % a la formación de propiónico y 5% a la formación de butírico. Para la producción de metano sólo se destinó entre 5 y 6% de los electrones disponibles. El balance claramente indica que la metanogénesis no fue eficiente.

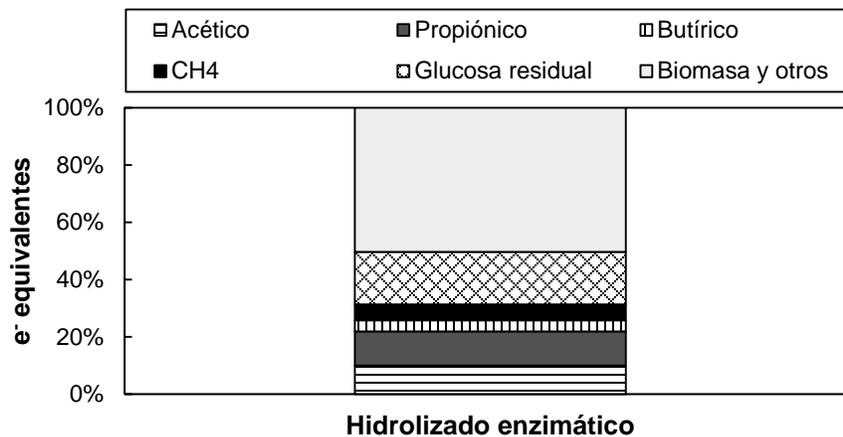


Figura 4.12 Balance de equivalentes de electrones generados durante la producción acumulada de metano en lote.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones

Los resultados del pretratamiento del bagazo de *A. tequilana* con peróxido de hidrógeno alcalino indicaron que es posible deslignificar al bagazo hasta en un 97%, recuperando hasta 88% de la holocelulosa contenida en el bagazo de agave. No obstante, no existe diferencia significativa entre los dos tiempos de reacción evaluados. Por lo tanto, se seleccionó el tiempo de 1.5 horas considerando la economía del proceso. De manera general, el proceso de deslignificación contribuyó a obtener fracciones de celulosa y hemicelulosa más disponibles para el ataque enzimático.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa de hidrólisis enzimática, al aplicar una mezcla de enzimas compuesta por celulasas y hemicelulasas durante el proceso, se logró incrementar tanto el rendimiento (292.1 ± 4.7 mg AT/g bagazo) como la productividad de sacarificación (24.3 ± 0.2 mg AT/g bagazo-h), a diferencia de los obtenidos en un proceso de hidrólisis con un sólo tipo de enzima (205 mg AT/g bagazo y 17 mg AT/g bagazo-h, respectivamente). Además, se determinó que las enzimas celulasas y hemicelulasas actuaron sinérgicamente durante la hidrólisis enzimática.

El hidrolizado obtenido del proceso de sacarificación con la mezcla enzimática mejoró el rendimiento molar del proceso de producción de hidrógeno en un 100% e incrementó 2.5 veces el rendimiento global de la producción de hidrógeno (123 L H₂/kg bagazo) en comparación con lo obtenido con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave sin pretratamiento e hidrolizado con un sólo tipo de enzima (49 L H₂/kg bagazo).

Aunque no es un resultado concluyente, el hidrolizado obtenido a partir de un proceso de hidrólisis con una mezcla de enzimas resultó no ser un sustrato adecuado para mejorar la producción de metano, puesto que los rendimientos del proceso fueron bajos. Se requieren más estudios al respecto.

5.2. Perspectivas

Con el fin de conocer los cambios morfológicos y estructurales que ocurren en el bagazo de *A. tequilana* durante el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino, así como el cambio en la cristalinidad de la celulosa del mismo, es necesario llevar a cabo un análisis de las fibras del bagazo con y sin pretratamiento mediante SEM y XRD.

Además, es importante caracterizar el bagazo de *A. tequilana* con y sin pretratamiento, mediante una metodología más precisa, tal como la propuesta por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, por sus siglas en inglés) para la determinación de carbohidratos estructurales y la lignina en la biomasa. Esto con el objetivo de conocer y cuantificar claramente la composición del bagazo de agave y tener balances y rendimientos específicos precisos.

Asimismo, es necesario caracterizar con mayor profundidad los hidrolizados obtenidos, para determinar la concentración de hexosas y pentosas (p.ej. xilosa, arabinosa, manosa, entre otras) y llevar a cabo la determinación de otros metabolitos de fermentación (p.ej. isobutírico, etanol, isopropiónico, entre otros). Esto con el objetivo de conocer los factores que pudieran inhibir los procesos de producción de hidrógeno o de metano.

Sería interesante analizar el tren de tratamiento utilizado en esta investigación desde una perspectiva técnico-económica y llevar a cabo los cálculos específicos que nos permitan conocer si un proceso global como el implementado en este trabajo sería factible a escala piloto o nivel industrial.

Por último, sería importante evaluar la producción de hidrógeno y/o metano en reactores en continuo con los hidrolizados obtenidos, a partir de bagazo pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino y sometido a una hidrólisis con una mezcla de enzimas (celulasa y hemicelulasa), con el fin de determinar las velocidades volumétricas y rendimientos y compararlos con hidrolizados obtenidos de una sola enzima.

REFERENCIAS

- Abreu Sherrer, J. (2013). *Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Andersen, N., Johansen, K. S., Michelsen, M., Stenby, E. H., Krogh, K. B. R. M., & Olsson, L. (2008). Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), 362–370. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.018>
- Angelidaki, Irini & Sanders, W. (2004). Assesment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/technology*, 3, 117–129.
- APHA. (1998). Total, Fixed, and Volatile Solids in Solid and Semisolid Samples (Method 2540 G). In *Standard methods for the examination of water and wastewater* (pp. 2–59).
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443–7459. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>
- Arreola-Vargas, J., Celis, L. B., Buitrón, G., Razo-Flores, E., & Alatríste-Mondragón, F. (2013). Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(32), 13884–13894. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.065>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(2), 897–904. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., Celis, L. B., & Alatríste-Mondragón, F. (2015a). Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: Role of hydrolysates constituents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 10756–10765. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.200>
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R. I., Alatríste-Mondragón, F., & Méndez-Acosta, H. O. (2015b). Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresource Technology*, 181, 191–199. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>
- Ayeni, A. O., Hymore, F. K., Mudliar, S. N., Deshmukh, S. C., Satpute, D. B., Omoleye, J. A., & Pandey, R. A. (2013). Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: Process parameters optimization using response surface methodology. *Fuel*, 106, 187–194. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.12.078>
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J. S., Borrusch, M. S., Bongers, M., & Walton, J. D. (2010). Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 101(23), 9097–9105. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.028>
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., & Saddler, J. (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*, 125(2), 198–209. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021>
- Buitrón, Germán; Carrillo, Julián; Alatríste, Felipe & Razo, E. (2016). BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS. In *Estado del arte de la bioenergía en México* (p. 105). <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.3556.2321>
- Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20–48. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.006>

- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2014). Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey. *Biomass and Bioenergy*, 63, 101–108. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.050>
- Cedeño-Cruz, M., & Alvarez-Jacobs, J. (1991). Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. *The Alcohol Textbook: A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries*, 225–242.
- Cendales, E., & Jiménez, S. (2014). Modelamiento computacional de la producción de energía renovable a partir del biogás mediante la codigestión anaeróbica de la mezcla de residuos cítricos y estiércol bovino. *Revista EAN*, (77), 42–63.
- Cifuentes-López, R. (2016). *Estudio de sacarificación enzimática del bagazo de Agave tequilana Weber var. azul. Proyecto terminal UASLP.*
- Contreras-Dávila, C. A. (2015). Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de Agave tequilana Weber. . *Ciencias Ambientales, Tesis de Maestría.*
- Contreras-Dávila, C., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671–679. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Corona-González, R. I., Varela-Almanza, K. M., Arriola-Guevara, E., Martínez-Gómez, Á. de J., Pelayo-Ortiz, C., & Toriz, G. (2016). Bagasse hydrolyzates from Agave tequilana as substrates for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* in batch and repeated batch reactor. *Bioresource Technology*, 205, 15–23. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.081>
- Crespo, M. R., González, D. R., Rodríguez, R., Rendón, L. A., del Real, J. I., & Torres, 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.
- CRT. (2016). Consumo de Agave para tequila y tequila 100% de Agave., 2016. Retrieved from <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatraste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(1), 27–45. <http://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009a). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296–4304. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>
- DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <http://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eriksson, T., Karlsson, J., & Tjerneld, F. (2002). A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (cel7A) and endoglucanase I (cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101(1), 41–60. <http://doi.org/10.1385/ABAB:101:1:41>
- Fang, H. H. P., Li, C., & Zhang, T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry.

- Gao, D., Uppugundla, N., Chundawat, S. P., Yu, X., Hermanson, S., Gowda, K., ... Dale, B. E. (2011). Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 5. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-4-5>
- Gómez-Tovar. (2008). *Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano Tesis que presenta IBQ . Francisco Gómez Tovar*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Retrieved from <http://intranet.ipicyt.edu.mx/posgrado/tesis/060205GomezTovar.pdf>
- Gould, J. M. (1984). Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(1), 46–52. <http://doi.org/10.1002/bit.260260110>
- Gould, J. M. (1985). Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(6), 893–6. <http://doi.org/10.1002/bit.260270622>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Hernández-Salas, J. M., Villa-Ramírez, M. S., Veloz-Rendón, J. S., Rivera-Hernández, K. N., González-César, R. A., Plascencia-Espinosa, M. A., & Trejo-Estrada, S. R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, 100(3), 1238–1245. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>
- Hidaka, H., Takizawa, T., Fujikawa, H., Ohneda, T., & Fukuzumi, T. (1984). A study on the inhibition of cellulolytic activities by lignin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 9(4), 367. <http://doi.org/10.1007/BF02798979>
- Howells, M., Hermann, S., Welsch, M., Bazilian, M., Segerström, R., Alfstad, T., ... Ramma, I. (2013). Integrated analysis of climate change, land-use, energy and water strategies. *Nature Climate Change*, 3(7), 621–626. <http://doi.org/10.1038/nclimate1789>
- Iñiguez-Covarrubias, G., Lange, S. E., & Rowell, R. M. (2001). Utilization of byproducts from the tequila industry: Part 1: Agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology*, 77(1), 25–32. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00137-1](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00137-1)
- Jung, H.-J. G., Jorgensen, M. a, Linn, J. G., & Engels, F. M. (2000). Impact of accessibility and chemical composition on cell wall polysaccharide degradability of maize and lucerne stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(June 1999), 419–427. [http://doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3<419::AID-JSFA544>3.0.CO;2-I](http://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3<419::AID-JSFA544>3.0.CO;2-I)
- Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2016). A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology*, 203, 348–356. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.035>
- Kestur G., S., Flores-Sahagun, T. H. S., Dos Santos, L. P., Dos Santos, J., Mazzaro, I., & Mikowski, A. (2013). Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 45, 153–161. <http://doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.09.001>
- Kim, Tae & Lee, Y. (2005). Pretreatment of Corn Stover by Soaking AND. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 121.
- Kumar, G., Bakonyi, P., Periyasamy, S., Kim, S. H., Nemestóthy, N., & Bélafi-Bakó, K. (2015). Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renewable and*

- Kumar, R., & Wyman, C. E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on hydrolysis of pretreated subst.pdf>. <http://doi.org/10.1021/bp.102>
- Li, M., Wang, J., Yang, Y., & Xie, G. (2016). Alkali-based pretreatments distinctively extract lignin and pectin for enhancing biomass saccharification by altering cellulose features in sugar-rich Jerusalem artichoke stem. *Bioresource Technology*, 208, 31–41. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.053>
- López-Gutiérrez, I. (2015). *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*. Instituto de Investigación Científica y Tecnológica.
- Ma, J., Zhao, Q.-B., Laurens, L. L. M., Jarvis, E. E., Nagle, N. J., Chen, S., & Frear, C. S. (2015). Mechanism, kinetics and microbiology of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion of algal biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 141. <http://doi.org/10.1186/s13068-015-0322-z>
- Merino, S. T., & Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(June), 95–120. http://doi.org/10.1007/10_2007_066
- Meyer, A. S., Rosgaard, L., & Sørensen, H. R. (2009). The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 337–344. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.010>
- Monteiro, S. N., Calado, V., Margem, F. M., & Rodriguez, R. J. S. (2012). Thermogravimetric Stability Behavior of Less Common Lignocellulosic Fibers - a Review. *Journal of Materials Research and Technology*, 1(3), 189–199. [http://doi.org/10.1016/S2238-7854\(12\)70032-7](http://doi.org/10.1016/S2238-7854(12)70032-7)
- Montiel, C., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., & Bárzana, E. (2016). Enhanced Bioethanol Production from Blue Agave Bagasse in a Combined Extrusion–Saccharification Process. *Bioenergy Research*, 1–10. <http://doi.org/10.1007/s12155-016-9747-x>
- Motte, J. C., Trably, E., Hamelin, Jérôme, Escudié, R., Bonnafous, A., Steyer, J. P., Dumas, C. (2014). Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. *Bioresource Technology*, 166, 610–615. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.078>
- Munguía-Aguilar, D. (2016). *Deslignificación de la penca de A. tequilana F.A.C. Weber empleando peróxido de hidrógeno alcalino como pretratamiento para la producción de biohidrógeno*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- O’Flaherty, V., Collins, G., & Mahony, T. (2006). The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5(1), 39–55. <http://doi.org/10.1007/s11157-005-5478-8>
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., & Tenkanen, M. (2004). Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 65–72. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.011>
- Perez-Pimienta, J. A., Flores-Gómez, C. A., Ruiz, H. A., Sathitsuksanoh, N., Balan, V., da Costa Sousa, L., Simmons, B. A. (2016). Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEX, autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments. *Bioresource Technology*, 211, 216–223. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.103>
- 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. *Bioresource Technology*, 127, 18–24. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.124>
- Perez-Pimienta, J. A., Poggi-Varaldo, H. M., Ponce-Noyola, T., Ramos-Valdivia, A. C., Chavez-Carvayar, J. A., Stavila, V., & Simmons, B. A. (2016). Fractional pretreatment of raw and calcium oxalate-extracted agave bagasse using ionic liquid and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 91, 48–55. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.001>
- Pérez-Pimienta, J. A., Vargas-Tah, A., López-Ortega, K. M., Medina-López, Y. N., Mendoza-Pérez, J. A., Avila, S., ... Martinez, A. (2017). Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology*, 225, 191–198. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.064>
- Qi, B., Chen, X., Su, Y., & Wan, Y. (2011). Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresource Technology*, 102(3), 2881–2889. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.092>
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Martinez-Pacheco, M. M., Sosa-Aguirre, C. R., & Campos-Garcia, J. (2011). Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(6), 725–732. <http://doi.org/10.1007/s10295-010-0853-z>
- Selig, M. J., Vinzant, T. B., Himmel, M. E., & Decker, S. R. (2009). The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155(1–3), 397–406. <http://doi.org/10.1007/s12010-008-8511-x>
- Singh, J., Suhag, M., & Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*, 117, 624–631. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
- Su, Y., Du, R., Guo, H., Cao, M., Wu, Q., Su, R., ... He, Z. (2015). Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. *Food and Bioprocess Processing*, 94(April), 322–330. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.04.001>
- Sun, L., Müller, B., Westerholm, M., & Schnürer, A. (2014). Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *Journal of Biotechnology*, 171(1), 39–44. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.016>
- Sun, R. C., Fang, J. M., & Tomkinson, J. (2000). Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. *Industrial Crops and Products*, 12(2), 71–83. [http://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00039-X](http://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00039-X)
- Sun, R., Tomkinson, J., Mao, F. C., & Sun, X. F. (2001). Physicochemical characterization of lignins from rice straw by hydrogen peroxide treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(4), 719–732. [http://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010124\)79:4<719::AID-APP170>3.0.CO;2-3](http://doi.org/10.1002/1097-4628(20010124)79:4<719::AID-APP170>3.0.CO;2-3)
- Sun, R., Tomkinson, J., Wang, S., & Zhu, W. (2000). Characterization of lignins from wheat straw by alkaline peroxide treatment. *Polymer Degradation and Stability*, 67(1), 101–109. [http://doi.org/10.1016/S0141-3910\(99\)00099-3](http://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00099-3)
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160–167. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01032-9](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01032-9)
- Tu, Maobing; Pan, Xuejun; Saddler, J. (2009). Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7771–7778. <http://doi.org/10.1021/jf901031m>
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes,

- conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Várnai, A., Huikko, L., Pere, J., Siika-aho, M., & Viikari, L. (2011). Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource Technology*, 102(19), 9096–9104. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.059>
- Velazquez-Jimenez, L. H., Pavlick, A., & Rangel-Mendez, J. R. (2013). Chemical characterization of raw and treated agave bagasse and its potential as adsorbent of metal cations from water. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 200–206. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.049>
- Velázquez-Valadez, U., Fariás-Sánchez, J. C., Vargas-Santillán, A., & Castro-Montoya, A. J. (2016). Tequilana weber Agave Bagasse Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Sugars: Oxidative-Alkaline Pretreatment and Kinetic Modeling. *Bioenergy Research*, 9(4), 998–1004. <http://doi.org/10.1007/s12155-016-9757-8>
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., & Siika-Aho, M. (2007). Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis Liisa. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 108, pp. 121–45). <http://doi.org/10.1007/978-3-540-73651-6>
- Wang, J., Yang, H., Lu, H., & Zhou, J. (2009). Aerobic biodegradation of nitrobenzene by a defined microbial consortium immobilized in polyurethane foam, 875–881. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-9962-0>
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Meng, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 848–853. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007>
- Weiland, P. (2010). Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 849–860. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Wilkinson, S., Smart, K. A., & Cook, D. J. (2014). Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 62, 219–227. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.036>
- Xuebing, Z., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 465–482. <http://doi.org/10.1002/bbb>
- Zhang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824. <http://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., & Xu, K. (2016). Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: kinetic modelling and synergistic impact evaluation. *Chemical Engineering Journal*, 299, 332–341. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.118>
- Zhou, S., Xue, Y., Sharma, A., & Bai, X. (2016). Lignin Valorization through Thermochemical Conversion: Comparison of Hardwood, Softwood and Herbaceous Lignin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(12), 6608–6617. <http://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01488>
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microb*, 56(6), 1875–1881.

Anexo 1 Condiciones arrojadas por el diseño central compuesto, evaluado en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II.

Ensayo	[Sustrato] (g/L)	[Celulasa] (mg proteína/mL)	[Hemicelulasa] (mg proteína/mL)	pH	[AT] (g/L)	Rendimiento (mg AT/g F1)
1	50	1.84		5	21.81	436
2	80	1.5		5.5	20.73	259
3	50	1		5	17.17	344
4	50	1		5.84	12.2	244
5	20	1.5		4.5	8.42	421
6	50	0.16		5	3.96	79
7	80	1.5		4.5	28.59	357
8	20	1.5	0.1	5.5	1.63	82
9	80	0.5		5.5	23.47	293
10	100.45	1		5	21.09	210
11	50	1		5	20.29	406
12	80	0.5		4.5	1.34	17
13	20	0.5		4.5	7.11	356
14	50	1		4.16	1.5	30
15	50	1		5	17.15	343
16	20	0.5		5.5	6.42	323

Anexo 2. ANOVA generado para la variable de respuesta: concentración de azúcares totales (g AT/L).

Análisis de Varianza para Azúcares Totales					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:[S]	296.948	1	296.948	13.66	0.0209
B:pH	45.0484	1	45.0484	2.07	0.2233
C:[Enzima Celluclast]	190.672	1	190.672	8.77	0.0415

R-cuadrada = 93.049 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.)= 73.9336 porciento

Error estándar del est. = 4.66173

Error absoluto medio = 1.99822

Anexo 3. ANOVA generado para la variable de respuesta: rendimiento (mg AT/g F1).

Análisis de Varianza para Azúcares Totales					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:[S]	10124.1	1	10124.1	0.72	0.4440
B:pH	2007.86	1	2007.86	0.14	0.7248
C:[Enzima Celluclast]	39029.5	1	39029.5	2.77	0.1711

R-cuadrada = 82.5621 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.)= 34.608 por ciento

Error estándar del est. = 118.609

Error absoluto medio = 48.1633