

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Biorefinería del bagazo de *Agave tequilana*:
extracción de lignina por diferentes
pretratamientos y producción de metano.**

Tesis que presenta:

Lilia Chizelt Meza Maytorena

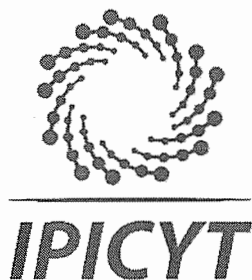
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la tesis:


Dr. Felipe Alatraste Mondragón

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre, 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Biorefinería del bagazo de *Agave tequilana*: extracción de lignina por diferentes pretratamientos y producción de metano**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Lilia Chizelt Meza Maytoarena** y aprobada el diez de diciembre del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Felipe Alatríste Mondragón
Director de la tesis



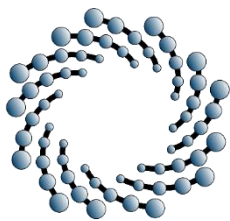
Dr. Elías Razo Flores
Miembro del Comité Tutoral



Dr. José René Rangel Méndez
Miembro del Comité Tutoral



Dra. Edith Marleny Cadena Chamorro
Miembro del Comité Tutoral



IPICYT

Créditos institucionales

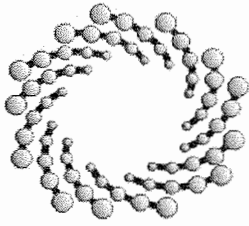
Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Felipe Alatríste Mondragón.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-762620) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

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

El análisis de espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología, Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) y el análisis por difracción de rayos X y de microscopía electrónica de barrido se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

Se agradece al Instituto Potosino de Investigación de Científica y Tecnológica, A. C. por el apoyo económico otorgado para la asistencia al XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ.



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 062 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 10 días del mes de diciembre del año 2018, se reunió a las 12:15 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Elías Razo Flores	Presidente	IPICYT
Dr. José René Rangel Méndez	Secretario	IPICYT
Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Lilia Chizelt Meza Maytorena

sobre la Tesis intitulada:

Biorefinería del bagazo de Agave tequilana: extracción de lignina por diferentes pretratamientos y producción de metano

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

El Jurado, después de deliberar, determinó

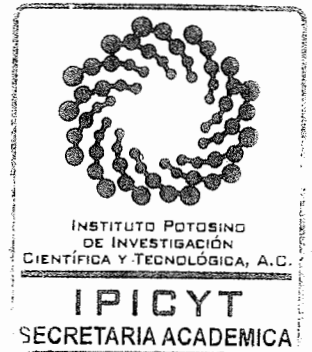
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:00 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 10 días del mes de diciembre de 2018.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicatoria

A mi madre Rita Maytorena, por ser mi ejemplo a seguir, por darme todo su apoyo y amor en cada etapa de mi vida. Por enseñarme que lo que uno desea se consigue con esfuerzo, dedicación y tenacidad. Por siempre apoyarme en mis decisiones, creer y confiar en mí. Hemos pasado muchas cosas juntas y esto es solo un cachito de todas las recompensas que Dios tiene para nosotras, porque este logro también es suyo. Gracias a usted me he convertido en la persona que soy. Es un orgullo ser su hija. Gracias por todo, la amo.

A mi padre Marcelino Meza por su ayuda y apoyo en esta etapa de mi vida.

A mis hermanos: Ezequiel, Yuridia y Gustavo gracias por todas las enseñanzas que me han dado, por apoyarme desde lejos. Son personas que iluminan mi vida. Los quiero.

A José por siempre estar ahí cuando te necesito, por todo tu apoyo y amor en esta etapa de mi vida. Por la confianza que has depositado en mí, por estar conmigo en cada paso que doy. Además de darme ánimo en los momentos difíciles. Te amo.

Agradecimientos

A Dios por el regalo de la vida, por darme la fortaleza para salir adelante y nunca soltarme de su mano.

A mi director de tesis, el Dr. Felipe Alatríste por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, conocimiento y todos los consejos brindados tanto para el desarrollo de esta investigación como para mi desarrollo profesional. Es una persona llena de sabiduría.

Al Dr. Elías Razo, al Dr. René Rangel y a la Dra. Edith Cadena por compartir conmigo su experiencia profesional, por los conocimientos brindados y comentarios acertados en los tutoriales para que esta investigación fuera lo más productiva posible.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales: M. en C. Dulce Partida Gutiérrez, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, a la M. en C. Alejandra Colunga y al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar por su disponibilidad y apoyo técnico en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales, en la capacitación del equipo de ATR-FTIR y en el análisis de muestras en TGA y Van Soest.

A la M. en C. Ana Iris Peña Maldonado por su ayuda incondicional en el análisis de muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido Quanta 200 del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

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

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

A la Dra. Angélica Montoya Contreras y a la Biol. Mireya Guadalupe Sánchez Garza por las capacitaciones brindadas para el uso de la centrífuga y el rotavapor de la División de Biología Molecular.

Al M. en C. Fernando Hernández Navarro por su gran ayuda para el análisis de muestras en el Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) de la División de Materiales.

A Dulce por tu amistad, por enseñarme que las mejores cosas vienen en envases pequeños, por tu ayuda incondicional en cualquier momento. Te quiero mucho rommie.

A Sandra, Richard, Chuy, Juanjo y Mariana por ser parte de “Los safos”, por las alegrías, diversiones y momentos compartidos, sin duda alguna son personas valiosas.

A mis compañeros de generación: Anaí, Mariana Candia, Kary, Marisol, Iván, Edgar, Saúl y Claudia por todas las alegrías, risas y tristezas que pasamos juntos, por todo el apoyo brindado a lo largo de estos dos años.

A Irma López por todo el conocimiento transmitido durante este tiempo, por tu ayuda en el laboratorio, por todos los consejos que me brindaste tanto para mi tesis como para mi desarrollo profesional. Eres una persona admirable. Gracias por todo.

Al grupo de trabajo José Cruz, Dendera Munguía, Fabiola Islas y Rodolfo Palomo por todas las enseñanzas y consejos, por su apoyo brindado en el laboratorio y por su ayuda incondicional.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Resumen	xvi
Abstract	xviii
Introducción	1
Capítulo 1. Marco teórico	3
1.1. Biorefinería	3
1.2. Tipos y aplicaciones de la lignina	3
1.3. Pretratamientos químicos para la deslignificación	5
1.3.1. Organosolv	5
1.3.2. Oxidativos	8
1.3.2.1 Mecanismo de condensación de la lignina.	12
1.3.3. Alcalinos	13
1.3.4. Pretratamientos secuenciales para deslignificar	15
1.4 Hidrólisis enzimática para el proceso de sacarificación	17
1.5 Producción de metano	20
1.6. <i>Agave tequilana</i>	22
1.7. Bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber var azul	23
1.7.1. Composición química del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	23
1.8 Justificación	25
1.9. Hipótesis	26
1.10 Objetivos	26
1.10.1. Objetivo general	26
1.10.2. Objetivos específicos	26
Capítulo 2. Materiales y Métodos	27
2.1. Estrategia Experimental	27

2.2. Materia prima	28
2.3. Caracterización de las fibras de bagazo de agave antes y después de los procesos químicos	28
2.3.1. Análisis de fibras	28
2.3.2. XRD	29
2.3.3. ATR-FTIR	29
2.3.4. SEM	29
2.3.5. ICP-OES	30
2.4. Caracterización de las ligninas extraídas del bagazo de agave	30
2.4.1. ATR-FTIR	30
2.4.2. TGA	30
2.4.3. DSC	31
2.4.4. ICP-OES	31
2.5. Procesos químicos para la obtención de lignina de bagazo de <i>Agave tequilana</i>	31
2.5.1. Proceso de organosolv	31
2.5.2. Proceso de PHA	32
2.5.2.1. Diseño experimental de proceso de PHA	32
2.5.3. Proceso alcalino	33
2.5.4. Proceso alcalino-organosolv	34
2.5.5. Proceso alcalino-PH	34
2.5.6. Cálculo de la remoción de lignina	34
2.6. Tratamiento enzimático	35
2.6.1. Condiciones de la hidrólisis enzimática	35
2.6.2. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos	36
2.6.2.1. Azúcares totales	36
2.6.2.2. Demanda química de oxígeno	36
2.7. Cinéticas de producción de metano	36
2.7.1. Producción de metano en lote	36
Capítulo 3. Resultados y Discusión	39
3.1. Composición química del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	39
3.1. Pretratamiento de PHA: evaluación de las mejores condiciones para la extracción de lignina.	40

3.2. Pretratamientos organosolv, alcalino y secuenciales	47
3.3. Caracterización de las fibras de bagazo de agave antes y después de los pretratamientos	51
3.3.1. XRD	51
3.3.2. ATR-FTIR	54
3.3.3. Caracterización morfológica (SEM)	57
3.4. Caracterización de las ligninas de bagazo de agave	59
3.4.1. ATR-FTIR	59
3.4.2. Análisis de espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)	62
3.4.3. Análisis Termogravimétrico TGA	64
3.4.4. DSC	66
3.4.5. Aplicaciones para las ligninas extraídas.	68
3.5 Hidrólisis enzimática	71
3.6 Producción de metano	74
Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas	81
4.1. Conclusiones	81
4.2. Perspectivas	83
Referencias	85
Anexos	93

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Aplicaciones industriales de la lignina extraída de diferentes biomásas utilizando diversos procesos químicos	46
Tabla 1.2. Estudios de deslignificación empleando el pretratamiento de organosolv reportados en la literatura	7
Tabla 1.4. Estudios de deslignificación empleando el PA con hidróxido de sodio reportados en la literatura	15
Tabla 1.5. Estudios de deslignificación por el pretratamiento secuencial alcalino con PHA reportados en la literatura	17
Tabla 1.6. Condiciones de la hidrólisis enzimática del bagazo de agave pretratado reportadas en la literatura (Modificado de Palomo-Briones et al., 2018)	19
Tabla 1.7. Producción de metano a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave y efluentes del proceso de fermentación oscura a partir de hidrolizados de bagazo de agave.	22
Tabla 2.1. Factores y niveles experimentales evaluados en el diseño factorial 2^k para la determinación de las mejores condiciones del PHA	33
Tabla 2.2. Medio mineral utilizado en los ensayos de producción de metano en lote	37
Tabla 3.1. Composición química de BSP y BCP para este estudio y valores reportados en la literatura	40
Tabla 3.2. Remoción de lignina obtenida con las diferentes condiciones generadas por el diseño factorial 2^k con puntos centrales	41
Tabla 3.3. Porcentajes de remoción y recuperación de lignina de los diferentes pretratamientos empleados con el bagazo de agave	50
Tabla 3.4. Porcentajes del índice de cristalinidad de las fibras de bagazo con y sin pretratamiento y del estándar de celulosa (Avicel)	52
Tabla 3.5. Bandas características de los espectros de FT-IR del estándar de celulosa (Avicel), BSP y BCP pretratamientos mostrados en la Figura 3.6	56
Tabla 3.6. Bandas características de los espectros de FT-IR del estándar de lignina y ligninas de bagazo de agave obtenidas por diferentes pretratamientos	62
Tabla 3.7. Elementos determinados por ICP-OES presentes en el bagazo de agave y en las ligninas obtenidas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos	63
Tabla 3.8. Porcentaje de cenizas a 800 °C, medidas por TGA, presentes en las ligninas obtenidas de bagazo de agave con diferentes pretratamientos	66
Tabla 3.9. Temperaturas de transición vítrea para las ligninas extraídas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos	67
Tabla 3.10. Rendimientos de la producción de metano en lote obtenidos con los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave con y sin pretratamiento	76
Tabla 3.11. Parámetros cinéticos calculados con la ecuación de Gompertz para los ensayos de producción de metano en lote a partir de los hidrolizados de las fibras	

de bagazo con y sin pretratamiento, de los controles de enzima, de glucosa y de endógeno 79

Tabla 3.12. Conversión del bagazo de agave pretratado en sus respectivos productos 80

Lista de Figuras

Figura 1.1. Mecanismo de fraccionamiento de lignina presente en la biomasa lignocelulósica durante el pretratamiento de organosolv (modificado de Kun and Pukánszky, 2016)	8
Figura 1.2. Mecanismo de oxidación de la lignina presente en la biomasa lignocelulósica durante el pretratamiento de PHA (Wilkinson et al., 2014)	12
Figura 1.3. Esquema del mecanismo de oxidación de la lignina (R es H o OCH ₃) (He et al., 2017)	12
Figura 1.4. Mecanismo de fraccionamiento de lignina presente en la biomasa lignocelulósica por medio del PA con hidróxido de sodio (Modificado de Wilkinson et al., 2014)	14
Figura 1.5. Mecanismo propuesto de la escisión catalizada por NaOH del enlace β-O-4 de la lignina (Deuss and Barta, 2016)	14
Figura 1.6. Tipos de inhibición de la celulasa por la lignina en el proceso de hidrólisis enzimática (Modificado de Saini et al., 2016)	19
Figura 1.7. Diagrama de la digestión anaerobia para la producción de metano (Moraes et al., 2015)	21
Figura 2.1. Diagrama de la estrategia experimental utilizada en este estudio.	28
Figura 3.1. Diagrama de Pareto de los resultados obtenidos mediante el diseño factorial 2 ^k con puntos centrales. A: Concentración de PH, B: Temperatura y C: Tamaño de partícula	42
Figura 3.2. Efecto de la temperatura sobre la remoción de lignina. Los números en negrillas corresponden al número del experimento indicando en la Tabla 3.2	44
Figura 3.3. Efecto del tamaño de partícula sobre la remoción de lignina. Los números en negrillas corresponden al número de experimento indicando en la Tabla 3.2	45
Figura 3.4. Modelos de superficie de respuesta de la remoción de lignina variando [H ₂ O ₂], a) temperatura y b) tamaño de partícula	46
Figura 3.5 Difractogramas obtenidos para el BSP, BCP y estándar de celulosa (Avicel). Las flechas indican las señales de oxalato de calcio	54
Figura 3.6. Espectros ATR-FTIR para el estándar de celulosa (Avicel), y fibras de bagazo de agave con y sin pretratamiento	56
Figura 3.7. Micrográficas de SEM que muestran el efecto de los pretratamientos en el bagazo. a) fibra de bagazo de agave sin pretratar (BSP), b) fibra de bagazo pretratada con organosolv (BagOrg), c) fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio al 6% (BagNaOH)	58
Figura 3.7 (cont.) d) fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio y organosolv (BagNaOH+Org), e) fibra de bagazo pretratada con PHA al 7.36%(BagPHA7.36%), f) fibra de bagazo pretratada con PHA al 15% (BagPHA15%), g) fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio y PH al 6% (BagNaOHA+PHA6%)	59

Figura 3.8. Espectros obtenidos mediante el análisis de ATR-FTIR para el estándar de lignina y ligninas de bagazo de agave obtenidas por diferentes pretratamientos	61
Figura 3.9. Termogramas en atmósfera de aire de las ligninas de bagazo de agave extraídas con diferentes pretratamientos	65
Figura 3.10. Termogramas DSC de las ligninas extraídas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos	68
Figura 3.11. Esquema de un proceso para la valorización de la lignina a productos químicos de valor agregado	71
Figura 3.12. AT de los hidrolizados enzimáticos de las fibras de bagazo de agave con y sin pretratamiento	72
Figura 3.13. Demanda química de oxígeno de los hidrolizados de las fibras de bagazo con y sin pretratamiento	74
Figura 3.14. Rendimientos de producción de metano (BMP's) obtenidos con los hidrolizados enzimáticos de la fibra de bagazo sin pretratar (BSP), fibra de bagazo pretratado con PHA al 7.36% (BagPHA7.36%) y fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio al 6% (BagNaOH) y del control de glucosa	76
Figura 3.15. Producción en lote de metano (puntos) con su ajuste a Gompertz (línea sólida) para los hidrolizados de la fibra de bagazo sin pretratar (BSP), las fibras pretratas con PHA al 7.36% (BagPHA7.36%) y con NaOH al 6% (BagNaOH) así como sus respectivos controles de enzima, glucosa y endógeno	78
Figura A1. Curva de DSC para un polímero con dominios cristalinos y amorfos (Grassino, 2018)	94

Abreviaturas

AT: Azúcares totales.

BSP: Fibra de bagazo de agave sin pretratamiento.

BCP: Fibra (s) de bagazo (s) con pretratamiento (s).

BagOrg: Fibra de bagazo obtenida del pretratamiento de organosolv.

BagNaOH: Fibra de bagazo obtenida del pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio al 6%.

BagNaOH+Org: Fibra de bagazo obtenida del pretratamiento alcalino con NaOH y organosolv.

BagPHA7.36%: Fibra de bagazo obtenida del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino al 7.36%

BagPHA15%: Fibra de bagazo obtenida del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino al 15%.

BagNaOH+PHA6%: Fibra de bagazo obtenida del pretratamiento alcalino con NaOH y peróxido de hidrógeno alcalino al 6%.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés).

LigOrg: Lignina obtenida del bagazo pretratado con organosolv.

LigNaOH6%: Lignina obtenida del bagazo pretratado con hidróxido de sodio al 6%.

LigNaOH+Org: Lignina obtenida del bagazo pretratado con hidróxido de sodio y organosolv.

LigPHA: Lignina obtenida del bagazo pretratado por un pretratamiento de peróxido de hidrógeno alcalino.

LigNaOH+PHA6%: Lignina obtenida del bagazo pretratado con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno alcalino al 6%.

PA: Pretratamiento alcalino

PH: Peróxido de hidrógeno.

PHA: Peróxido de hidrógeno alcalino.

TGA: Análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés)

Tc: Temperatura de cristalización

Tg: Temperatura de transición vítrea (por sus siglas en ingles)

Resumen

Biorrefinería del bagazo de *Agave tequilana*: extracción de lignina y producción de metano.

Palabras clave: Bagazo de *Agave tequilana*, lignina, organosolv, peróxido de hidrógeno alcalino, alcalino, hidrólisis enzimática, metano.

El bagazo de *Agave tequilana* es un residuo lignocelulósico generado en la producción de tequila en México. Debido a su estructura compleja, constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, se le considera como una materia potencial para diferentes usos industriales en un esquema de biorrefinería. Debido a que la lignina dificulta el acceso a los polisacáridos es necesario aplicar una etapa de pretratamiento con la finalidad de extraerla. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistió en implementar un procedimiento eficiente para la extracción de lignina y evaluar su efecto sobre la producción de metano a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana* deslignificado. Para ello se evaluaron cinco pretratamientos diferentes. Las ligninas y fibras obtenidas fueron caracterizadas químicamente (análisis de fibras, ATR-FTIR, TGA, DSC, ICP-OES). Las fibras también se caracterizaron morfológicamente (SEM y XRD). De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayor deslignificación (81.46%) se obtuvo cuando se utilizó peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) al 15%, pero debido a problemas experimentales el mejor procedimiento fue empleando PHA al 7.36%. El procedimiento de precipitación utilizado para la recuperación de la lignina no fue adecuado, ya que solo se logró recuperar un 24.76% del total de lignina removida. Los análisis químicos realizados a las ligninas extraídas por los cinco pretratamientos mostraron que la lignina extraída con el pretratamiento de organosolv podría utilizarse como antioxidante y adsorbente de metales pesados, mientras que la lignina extraída con PHA resultó ser una lignina oxidada que podría emplearse como aditivo del concreto, dispersante aniónico en suspensiones de caolín y adsorbente de metales pesados. Se encontró que el hidrolizado enzimático del bagazo de agave sin pretratamiento (BSP), alcanzó una concentración de 27.35 g AT/L y una concentración de 63.70 g DQO/L. En comparación, el hidrolizado enzimático de la fibra de bagazo pretratada con PHA al 7.36% (BagPHA7.36%)

alcanzó concentraciones de AT 1.5 veces más altas y concentraciones de DQO 1.26 veces más altas. En cuanto a la producción de metano, los potenciales bioquímicos de metano (BMP, por sus siglas en inglés) del BSP y BagPHA7.36% fueron semejantes. Sin embargo, se observó que la contribución al BMP proveniente de los componentes liberados durante la hidrólisis enzimática fue mayor en los bagazos pretratados que en el BSP. Cuando los rendimientos se expresaron en metano producido por gramo de bagazo sin pretratamiento o con pretratamiento (PHA 7.36%) se observaron rendimientos de producción de metano de 286.90 NmL CH₄/g BSP y de 423 NmL CH₄/g BagPHA7.36% respectivamente, lo cual representó un incremento del BMP de 1.5 veces para el hidrolizado de la fibra de bagazo de agave pretratada con PHA al 7.36%. Lo anterior indica que la deslignificación del bagazo de agave incrementó la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa permitiendo que, durante la hidrólisis enzimática una mayor cantidad de AT y DQO se solubilizaran, aumentando con ello los rendimientos de producción de metano.

Abstract

Biorefinery of *Agave tequilana* bagasse: lignin extraction and methane production

Key words: *Agave tequilana* bagasse, lignin, organosolv, alkaline hydrogen peroxide, alkaline, enzymatic hydrolysis, methane.

Agave tequilana bagasse is a lignocellulosic residue generated by the tequila industry in Mexico. Due to its complex structure constituted by cellulose, hemicellulose and lignin it is considered as a potential material for different industrial uses in a biorefinery scheme. Because lignin hinders access to polysaccharides, it is necessary to apply a pre-treatment step in order to extract it. For that reason, the objective of this study was to implement an efficient procedure for the extraction of lignin and evaluate its effect on methane production from enzymatic hydrolysates of delignified *Agave tequilana* bagasse. For that five different pretreatments were evaluated. The lignins and fibers obtained were chemically characterized (fiber analysis, ATR-FTIR, TGA, DSC, ICP-OES). Also, fibers were characterized morphologically (SEM and XRD). According to the results obtained, the highest delignification (81.46%) was obtained when alkaline hydrogen peroxide (AHP) was used at 15%, but due to experimental problems the best procedure was using AHP at 7.36%. The precipitation procedure used for the recovery of lignin was not adequate, since only 24.76% of the total lignin removed was recovered. The chemical analyzes carried out on the lignins extracted by the five pretreatments showed that the lignin extracted with the organosolv pretreatment may be used as an antioxidant and adsorbent of heavy metals, while the lignin extracted with AHP turned out to be an oxidized lignin that may be used as an additive in the concrete, anionic dispersant in suspensions of kaolin and adsorbent of heavy metals. It was found that the enzymatic hydrolyzate of agave bagasse without pretreatment reached a concentration of 27.35 g TS/L and a concentration of 63.70 g COD/L. In comparison, the enzymatic hydrolysate of the bagasse fiber pretreated with AHP at 7.36% (BagAHP7.36%) reached TS concentrations 1.5 times higher and 1.26 times higher COD. In terms of methane production, the BMP of the bagasse without pretreatment and BagAHP7.36% were similar. However, it was observed that the

contribution to the BMP from the components released during the enzymatic hydrolysis was greater in the BagAHP7.36% compared to the bagasse without pretreatment. When the yields were expressed in methane produced per gram of bagasse without pretreatment or with pretreatment (AHP at 7.36%) methane production yields of 286.90 NmL CH₄/g bagasse without pretreatment and 423 NmL CH₄/g BagAHP7.36% were observed, which represented an increase in BMP of 1.5 times for the hydrolyzate of agave bagasse fiber pretreated with AHP at 7.36%. This indicates that the delignification of the agave bagasse increased the availability of cellulose and hemicellulose, allowing that a higher amount of TS and COD were solubilized in the hydrolysate, thereby increasing the yields of methane production.

Introducción

El bagazo de agave es la fibra residual que queda después de la producción de bebidas alcohólicas como el tequila o el mezcal en México, según las especies de agave utilizadas durante el proceso. El consumo anual de agave para la producción de tequila en 2015 fue alrededor de 8.09×10^5 toneladas. El bagazo de agave representa usualmente el 40% en peso seco del agave procesado (Perez-Pimienta et al. 2016) y es considerado una biomasa lignocelulósica, es decir, se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, principalmente. Por lo tanto, es un sustrato potencial para ser utilizado como materia prima en una biorefinería para la producción de fibra, biocombustibles y lignina la cual es un precursor en diversos procesos industriales. La lignina funge como una barrera para el acceso de las enzimas y esto le da su carácter recalcitrante. Por consiguiente, es necesaria una etapa de pretratamiento para extraerla y dejar expuesta a la celulosa y hemicelulosa de manera que mediante una hidrólisis enzimática estos polisacáridos puedan ser convertidos en sus azúcares monoméricos y ser utilizados por los microorganismos para la producción de biocombustibles (metano, hidrógeno o bioetanol). Esto con la finalidad de obtener fuentes alternas de energía debido a que éstas juegan un papel clave en el desarrollo económico y en el bienestar de una nación, ya que el uso excesivo de combustibles fósiles no solo amenaza este desarrollo, sino que también afecta al medio ambiente, la salud humana y el progreso económico (Pérez-Denicia et al., 2017).

Actualmente, la lignina tiene una variedad de aplicaciones tales como la elaboración de nanopartículas para la fotoprotección de la piel, matriz polimérica, soporte de microorganismos, plastificante de concreto, biopesticida, adhesivo, entre otras (Gutiérrez-Hernández et al., 2016; Ren et al., 2008; Kalliola et al., 2015; Hossain et al., 2015; Mansouri and Salvadó 2006).

En este contexto, diversas investigaciones se han enfocado en darle un aprovechamiento integral a la biomasa lignocelulósica (Sun et al., 2016; Barana et al., 2016; Su et al., 2015; Carvalheiro et al., 2008). Es por ello que en el presente trabajo se utilizaron una serie de pretratamientos con la finalidad de extraer lignina

del bagazo de agave y posteriormente aplicar una hidrólisis enzimática a la fibra deslignificada y evaluar si la deslignificación incrementa tanto el rendimiento de sacarificación como el rendimiento de la producción de metano.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1. Biorefinería

En vista de que la energía es necesaria para la subsistencia humana y que no podemos seguir dependiendo del uso de combustibles fósiles, es necesario cambiar y darnos cuenta de que la biomasa además de una fuente alterna de energía puede ser una fuente valiosa de una amplia gama de productos que incluyen: especialidades químicas, químicos básicos y productos naturales valiosos. El reto está en usar tecnologías "verde" que permitan aprovecharlos al máximo con el mínimo de desechos o insumos. Una biorrefinería se basa en el uso de biomasa como entrada o materia prima, a partir de la cual se pueden generar varios productos de forma integral y eficiente (Carrillo et al., 2016). Se espera que las biorefinerías produzcan varias líneas de productos similares a los que actualmente se producen a partir de fuentes fósiles, pero de manera sostenible (Abdelaziz *et al.* 2015). Un producto natural de alto valor agregado presente en la biomasa es la lignina.

1.2. Tipos y aplicaciones de la lignina

En los últimos años, las biomásas lignocelulósicas han surgido como recursos renovables potenciales debido a su abundancia anual. Sin embargo, para aprovechar los diversos componentes de la biomasa y maximizar su valor agregado, se debe realizar el fraccionamiento de la lignocelulosa en sus tres componentes principales. Este proceso se denomina biorefinería y consiste en un sistema integrado de conversión para la producción de combustibles, energía, calor y/o productos químicos de biomasa con un alto valor agregado (Barana et al. 2016).

La lignina, debido a su propiedad recalcitrante, juega un papel negativo en la producción de biocombustibles, por lo que debe ser extraída. Los procesos más ampliamente utilizados para su extracción en la industria han sido el proceso de sulfato (Kraft) y de sulfito. Sin embargo, aspectos ambientales, así como la dificultad de la valorización de la lignina extraída por estos métodos debido a su estructura no uniforme o la presencia de impurezas orgánicas e inorgánicas han hecho emerger

los procesos de deslignificación libres de azufre como nuevas posibilidades (Fernández-Rodríguez et al., 2017).

La lignina sulfito es producida por el proceso sulfito para fabricación de pasta de celulosa y éste fue históricamente el tipo de lignina industrial más abundante disponible comercialmente. Se desarrolló inicialmente basado en el uso de bisulfito de calcio, un producto químico barato para la fabricación de pasta. La falta de una tecnología adecuada para la recuperación de este producto químico del licor generado propició el desarrollo de otros usos para estos licores, como por ejemplo la producción de lignosulfonatos de calcio (Chávez and Domine, 2013). Con el paso del tiempo este proceso fue perdiendo terreno con respecto a otros métodos de extracción de lignina, como el proceso Kraft debido a la versatilidad de este último.

Por otro lado, el proceso Kraft utiliza hidróxido de sodio y sulfuro de sodio para extraer la lignina presente en la madera. Durante el pulpeo Kraft, aproximadamente el 90- 95% de la lignina se degrada químicamente en fracciones que son solubles en medio alcalino. La lignina Kraft difiere significativamente de la lignina nativa en su estructura y composición química. Los cambios estructurales tales como la escisión de los enlaces alfa y beta aril éter conducen a la formación de lignina de menor peso molecular. Además, las impurezas indeseables tales como compuestos sulfurosos o carbohidratos están presentes en este tipo de lignina (Alekhina et al. 2015).

La lignina organosolv, especialmente producida en condiciones de baja severidad, contiene la menor cantidad de contaminantes (carbohidratos, cenizas) y tiene un peso molecular relativamente bajo. Además, es una lignina pura con mínimos cambios en su estructura (Cybulska et al., 2017; Chen et al., 2017)

Las ligninas alcalinas son significativamente diferentes de los lignosulfonatos, poseen bajo peso molecular, son insolubles en agua y contienen una cantidad menor de contaminantes al estar libres de azufre y de azúcares (Chávez and Domine, 2013).

Actualmente, se han reportado diferentes métodos de extracción de lignina, así como sus posibles aplicaciones (Tabla 1.1). Finalmente, cabe mencionar que se han utilizado otros procesos para extraer lignina pero aún no se tiene una aplicación definida para ésta. Su et al., (2015) utilizó un proceso con (PHA) en la mazorca de maíz con el cual obtuvo una lignina oxidada. Por otro lado, (Yuan et al., 2018) empleó un proceso secuencial con hidróxido de sodio seguido por PHA con la finalidad de mejorar los rendimientos de deslignificación en la madera de bambú.

Como ya se explicó, la lignina tiene una estructura amorfa y compleja, y su estructura y propiedades cambian de acuerdo con las reacciones llevadas a cabo durante el proceso de deslignificación (Lourençon et al. 2015).

1.3. Pretratamientos químicos para la deslignificación

El pretratamiento es el paso crucial en la conversión de energía de la biomasa lignocelulósica ya que proporciona la separación o solubilización de los componentes complejos de ésta. La elección del pretratamiento debe considerar la compatibilidad de materias primas, enzimas y organismos. Este proceso generalmente se puede clasificar en métodos físicos, químicos, biológicos y sus combinaciones (Chen et al., 2017). A continuación, se describirán los procesos estudiados en este trabajo.

1.3.1. Organosolv

El proceso organosolv se originó en la industria del papel y tiene la finalidad de solubilizar la lignina y proporcionar una fibra enriquecida en celulosa adecuada para la hidrólisis enzimática (Cybulska et al., 2017; Alvira et al., 2010). Se pueden utilizar numerosas mezclas de disolventes orgánicos o acuosos, que incluyen metanol, etanol, acetona, etilenglicol y alcohol tetrahidrofurfurílico. Comparando con otros pretratamientos químicos, la principal ventaja del proceso organosolv es la recuperación de lignina relativamente pura como subproducto (Alvira et al., 2010). El etanol, por ser un alcohol de bajo punto de ebullición puede recuperarse fácilmente por destilación, además, comparado con el metanol es menos tóxico y

se requiere una menor concentración de solvente al momento de llevar a cabo este pretratamiento (Zhao et al., 2009).

Tabla 1.1. Aplicaciones industriales de la lignina extraída de diferentes biomásas utilizando diversos procesos químicos

Pretratamiento	Tipo de lignina	Biomasa	Aplicación	Referencia
Organosolv	Lignina organosolv	Bagazo de agave	Nanopartículas para la fotoprotección de la piel	Gutiérrez-Hernández et al., 2016
		Madera dura y paja de trigo	Aceite fenólico y compuestos aromáticos	Gosselink et al., 2012
	Bioaceite de lignina	Madera	Biopesticida	Hossain et al., 2015
Proceso alcalino	Lignina alcalina	Madera caducifolia y conífera	Actividad antioxidante	Dizhbite et al., 2004
		Rastrojo de maíz	Actividad antimicrobial y antioxidante	Dong et al., 2011
		Paja	Termopolímero como inhibidor de la corrosión	Ren et al., 2008
	Madera blanda	Fibras mesoporosas de carbono para la síntesis de electrodos	Ago et al., 2016	
	Lignina alcalina oxidada con H ₂ O ₂	Paja de trigo	Plastificante de concreto	Kalliola et al., 2015
	Lignina alcalina oxidada con H ₂ O ₂ , CuO y Fe ₂ (SO ₄) ₃	Paja de trigo	Producción de compuestos monofenólicos	Xin-Ping et al., 2014
Proceso de sulfito	Lignosulfonato	Madera blanda (Abedul)	Microesferas de lignina para la eliminación de plomo.	Ge et al., 2016
Proceso Kraft (NaOH, Na₂S)	Lignina Kraft	Madera	Partículas híbridas de relleno para compuestos de caucho	Bahl et al., 2014
		Madera	Adhesivo	Mansouri and Salvadó 2006
		Madera blanda	Nanopartículas de lignina como bionanomaterial en la industria de los cosméticos o en medicina.	Mattinen et al., 2018
	Madera de pino	Producción de nylon	Kohlstedt et al., 2018	
Lignina Kraft oxidada con H ₂ O ₂	Madera blanda	Dispersante aniónico para suspensiones de caolín	He et al., 2017	

Existen diversos estudios en los que se ha empleado el pretratamiento de organosolv utilizando diferentes sustratos y analizado diversas variables experimentales (Tabla 1.2). Zhao (2009) reporta que para la mayoría de los

procesos de organosolv, si el pretratamiento se lleva a cabo a altas temperaturas (185-210°C), no hay necesidad de agregar ácido, ya que se cree que los ácidos orgánicos liberados de la biomasa, a altas temperaturas, actúan como catalizadores para la ruptura del complejo lignina-carbohidrato. Sin embargo, cuando se añaden catalizadores ácidos, la velocidad de deslignificación aumenta y se obtienen mayores rendimientos de xilosa. Por otro lado, la deslignificación llevada a cabo por organosolv permite utilizar completamente el potencial energético de la biomasa con la finalidad de crear una biorrefinería holística denominada “lignin first” (Cybulska et al., 2017). En estos estudios se observa que uno de los mejores rendimientos de deslignificación es el reportado por Jang et al. (2016) obteniendo un 80.2% de remoción de lignina, el cual es cercano al reportado por Caspeta et al., (2014), 70% de remoción de lignina, para el bagazo de agave. Esta diferencia puede deberse principalmente al tipo de biomasa utilizada, así como la temperatura a la que se llevó el pretratamiento. Por otro lado, en el estudio realizado por Fernández-Rodríguez et al., (2017), se obtuvo una remoción de lignina similar al valor obtenido por Caspeta et al., (2014). A pesar de que utilizaron la misma biomasa, las condiciones empleadas fueron diferentes, siendo la principal diferencia que Caspeta et al., (2014) utilizó ácido como catalizador aumentando con ello la velocidad de deslignificación.

Tabla 1.2. Estudios de deslignificación empleando el pretratamiento de organosolv reportados en la literatura

Variables Experimentales						
Sustrato	Temperatura (°C)	Relación S:L (g/mL)	Relación EtOH/H ₂ O/ácido %v/v	Tiempo (min)	Resultados (Remoción de lignina (%))	Referencia
Bagazo de Caña de azúcar	140	1:5	50/50/0	20	82.50%	Gurgel et al., 2016
Tallos de Liriodendron tulipifera.	150	1:10	50/50/0	30	80.20%	Jang et al., 2016
Bagazo de Agave	200	1:15	70/30/0	90	65%	Fernández-Rodríguez et al., 2017
Bagazo de Agave	160	1:10	50/50/0.5	10	70%	Caspeta et al., 2014
Bagazo de Agave	160	1:10	25/74.5/0.5	10	45%	Pérez-Pimienta et al., 2017

El pretratamiento de organosolv utiliza un proceso solvolítico donde los enlaces alfa y beta aril éter de la lignina se rompen mediante la adición de un alcohol (Fig. 1.1).

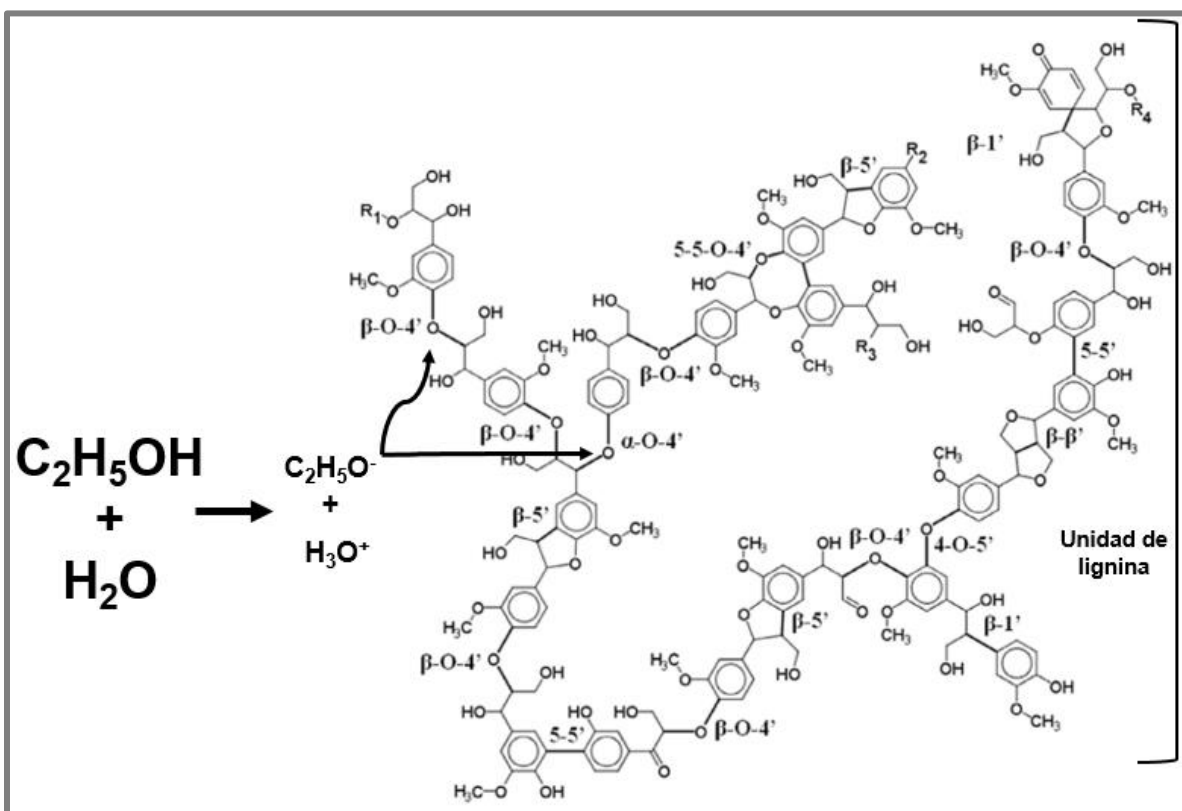


Figura 1.1. Mecanismo de fraccionamiento de lignina presente en la biomasa lignocelulósica durante el pretratamiento de organosolv (modificado de Kun and Pukánszky, 2016)

1.3.2. Oxidativos

El pretratamiento oxidativo utiliza la deslignificación oxidativa para romper y solubilizar la lignina mejorando así la digestibilidad enzimática. El objetivo es eliminar la hemicelulosa y lignina para aumentar la accesibilidad de la celulosa. Durante el pretratamiento oxidativo pueden darse varias reacciones, como la sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, rompimiento del alquil éter del arilo o la ruptura oxidativa de núcleos aromáticos (Niño et al., 2013).

Un área que ha exhibido un crecimiento espectacular en los últimos años ha sido la deslignificación con oxígeno o el blanqueo con oxígeno. Este proceso

consiste en hacer reaccionar la biomasa con oxígeno en condiciones alcalinas y luego realizar lavados para recuperar la lignina disuelta. Generalmente se lleva a cabo bajo presión, y la deslignificación está normalmente en el rango de 35 a 50%. Esta tecnología es más selectiva que la mayoría de los procesos de deslignificación. Las principales ventajas de la deslignificación con oxígeno son: la sustitución parcial de químicos a base de cloro, el reciclaje y reuso de los reactivos utilizados en la etapa de oxidación con oxígeno y el ahorro energético (Bajpai 2012).

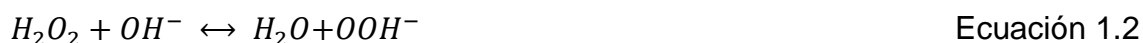
Por otra parte, la oxidación húmeda es un proceso, donde los materiales se tratan con agua y aire u oxígeno. La temperatura, el tiempo de reacción, la presión de oxígeno y el contenido de agua son los parámetros más críticos en la oxidación húmeda. El proceso se realiza generalmente a alta temperatura (125-300 °C) y alta presión (0.5-20 MPa). El tiempo de tratamiento reportado varía de un par de minutos a horas. La presencia de oxígeno puede aumentar las tasas de reacción y la producción de radicales libres (Tahezadeh and Karimi 2008; Zheng et al., 2014).

Por otro lado, el ozono es un poderoso oxidante que se puede usar como pretratamiento (ozonólisis) para la biomasa lignocelulósica. El tratamiento previo por ozonólisis produce una biomasa más degradable principalmente a través de la degradación de la lignina, con una ligera alteración de la hemicelulosa. Sin embargo, tiene muy poco efecto sobre la celulosa. Los principales parámetros de pretratamiento son el contenido de agua en el reactor, el tamaño de las partículas y la concentración de ozono en la corriente de gas. En este pretratamiento, las moléculas de ozono se desintegran en radicales hidroxilo en agua, lo que da como resultado una combinación de oxidación tanto del ozono como de los radicales hidroxilo (Zheng et al., 2014).

El pretratamiento de oxidación con peróxidos es un método común para mejorar la conversión biológica de biomasa lignocelulósica. Los oxidantes documentados incluyen el peróxido de hidrógeno (PH), el ácido peracético, el dimetildioxirano y el peroxiamonosulfato. El peróxido más simple y de uso frecuente es el PH, el cual descompone parcialmente la lignina y la hemicelulosa, y libera una fracción de celulosa con alta degradabilidad a los microorganismos anaeróbicos. El

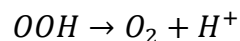
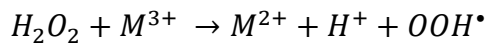
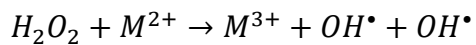
tratamiento con PH es un proceso de oxidación no selectivo y, por lo tanto, pueden producirse pérdidas de hemicelulosa y celulosa. Mientras tanto, podrían generarse inhibidores ya que la lignina se oxida para formar compuestos aromáticos solubles (Zheng et al., 2014).

En particular, el PH es un ácido débil que se ioniza según la Ecuación 1.1. En medio alcalino, el PH experimenta las reacciones indicadas en las Ecuaciones 1.2 y 1.3, hasta la formación del anión hidroperóxido y radicales hidroxilo y superóxido, los cuales son las especies que llevan a cabo la deslignificación. Sin embargo, el aumento de la temperatura facilita la descomposición del PH, a agua y oxígeno, mediante la Ecuación 1.4. lo cual disminuye la cantidad de PH disponible, afectando negativamente al proceso de deslignificación. Además, en ausencia de reactantes para los radicales hidroxilo y superóxido, éstos reaccionan de nuevo entre sí para formar $O_2^{\bullet -}$ y OH^{\bullet} (Ecuación 1.5), dando un rendimiento global de 0.5 mol O_2 /mol H_2O_2 (Macorra-García et al., 2004; Sun et al., 2000).

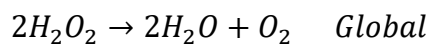
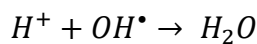


Por otro lado, los iones metálicos como el Fe^{3+} , Mn^{2+} y el Cu^{2+} , catalizan la descomposición del H_2O_2 y la formación de radicales hidroxilo e hidroperoxilo por medio de las reacciones expresadas en el esquema de Ecuaciones 1.6. Para evitar el contacto entre los iones metálicos y el H_2O_2 se emplean agentes quelantes, encargados de secuestrar los cationes presentes en disolución formando quelatos, cuya estructura anular envuelve a dichos iones inhibiendo su efecto catalítico (Macorra-García et al., 2004) y eliminándolos posteriormente mediante lavado (Macorra-García et al., 2004). Dentro de los quelantes más efectivos se tiene a los aminocarboxilatos, dentro de los que se encuentran el DTPA (ácido dietilen triamino

pentaacético), agente quelante comúnmente usado industrialmente debido a su gran estabilidad en blanqueos oxidantes y a su afinidad por el Mn^{+2} y el EDTA (ácido etilen diamino tetraacético), el cual presenta una gran afinidad por el Fe^{+3} . Estos dos agentes aseguran una elevada estabilidad del PH hasta temperaturas de 60 °C (Macorra-García et al., 2004).



Ecuaciones 1.6



El pretratamiento con PH consiste en someterlo a condiciones alcalinas (pH 11.5) generando su descomposición en los radicales hidroxilo (OH^\bullet) e hidroperoxilo (OOH^\bullet) principalmente, quienes son los responsables de atacar los enlaces ésteres que se encuentran entre la lignina y la hemicelulosa (Figura 1.2). Esto inicia la descomposición del complejo lignocelulósico, lo que conduce a un aumento en los rendimientos de azúcar durante la hidrólisis enzimática subsiguiente (Wilkinson et al., 2014). Por otro lado, los radicales también pueden fragmentar los enlaces internos (α y β aril éter) de la lignina generando dos compuestos principales: ácido ferúlico y ácido p-cumárico.

En la literatura se han reportado diferentes estudios en los que se ha aplicado el pretratamiento de PHA para la remoción de lignina utilizando diversas biomásas lignocelulósicas, así como diferentes variables experimentales (Tabla 1.3). En un pretratamiento de PHA en una sola etapa, generalmente se requiere de una carga relativamente alta de PH (aproximadamente del 10%). Esto probablemente se deba al consumo de PH por los compuestos aromáticos solubles en álcali y a la descomposición del PH y formación de radicales hidroxilo e hidroperoxilo por metales de transición (Fe, Cu, Mn, entre otros) presentes en la biomasa (Yuan et al., 2018). En estos trabajos se observa que el mayor porcentaje de deslignificación fue obtenido por Rabelo et al., (2014) utilizando bagazo de caña de azúcar como biomasa y una concentración de PH del 7.36%. Por otro lado, Perez-Pimienta et al.,

(2016) utilizó PHA en bagazo de agave para remover lignina obteniendo resultados desfavorables. Esto puede deberse a las condiciones utilizadas, principalmente, concentración de PH y tiempo, por lo que es importante conocer las mejores condiciones de deslignificación del bagazo de agave utilizando este pretratamiento.

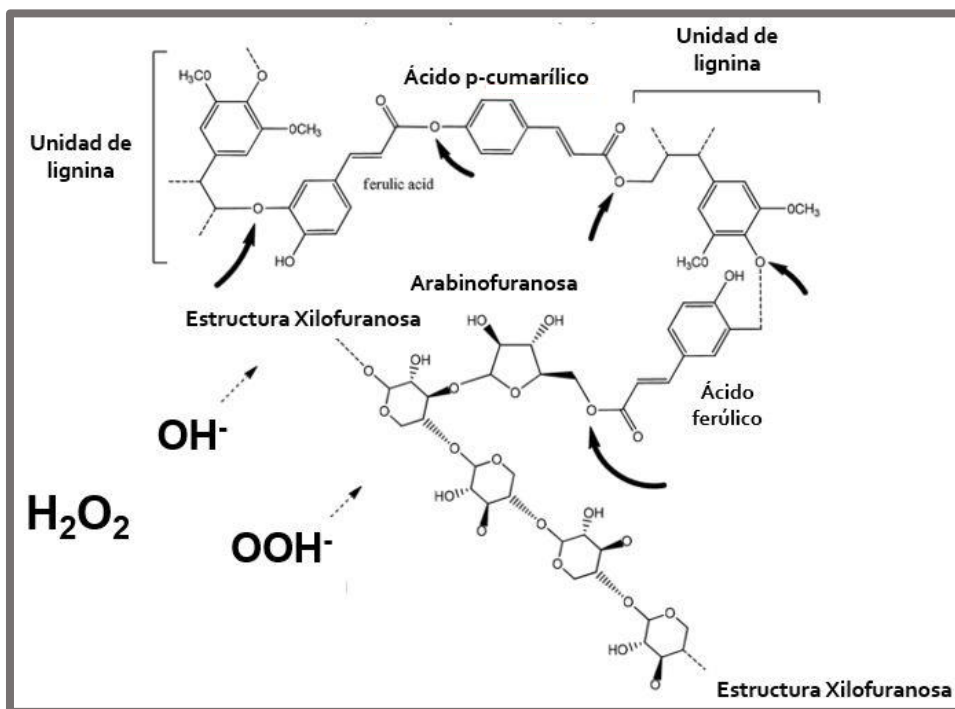


Figura 1.2. Mecanismo de oxidación de la lignina presente en la biomasa lignocelulósica durante el pretratamiento de PHA (Wilkinson et al., 2014)

1.3.2.1 Mecanismo de condensación de la lignina.

Bajo condiciones alcalinas, la reacción de oxidación de lignina con PH, permite que el anión perhidroxilo rompa las cadenas laterales de la lignina, abriendo el anillo aromático, y produciendo nuevos compuestos con grupos carboxílicos o cromóforos

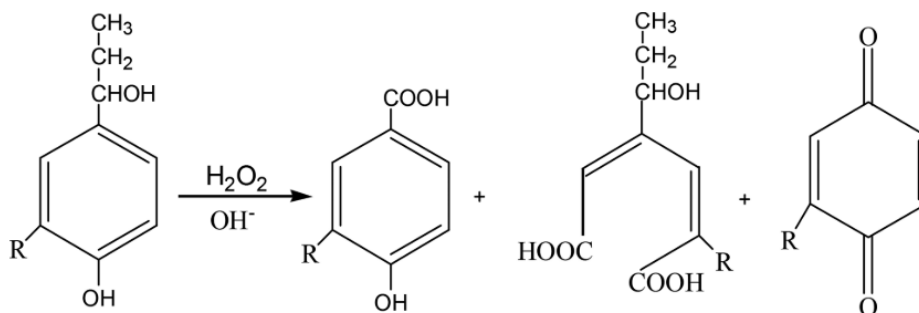


Figura 1.3. Esquema del mecanismo de oxidación de la lignina (R es H o OCH_3) (He et al., 2017)

(Fig. 1.3). En condiciones severas, estos grupos pueden experimentar una reacción de escisión del anillo y degradarse aún más para formar una variedad de compuestos de bajo peso molecular, como ácido oxálico, ácido fórmico, y ácido malónico (He et al., 2017). Sin embargo, por debajo de pH 12, los compuestos con grupos carboxílicos o cromóforos tienden a protonarse, uniéndose entre ellos, lo que conduce a la condensación de lignina (Kalliola et al. 2015).

1.3.3. Alcalinos

El pretratamiento alcalino (PA) con hidróxido de sodio ha sido utilizado desde 1990 (Kim et al., 2016). Es un proceso de deslignificación efectivo que minimiza la pérdida de carbohidratos y puede dar como resultado una biomasa sólida enriquecida con celulosa con una generación mínima de compuestos de degradación. El PA causa el hinchamiento de la biomasa, lo que a su vez aumenta el área superficial accesible para la enzima, la solubilización de la hemicelulosa y la celulosa amorfa, altera la cristalinidad de la celulosa y rompe el complejo lignina-carbohidrato (Shahabazuddin et al. 2018). Dentro de las principales ventajas que presenta este pretratamiento se tiene el uso de productos químicos fácilmente disponibles y amigables con el medio ambiente en bajas concentraciones; además se puede operar en condiciones menos severas comparado con los pretratamientos de líquidos iónicos y organosolv reduciendo con ello los costos de operación (Shahabazuddin et al., 2018). Aunado a eso, Yamashita et al., (2010) reportan que el PA es más efectivo para residuos agrícolas y cultivos herbáceos que para materiales de madera. Finalmente, el hidróxido de sodio es uno de los catalizadores básicos más fuertes, por lo que la efectividad del pretratamiento se evidencia en un mayor grado de hidrólisis enzimática comparado con otros pretratamientos alcalinos (Ca(OH)_2 , KOH y NH_4^+) (Kim et al., 2016).

Por otra parte, el PA consiste en reacciones de solvatación y saponificación atacando eficazmente el enlace éster entre la lignina y hemicelulosa en los complejos lignina-carbohidrato. El hidróxido de sodio también es efectivo para el rompimiento de los enlaces éter y carbono-carbono en las moléculas de lignina produciendo ácido ferúlico (Buratti et al., 2018; Kim et al., 2016).

Durante la reacción del pretratamiento con NaOH, éste se disocia en los iones hidróxido (OH^-) y sodio (Na^+). A medida que aumenta la concentración de ión hidróxido, la velocidad de la reacción de hidrólisis se incrementa (Kim et al., 2016) (Fig.1.4).

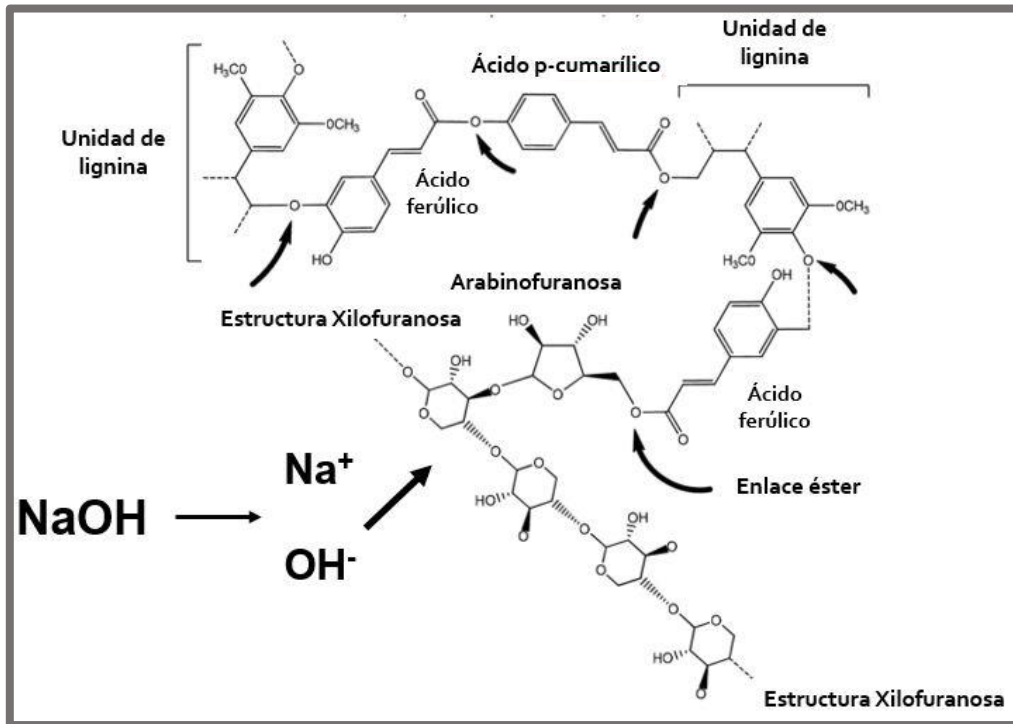


Figura 1.4. Mecanismo de fraccionamiento de lignina presente en la biomasa lignocelulósica por medio del PA con hidróxido de sodio (Modificado de Wilkinson et al., 2014)

Adicionalmente, la despolimerización de la lignina catalizada por NaOH en medios acuosos ya se ha estudiado con anterioridad y su mecanismo se muestra en la Figura 1.5.

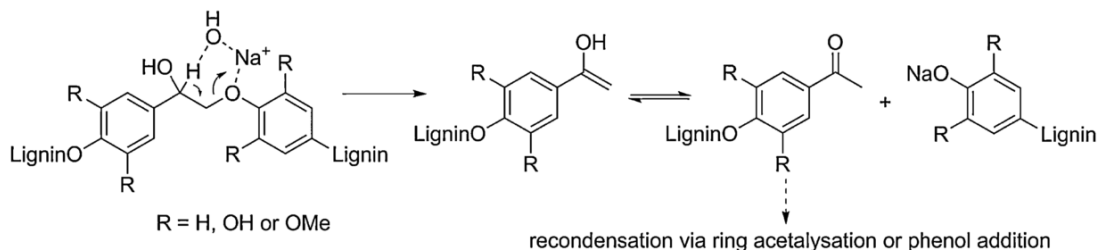


Figura 1.5. Mecanismo propuesto de la escisión catalizada por NaOH del enlace β -O-4 de la lignina (Deuss and Barta, 2016)

Existe una variedad de estudios reportados en la literatura en donde se ha aplicado el PA con hidróxido de sodio para la extracción de lignina en diferentes biomásas lignocelulósicas utilizando diversas condiciones experimentales (Tabla 1.4). Según Kang et al., (2018), las cargas de NaOH deben ser de 1-10 g NaOH/g ST, mientras que la temperatura debe de estar en el rango de 30°C-121°C para lograr una buena deslignificación. En estos trabajos se observa que la temperatura mínima es de 30 °C y la máxima es de 125 °C y las cargas de NaOH son un poco mayores por lo que la mejor deslignificación fue obtenida por Kang et al., (2018).

1.3.4. Pretratamientos secuenciales para deslignificar

El blanqueo con PH desempeña un papel importante en los procesos sin cloro debido a la estricta legislación ambiental y las rigurosas exigencias de calidad. La combinación de PH y oxígeno para el proceso de blanqueo, recientemente ha traído mucho interés debido a las características positivas, como una mejora en la capacidad de blanqueo y la selectividad. Tales procesos también reducen la emisión

Tabla 1.4. Estudios de deslignificación empleando el PA con hidróxido de sodio reportados en la literatura

Sustrato	Variables Experimentales					Referencia
	[NaOH] (% p/p)	Temperatura (°C)	Relación S:L (g/mL)	Tiempo (h)	Resultados (Remoción de lignina)	
Podas de melocotón	4.76 %p/p	125	0.5:10	0.75	37.19%	Buratti et al., 2018
Pennisetum Híbrido	8 %p/p	121	1:10	1	84.80%	Kang et al., 2018
Paja de arroz	100g/kg biomasa	80	1:4.7	1	53.98%	Kim et al., 2012
Paja de arroz	1.6 %p/p	30	1.6:10	24	-	Mancini et al., 2018
Cáscara de arroz	2 %p/p	121	1:4.7	0.66	54%	Shahabazuddin et al., 2018

de lignina clorada peligrosa y la "basura aniónica" en el efluente y disminuyen la demanda química de oxígeno y la demanda bioquímica de oxígeno (Liu et al., 2018). Se han publicado numerosos artículos que muestran que el refuerzo de la etapa de

deslignificación con oxígeno con PH y con perácidos aumenta la eficiencia de deslignificación. Parthasarathy et al., (1990) utilizó el refuerzo con PH de un proceso de deslignificación con oxígeno en dos etapas logrando una deslignificación del 73% con las pulpas kraft en comparación con el 61% para un proceso de deslignificación con oxígeno en dos etapas, en ausencia de peróxido.

En la sección 1.3.2. se mencionó que algunos metales de transición aceleran la descomposición del PH, por lo que es importante colocar una etapa quelante antes de realizar el pretratamiento con PHA, esto con la finalidad de que la mayor cantidad de PH se transforme a los radicales hidroxilo e hidroperoxilo que son los responsables del proceso de deslignificación.

Como se mencionó anteriormente, el pretratamiento de PHA puede mejorar significativamente la digestibilidad de la biomasa porque no solo elimina selectivamente la lignina, sino que también destruye las paredes celulares. Como se mencionó anteriormente, el pretratamiento de PHA puede mejorar significativamente la digestibilidad de la biomasa porque no solo elimina selectivamente la lignina, sino que también destruye las paredes celulares. Existen diferentes estudios reportados en la literatura donde se aplicó un pretratamiento secuencial con hidróxido de sodio seguido por PH (Tabla 1.5). En los primeros tres estudios mostrados en la Tabla 1.5, no tuvo un efecto significativo utilizar una etapa previa con NaOH, ya que se han alcanzado mayores remociones utilizando solo el pretratamiento con PHA (Tabla 1.3). Por otra parte, comparando los estudios de Velázquez-Valadez et al., (2016) (Tabla 1.5) y Pérez-Pimienta et al., (2016) (Tabla 1.3), se puede observar que el pretratamiento secuencial generó aproximadamente un 70% más de remoción de lignina.

Aunque este trabajo está enfocado en el uso de métodos químicos para remover lignina, es importante destacar que existen métodos biológicos utilizados para deslignificar. Existen enzimas que son capaces de actuar directamente sobre el polímero de lignina, como las peroxidasas o las lacasas, o bien cooperar en el proceso generando PH, como en el caso de las oxidasas. Específicamente las lacasas requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, ligninas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón resultando la formación de radicales libres (Córdoba-Bolaños & Cultid-Chamorro, 2015).

Tabla 1.5. Estudios de deslignificación por el pretratamiento secuencial alcalino con PHA reportados en la literatura

Sustrato	Variables Experimentales								Referencia
	[NaOH] (%)	[H ₂ O ₂] (%)	Temperatura (°C)		Relación S:L (g/mL)	Tiempo (h)		Resultados (Remoción de lignina)	
			NaOH	H ₂ O ₂		NaOH	H ₂ O ₂		
Bamboo	8 %p/p	6	100	75	1:10	3	3	45.10%	Yuan et al., 2018a
Paja de trigo	0.80 %p/p	40 mg/g biomasa	30	50	1:10	6	6	50%	Yuan et al., 2018b
Bamboo	10 %p/p	1	121	90	1:100	1	1	-	Yamashita et al., 2010
Bagazo de agave	6% p/p	6	121	30	1:5	1	24	82.62%	Velázquez- Valadez et al., 2016

1.4 Hidrólisis enzimática para el proceso de sacarificación

La hidrólisis utilizando enzimas apropiadas representa el método más efectivo para liberar azúcares simples de materiales celulósicos (Tabla 1.6). La hidrólisis de celulosa es catalizada por una clase de enzimas conocidas como celulasas. Al menos tres grupos principales de enzimas, a saber, endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa están implicados en la hidrólisis de celulosa a glucosa y su acción es sinérgica. Las endo-glucanasas atacan regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa y crea extremos de cadena libres. La exo-glucanasa degrada la

molécula aún más al eliminar las unidades de celobiosa de los extremos de la cadena libre, que luego se degrada a glucosa por la acción de la β -glucosidasa (Talebnia et al., 2010). Dentro de los factores que afectan la hidrólisis enzimática se encuentran el tipo y la concentración de sustrato, el índice de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización de la celulosa, el contenido de lignina y hemicelulosa, el tamaño de partícula y la porosidad del sustrato, entre otras (Alvira et al. 2010).

Las xilanasas son las siguientes enzimas en importancia que hidrolizan los componentes de la hemicelulosa en la biomasa. La adición de estas enzimas podría mejorar los rendimientos finales de azúcares (Khare et al., 2015; Talebnia et al., 2010).

La adsorción de enzimas sobre la celulosa es el primer paso en la hidrólisis. Sin embargo, la lignina también puede adsorber las enzimas de forma inespecífica, disminuyendo así la concentración de enzimas disponibles para la hidrólisis de la celulosa y, a su vez, el rendimiento de la hidrólisis (Li and Zheng, 2017). La inhibición de la celulasa por lignina puede clasificarse en varios tipos (Fig. 1.6): adsorción no productiva de celulasa sobre lignina, bloqueo físico del progreso de la celulasa en la cadena de celulosa, es decir, la lignina funge como barrera impidiendo el paso de las enzimas a las cadenas de la celulosa, inhibición de la enzima debido a compuestos solubles derivados de lignina y finalmente, algunas ligninas solubilizadas por el pretratamiento podrían recondensarse durante el pretratamiento y depositarse en la superficie de la celulosa, bloqueando el acceso enzimático a la celulosa (Li et al., 2018; Saini et al., 2016). El proceso de pretratamiento y aislamiento altera la estructura de la lignina, lo que influye en la interacción lignina-enzima debido a que las moléculas de lignina contienen múltiples grupos funcionales en su superficie (hidroxilos fenólicos y alifáticos, carboxilo, metoxilo) que le confieren diversas características como hidrofobicidad y cargas superficiales. Estos grupos funcionales pueden interactuar con la enzima de manera diferente y afectar el proceso de hidrólisis (Li et al., 2018). Por lo tanto, es necesario realizar una etapa de pretratamiento con la finalidad de extraer la lignina para evitar que se

presenten interacciones lignina-enzima y de esta manera aumentar el rendimiento de sacarificación.

Tabla 1.6. Condiciones de la hidrólisis enzimática del bagazo de agave pretratado reportadas en la literatura (Modificado de Palomo-Briones et al., 2018)

Pretratamiento	Enzima	Condiciones de la hidrólisis enzimática	Concentración de azúcares	Rendimiento de sacarificación	Referencia
Alcalino-Oxidativo	6% Cellic® CTec3a + 6% Cellic HTec3c	pH 5.0, 50°C, 72h	165.7 g/L	82.21%	Velázquez-Valadez et al., 2016
Alcalino	Cellic® CTec2 35 FPU/g + Cellic® HTec2c 60 CBU/g	pH 4.8, 55 °C, 72 h, carga del sólido 3% (p/p)	-	74.40%	Ávila-Lara et al., 2015
Organosolv	Cellic® CTec2 8 FPU/g + Cellic® HTec2 15 CBU/g	pH 4.8, 50 °C, 18 h, carga del sólido 10% (p/p)	67.7 g glucosa/L y 5.6 g xilosa/L	53.80%	Pérez-pimienta et al., 2017
Organosolv	NS50013d 10 PFU/g TS + NS50010e 20 CBU/g TS	pH 4.8, 50 °C, 72 h, carga de sólido 30% (p/p)	225 g glucosa/L	91%	Caspeta et al., 2014
Oxidativo	Celluclast 1.5L + Novozyme 188	pH 4.8, 55°C, 72h	6.9 g AR/L	-	Pérez-Pimienta et al., 2016
Oxidativo	Celluclast 1.5L + Viscozyme L	pH 5, 50°C, 12h	26.4 g/L	39.20%	Galindo-Hernández et al., 2017

-No reportado

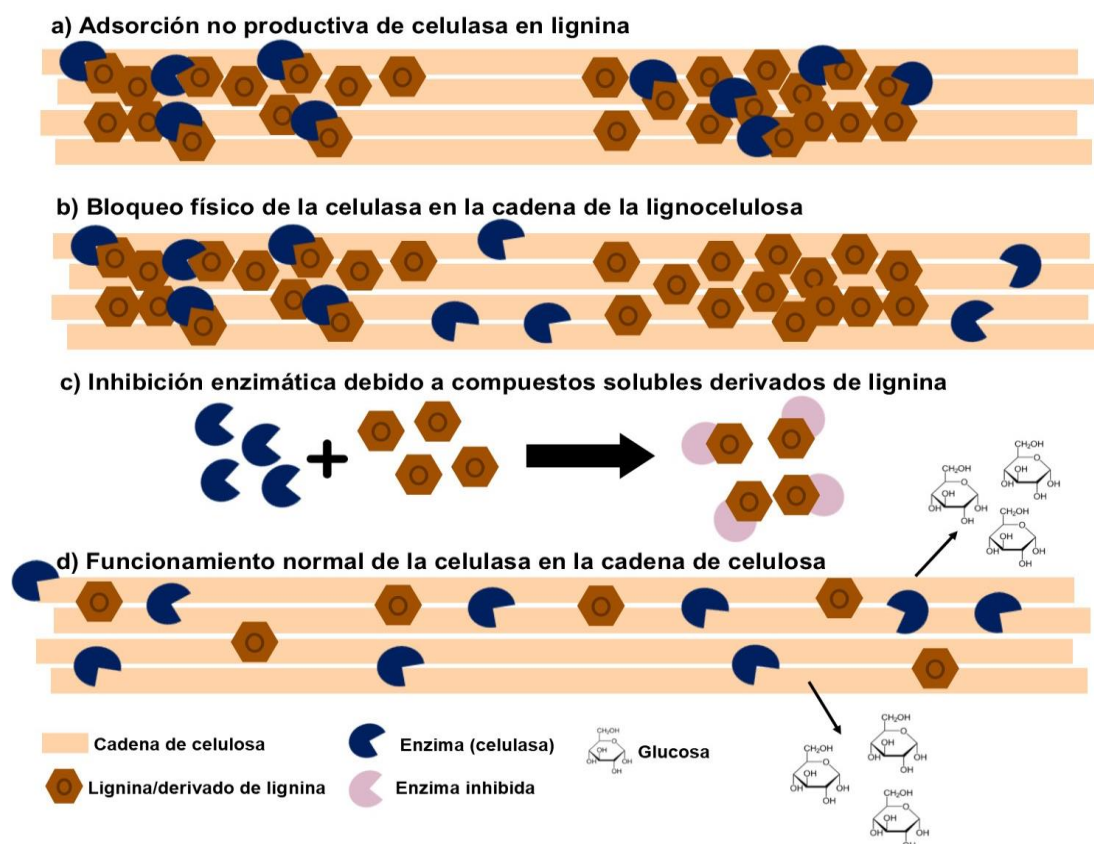


Figura 1.6. Tipos de inhibición de la celulasa por la lignina en el proceso de hidrólisis enzimática (Modificado de Saini et al., 2016)

1.5 Producción de metano

La digestión anaerobia es un proceso que involucra la transformación de la materia orgánica en biogás (metano, 60-70 %; dióxido de carbono, 30-40 %). Durante este proceso participan varios grupos de microorganismos que llevan a cabo un metabolismo coordinado en cuatro etapas (Fig. 1.7): la primera es la hidrólisis, donde la materia orgánica es hidrolizada, produciendo compuestos monoméricos (como los monosacáridos a partir de la hidrólisis de los polisacáridos). Esta etapa es el paso limitante de todo el proceso y para agilizarla se propone emplear enzimas, las cuáles son las responsables de convertir a los polisacáridos en sus respectivos monómeros. De esta manera los microorganismos solo se involucran en las tres etapas restantes de la digestión anaerobia. La segunda etapa es la acidogénesis, en la que a partir de los compuestos monoméricos se produce ácidos orgánicos de cadena corta como acetato, butirato y propionato; la tercera es la acetogénesis, caracterizada por la formación de acetato a partir de otros ácidos orgánicos como el butirato y propionato, y finalmente, la cuarta etapa es la metanogénesis, donde diversos microorganismos producen metano y dióxido de carbono a través de la ruta acetotrófica, a partir de acetato, e hidrogenotrófica, a partir de hidrógeno y dióxido de carbono (González-Sánchez et al., 2015). Es importante resaltar que los procesos de pretratamiento y sacarificación enzimática facilitan el proceso de hidrólisis de los polisacáridos, con lo que se elimina la hidrólisis como paso limitante de la digestión anaerobia. Esto incrementa considerablemente tanto la biodegradabilidad de la lignocelulosa como la velocidad de producción del metano.

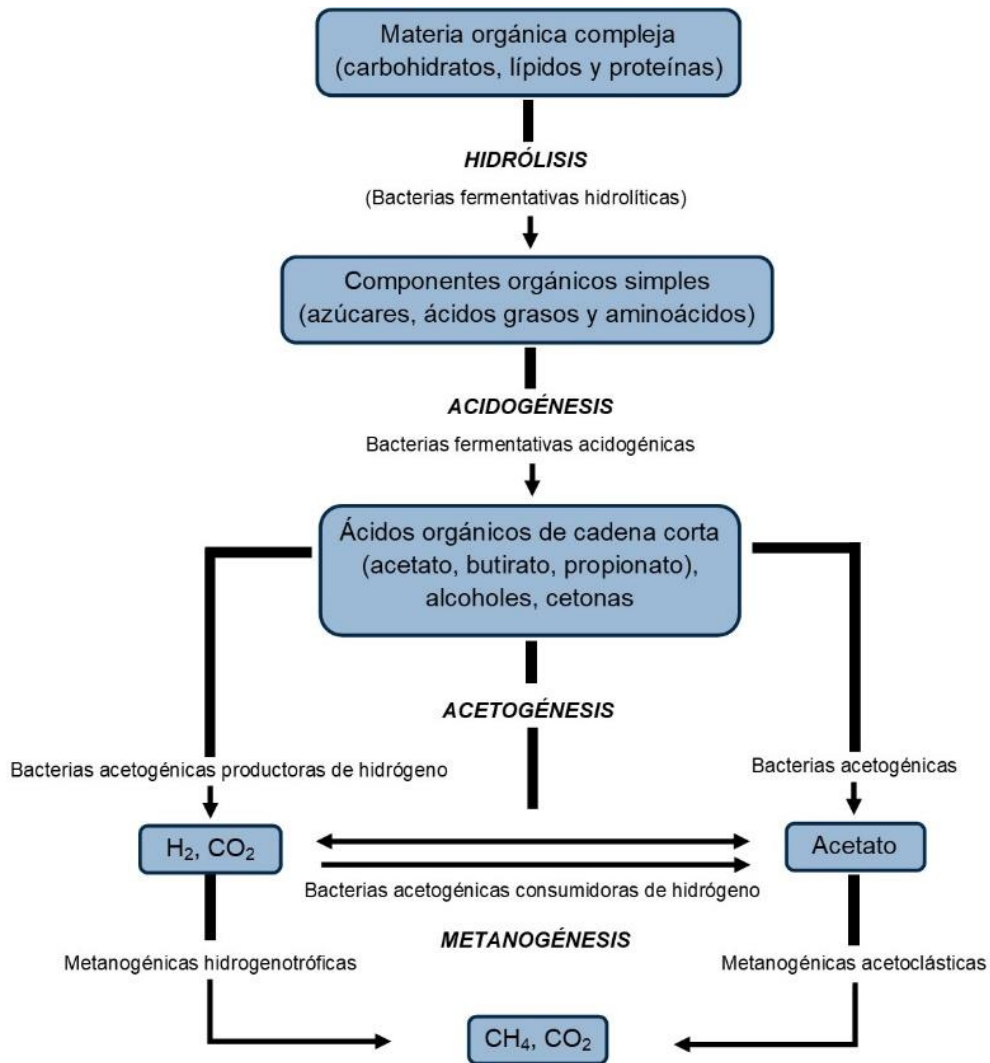


Figura 1.7. Diagrama de la digestión anaerobia para la producción de metano (Moraes et al., 2015)

Actualmente son pocos los trabajos reportados donde se haya utilizado hidrolizado enzimático de bagazo de agave para la producción de metano (Tabla 1.6). En cambio, se ha reportado la producción de metano empleando el efluente del proceso de producción de hidrógeno por medio de la fermentación oscura. La Tabla 1.6 muestra que los rendimientos de producción de metano por gramo de DQO añadida son similares ya sea a partir de hidrolizados enzimáticos o partir de los efluentes de la fermentación oscura. Sin embargo, la velocidad de producción de metano fue mayor cuando se emplearon efluentes de la fermentación oscura.

Tabla 1.7. Producción de metano a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave y efluentes del proceso de fermentación oscura a partir de hidrolizados de bagazo de agave.

Sustrato	DQO	Sistema	Rendimiento	Velocidad volumétrica	Referencia
Bagazo de agave (HE)	8 g/L	Lote	0.09 L CH ₄ /g DQO	700 mL CH ₄ /L.d	Arreola-Vargas et al., 2016
Bagazo de agave pretratado (HE)	5 g/L	Lote	0.20 L CH ₄ /g DQO	670 mL CH ₄ /L.d	Galindo-Hernández et al., 2017
Bagazo de agave: Efluente FO	20 g/L.d	UASB	0.32 L CH ₄ /g DQO	6400 mL CH ₄ /L.d	Montiel Corona and Razo-Flores 2018
Bagazo de agave: Efluente FO	2.25 g/L.d	ASBR	-	3400 mL CH ₄ /L.d	Toledo-Cervantes et al., 2018
Bagazo de agave: Efluente FO	2.5 g/L.d	Continuo	0.35 L CH ₄ /g DQO	900 mL CH ₄ /L.d	Cheng et al., 2016

HE: Hidrolizado enzimático
FO: Fermentación oscura

1.6. *Agave tequilana*

El género *Agave* es considerado originario de México, en donde se encuentran 272 de las 310 especies reportadas, de las cuales 135 especies son endémicas (Vega Quintana 2012). Cabe resaltar que el agave cosechado en cada extensión territorial es diferente al que se encuentra en otra región debido a que existen factores tales como la humedad, temperatura, ciclos naturales, y promedio anual de precipitación que afectan las características de éste (Iñiguez-Covarrubias et al., 2001)

El *Agave tequilana* Weber es una planta xerófila (que crece en zonas áridas y cálidas) de hojas color azul-verdoso, delgadas y casi planas, mide aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tiene una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm (Bautista-Justo et al., 2001). La parte importante del *Agave tequilana* para la producción de tequila es el tallo, comúnmente denominado “cabeza o piña”. Después de la extracción del jugo de las cabezas de agave cocidas, éstas se trituran y muelen para obtener un jarabe rico en azúcares. La biomasa

residual de este proceso se denomina bagazo y está compuesto de fibra y médula (Kestur G. et al. 2013).

1.7. Bagazo de *Agave tequilana* Weber var azul

En el periodo de 2013 a 2017, la industria del tequila utilizó aproximadamente 847 mil toneladas de piñas anuales para la elaboración de bebidas alcohólicas, de las cuales 339 mil toneladas (40%) corresponden a bagazo (CRT, 2018). El bagazo de agave es un residuo lignocelulósico compuesto por tres fracciones principales, celulosa (31-55% p/p), hemicelulosa (11-22% p/p) y lignina (11-20 % p/p) (Palomo-Briones et al., 2017; Fernández-Rodríguez et al., 2017).

Actualmente, el bagazo de agave tiene algunas aplicaciones tales como alimento para ganado, fabricación de materiales compuestos como tableros, sustrato para fines agrícolas como composta o en cultivos hidropónicos, herramienta para el tratamiento de biosólidos y vinazas y para la eliminación de residuos de mataderos, elaboración de ladrillos, colchones, materiales de embalaje, entre otros, pero la mayor parte se trata como desecho y se devuelve al campo (Iñiguez-Covarrubias et al. 2001; Iñiguez et al., 2014). Por otro lado, el bagazo de agave al ser un residuo lignocelulósico y, bajo el contexto de cambio climático y energías renovables, es una materia prima potencial para la producción de biocombustibles, así como subproductos de valor agregado en un esquema de biorrefinería.

1.7.1. Composición química del bagazo de *Agave tequilana*

Uno de los principales componentes químicos que se ven implicados en el comportamiento mecánico y estructural del bagazo de agave, es el material lignocelulósico, que está constituido por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita la lignina (Vega Quintana 2012).

La celulosa es un homopolisacárido lineal conformado por subunidades de celobiosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4); ésta, a su vez, está formada por dos unidades de glucosa. La disposición espacial de estas cadenas lineales,

permite que se formen puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las cadenas adyacentes paralelas, lo que resulta en la cristalinidad de la celulosa. Las regiones cristalinas son separadas por regiones menos ordenadas conocidas como amorfas. Se sabe que la celulosa es más susceptible a la degradación microbiana en su forma amorfa (Monlau et al., 2014; Vega Quintana 2012).

La hemicelulosa es un heteropolisacárido constituido principalmente por hexosas (manosa, galactosa y glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa). Está conectada con las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno que se forman entre los grupos de los diferentes azúcares mejorando con esto la resistencia de la pared celular (Xu et al., 2013; Vega Quintana 2012).

La lignina es uno de los tres componentes principales de la biomasa lignocelulósica y se considera el principal recurso renovable aromático en el mundo (Carvajal et al., 2016). Su estructura está conformada principalmente de unidades fenilpropanoides que incluyen al alcohol para-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Las unidades monoméricas fenilpropanoides correspondientes en el polímero de lignina se identifican como unidades de p-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (Isikgor and Becer, 2015).

La lignina es un subproducto en el pretratamiento y la sacarificación de la biomasa, así como un coproducto en la industria del papel que produce alrededor de 50 millones de toneladas de lignina al año (Alekhina et al., 2015). Su aplicación y los procesos específicos de funcionalización dentro de la refinería de biomasa hacen que la lignina sea una fuente potencial de productos de valor agregado en los campos de investigación química, alimentaria, farmacéutica, textil y cosmética. Actualmente, aproximadamente el 5% de la producción mundial de lignina se ha comercializado para la formulación de adhesivos, dispersantes, surfactantes, antioxidantes y cauchos, mientras que el 95% restante se utiliza principalmente para producir energía a través de sistemas de cogeneración. La lignina se puede encontrar en diferentes formas y se puede aislar mediante diferentes procesos de extracción, como tratamientos mecánicos, físicos, químicos y enzimáticos, entre otros (Carvajal et al., 2016).

1.8 Justificación

En el periodo de 2013-2017, la industria del tequila en México utilizó en promedio 847 mil toneladas de agave para la producción de bebidas alcohólicas como el tequila (CRT, 2018) generando bagazo como residuo, que corresponde al 40% del agave utilizado por la industria tequilera. Actualmente, el bagazo de agave se ha utilizado en diversas aplicaciones en pequeña escala. Por otro lado, el bagazo de agave es un residuo potencial para emplearse en un esquema de biorefinería, ya que al ser un residuo lignocelulósico puede ser utilizado en la producción de metano además de obtener una gran variedad de subproductos como lo es la lignina que posee diversas aplicaciones industriales.

La composición química de la pared celular de este tipo de biomasa presenta una desventaja para su uso, puesto que la lignina dificulta la solubilización de celulosa y hemicelulosa. Además, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en maximizar la producción de metano dejando de lado los subproductos obtenidos.

Por consiguiente, es necesario una etapa de pretratamiento que nos permita extraer la mayor cantidad de lignina dejando fibras enriquecidas en celulosa y hemicelulosa que pueden emplearse para la producción de metano. Dentro de los pretratamientos químicos se encuentra el organosolv con el cual se extrae una lignina más nativa, mientras que con los pretratamientos de PHA y alcalino se obtiene una lignina menos nativa. La importancia de utilizar diferentes pretratamientos radica en los diferentes porcentajes de extracción de lignina que se pueden lograr, así como la aplicación industrial que pudieran tener las diferentes clases de lignina extraídas. Debido a lo anterior, este trabajo se avocó a evaluar la capacidad de deslignificación de los tres procesos mencionados. Así mismo, se evaluó el impacto de la deslignificación sobre la sacarificación enzimática y sobre la producción de metano a partir de los hidrolizados enzimáticos.

1.9. Hipótesis

La aplicación de diferentes pretratamientos al bagazo de agave permitirá obtener ligninas con diferentes características química y aplicaciones industriales. Además, el uso posterior de una preparación enzimática comercial nacional (Stonezyme) permitirá hidrolizar de manera eficiente los polímeros de celulosa y hemicelulosa presentes en las fibras de bagazo de agave deslignificadas aumentando con ello el rendimiento de sacarificación y, por ende, la producción de metano en lote.

1.10 Objetivos

1.10.1. Objetivo general

Implementar un procedimiento eficiente para la extracción de lignina y evaluar su efecto sobre la producción de metano a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana*.

1.10.2. Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia de extracción de lignina del bagazo de *Agave tequilana* de tres pretratamientos químicos: PHA, organosolv con etanol y alcalino con NaOH.
- Determinar las características químicas de las fibras (grupos funcionales, y contenido de metales) y ligninas (grupos funcionales, contenido de metales y cenizas) obtenidas por los diferentes pretratamientos.
- Determinar las características estructurales de las fibras (índice de cristalinidad y morfología microscópica) y ligninas (temperatura de transición vítrea) obtenidas por los diferentes pretratamientos.
- Evaluar el efecto de la deslignificación del bagazo de agave sobre la sacarificación enzimática de las fibras obtenidas por los diferentes pretratamientos.
- Evaluar el efecto de la deslignificación del bagazo de agave sobre la producción en lote de metano producido a partir de los hidrolizados enzimáticos de las fibras obtenidas por los diferentes pretratamientos.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Estrategia Experimental

En la Figura 2.1 se encuentra resumida de forma gráfica la estrategia experimental que se describe a continuación.

Uno de los propósitos de este estudio consistió en someter al bagazo de agave generado durante la producción de tequila a una serie de pretratamientos con el objetivo de extraer la mayor cantidad de lignina posible y obtener fibras ricas en celulosa y hemicelulosa. El primer pretratamiento, denominado organosolv, utilizó una solución etanol-agua mientras que en el segundo se empleó PH a pH 11.5. Adicionalmente, se evaluó un PA utilizando hidróxido de sodio al 6% p/p y dos pretratamientos secuenciales, hidróxido de sodio seguido de PHA e hidróxido de sodio seguido de organosolv. El bagazo de agave se caracterizó antes de los pretratamientos. Se determinó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina mediante el análisis de fibras por el método de Van Soest. También se determinó el grado de cristalinidad de la celulosa por medio de difracción de rayos X (XRD). Otro análisis que se llevó a cabo fue la determinación de los grupos funcionales presentes mediante el análisis de ATR-FTIR. Con la finalidad de determinar los elementos químicos presentes en el bagazo de agave se realizó el análisis de espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Finalmente se determinó la estructura morfológica de las fibras mediante el uso del microscopio electrónico de barrido (SEM).

De cada proceso evaluado se obtuvieron dos fracciones. Una sólida, la cual es rica en holocelulosa (suma de celulosa y hemicelulosa) y otra líquida, rica en lignina. La fracción sólida se caracterizó de la misma forma que fue caracterizado el bagazo sin pretratamiento (BSP) (Van Soest, XRD, ATR-FTIR y SEM). Una vez caracterizada, la fracción sólida se sometió a una hidrólisis enzimática utilizando la preparación enzimática Stonezyme.

De la fracción líquida rica en lignina se llevó a cabo la precipitación de lignina en condiciones ácidas para obtenerla en forma sólida. Esta lignina sólida fue

caracterizada mediante la determinación de los grupos funcionales por espectroscopia ATR-FTIR. Con la finalidad de determinar los elementos químicos presentes en la lignina se realizó el análisis de espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Además, se determinó su comportamiento térmico mediante el análisis termogravimétrico (TGA) y la Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC).

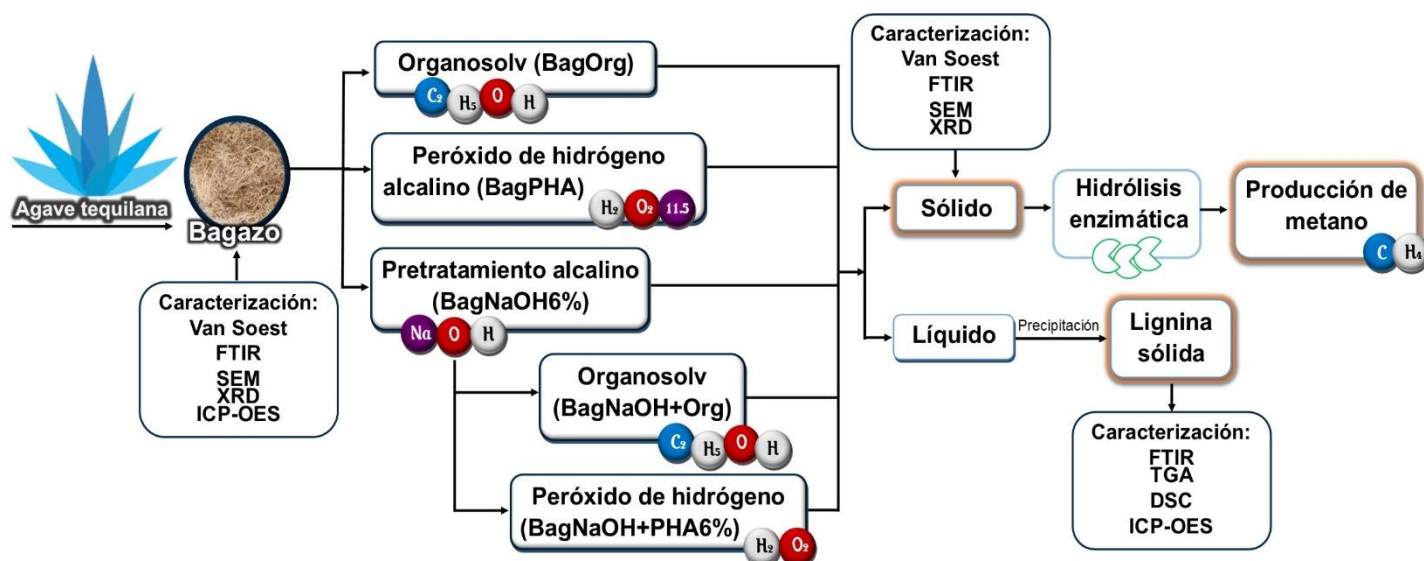


Figura 2.1. Diagrama de la estrategia experimental utilizada en este estudio.

2.2. Materia prima

El bagazo de agave fue colectado en la tequilera Casa Herradura, ubicada en Amatitán, Jalisco. El bagazo se secó al sol, se trituro (500 μm - 3.35 mm), lavó y nuevamente se secó al sol para someterse a una serie de pretratamientos químicos: organosolv, PHA, alcalino, álcali + PHA, álcali+ organosolv.

2.3. Caracterización de las fibras de bagazo de agave antes y después de los procesos químicos

2.3.1. Análisis de fibras

El contenido de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) de BSP y fibras de bagazo con pretratamientos (BCP) se determinó utilizando el método propuesto por Van Soest, reportado por Keys et al., (1969), en el cual se emplea un procedimiento secuencial ANKOM (California, EE.UU) en bolsas de poliéster. Para

ello se realizó la determinación de Fibra Detergente Neutra (FDN), Fibra Detergente Ácida (FDA) y Lignina Detergente Ácido (LDA).

2.3.2. XRD

El índice de cristalinidad de la celulosa de BSP y BCP se determinó utilizando un Difractómetro de Rayos-X (XRD, por sus siglas en inglés) Bruker D8 Advance, (Tokio, Japón), con radiación monocromática Cu K α ($\lambda=1.5818$ Å), con un voltaje de 44 keV y una corriente de 25 mA. Las fracciones de las fibras se analizaron en un intervalo 2θ de 5-70°. Se utilizó un estándar de celulosa microcristalina (AVICEL PH101) para determinar los picos de celulosa microcristalina, los cuáles se reportan en la literatura que están a valores de 2θ de 15°, 16.5°, 22.8° y 34.6°. Park et al., (2010) reportan la Ecuación 2.1 la cual se utilizó para determinar el índice de la cristalinidad, mediante el método de convolución, con la ayuda del programa MagicPlot, el cual permite separar las dos fracciones de la celulosa microcristalina mediante un ajuste de curvas Gaussianas para cada pico.

$$IC = \frac{I_c}{I_c + I_a} * 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

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

2.3.3. ATR-FTIR

Los grupos funcionales presentes en BSP y BCP se analizaron con la técnica ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared). Los espectros se obtuvieron en el equipo Thermo-Nicolet, Nexus 470 FT-IR E.S.P, (EE. UU). El rango de cada uno de los espectros fue de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 120 escaneos. Las muestras analizadas fueron secadas previamente a 60 °C por 24 h. Se utilizó un estándar de celulosa microcristalina (AVICEL PH101) con la finalidad de determinar los grupos funcionales presentes en la celulosa.

2.3.4. SEM

La fibra de bagazo de agave antes y después de los pretratamientos se caracterizaron morfológicamente empleando el Microscopio Electrónico de Barrido

(SEM) ESEM FEI-QUANTA 200 (Holanda). Se llevó a cabo el análisis morfológico superficial, y el análisis químico por espectroscopia de dispersión de energía (EDS); todo esto a bajo vacío.

2.3.5. ICP-OES

La determinación de los elementos químicos presentes en BSP se llevó a cabo mediante el análisis de espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Para ello, se colocaron 2 g de muestra en un vaso de precipitados, a los cuales se le agregaron 10 mL de HNO₃. Después el vaso de precipitados se colocó en una parrilla a 220 °C con agitación. Para evitar la pérdida de vapores, se colocó un vidrio de reloj en la parte superior del vaso de precipitados. Con la finalidad de completar la destrucción de la materia orgánica, se agregaron unas gotas de H₂O₂ al 30%. Cuando la muestra se disolvió completamente en el ácido, el vaso fue retirado de la parrilla y una vez frío, la muestra fue filtrada y aforada a 10 mL. Finalmente, la muestra fue analizada por espectroscopía de plasma ICP-OES (Varian 730-ES) a una longitud de onda de 422.67 nm.

2.4. Caracterización de las ligninas extraídas del bagazo de agave

2.4.1. ATR-FTIR

Los grupos funcionales presentes en las ligninas extraídas por los diferentes pretratamientos se analizaron con la técnica ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared). Los espectros se obtuvieron en el equipo Thermo-Nicolet, Nexus 470 FT-IR E.S.P. como ya se describió en la sección 2.3.3.

2.4.2. TGA

Las ligninas extraídas de cada pretratamiento se sometieron al análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés). Para ello se colocaron 25 mg de cada muestra en el analizador TGA Setaram modelo Setsys Evolution (Francia). La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min. El intervalo de temperatura para los termogramas fue de 25-800 °C con una atmósfera de aire a un flujo de 20 mL/min. Todas las muestras fueron secadas previamente a 60 °C por 24 h.

2.4.3. DSC

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es un método de caracterización física utilizado para estudiar el comportamiento térmico de polímeros, copolímeros, mezclas de polímeros y compuestos puros (Gregorova 2013). Por medio de esta técnica se pueden determinar tres temperaturas características de materiales poliméricos: temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_m). La primera se presenta en regiones amorfas y las otras dos se presentan en regiones cristalinas del polímero. Una explicación detallada de cada una de estas temperaturas se proporciona en el Anexo 1.

Debido a que la lignina es un material amorfo solo se determinó la temperatura de transición vítrea de las ligninas obtenidas. Se empleó un calorímetro diferencial de barrido Q200 V24.4 (EE. UU). Se colocaron 5 mg de muestra con una atmósfera de argón a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Las ligninas se calentaron de 25 °C a 200 °C. Previamente, cada muestra se corrió de 25-100 °C y se mantuvieron por 10 min a 100 °C, después se enfriaron a 25 °C con la finalidad de eliminar interferencias por la humedad.

2.4.4. ICP-OES

La determinación de los elementos químicos presentes en las ligninas se llevó a cabo mediante el análisis de espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) descrito en la sección 2.3.5.

2.5. Procesos químicos para la obtención de lignina de bagazo de *Agave tequilana*

2.5.1. Proceso de organosolv

El procedimiento de organosolv que se empleó fue propuesto por Fernández-Rodríguez et al., 2017. El proceso de organosolv consistió en colocar el bagazo de agave en un frasco Schott de 2L, posteriormente se agregó una solución de etanol-agua al 70%, en una relación 1:15 g/mL, tratando de que toda la biomasa quedara impregnada de dicha solución. Después, los frascos se colocaron en una olla, se

cubrió con arena y se puso en la estufa a 140 °C durante 90 min. Transcurrido ese tiempo, y una vez fría la olla, se sacó el frasco Schott., con la ayuda de un colador el líquido fue filtrado, se le agregaron dos volúmenes de agua acidificada a pH 2 y se dejó durante 12 h para lograr la precipitación de la lignina. Con lo que respecta a la fibra, se le realizaron dos lavados con una solución de etanol-agua al 70% y posteriormente con agua destilada hasta llegar a pH neutro. Finalmente, ésta se colocó en una charola y se dejó secar en una estufa a 60 °C por 24 h para su posterior análisis.

2.5.2. Proceso de PHA

Esta metodología fue propuesta por Munguía-Aguilar, 2016. El bagazo de agave fue colocado en un matraz Erlenmeyer de 2 L con una solución de PH a diferentes concentraciones, en una proporción de 1:20 (p/v). Se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 5 M. La suspensión sólido/líquido se incubó a 50 °C, con una agitación de 120 rpm por 1.5 h. Posteriormente, la mezcla se filtró para separar la biomasa de una solución con coloración amarilla. Los residuos sólidos se lavaron con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secaron en estufa a 60 °C por 24 h.

El líquido amarillo obtenido de la filtración del procedimiento anterior se recuperó y se ajustó a pH de 5.5 con HCl 6 M. Luego, se le añadieron tres volúmenes de etanol al 95% y se incubó estáticamente durante 8 h para precipitar el sólido enriquecido en hemicelulosa. La recuperación de este sólido se llevó a cabo por centrifugación. Después, se lavó con etanol al 70% y posteriormente se secó a 60 °C. El líquido residual se concentró cuatro veces en rotavapor, con la finalidad de recuperar el etanol. A la solución concentrada, se le ajustó el pH a 1.5 con HCl 6 M con el objetivo de precipitar la lignina insoluble ácida. La lignina insoluble se separó del líquido por filtración, se lavó tres veces con agua acidificada (pH 2) y se secó a 40 °C.

2.5.2.1. Diseño experimental de proceso de PHA

Con la finalidad de determinar los factores que afectan más significativamente a la remoción de lignina en el proceso de PHA se realizó un diseño experimental factorial

2^k con puntos centrales, donde k es el número de factores experimentales, empleando el programa Design-Expert. Previamente a la elaboración del diseño experimental, se realizó una revisión bibliográfica con la finalidad de determinar las variables experimentales a evaluar. Se encontró que la concentración de peróxido, la temperatura y el tamaño de partícula eran los factores más estudiados y que presentaban una variabilidad mayor. Por ello, para la elaboración del diseño experimental se escogieron como niveles experimentales los valores mínimos y máximos de estos factores, como se reporta en la Tabla 2.1. Cabe resaltar que el tamaño de partícula en realidad es un rango, es decir, se evaluaron los tamaños de partículas mayores a 3.35 cm, menores a 2.525 cm y menores a 1.7 cm. Asimismo, se decidió fijar la relación sólido/líquido a 1:20 g/mL como lo reporta Su et al. (2015) y el tiempo a 1.5 h, debido a que en el trabajo realizado por Galindo-Hernández et al., (2018), donde se utilizó PHA como pretratamiento en el bagazo de agave, se determinó que a 1.5 h se obtenía la mayor deslignificación. La variable de respuesta fue el porcentaje de remoción de lignina y se evaluó mediante un diagrama de Pareto, el cual arrojó los factores más significativos para el pretratamiento de PHA.

Tabla 2.1. Factores y niveles experimentales evaluados en el diseño factorial 2^k para la determinación de las mejores condiciones del PHA

Factores	Niveles			
	Mínimo	Central	Máximo	Unidades
[H ₂ O ₂]	1.0	4.18	7.36	%
Temperatura	23	36.5	50	°C
Tamaño de partícula	<1.7	2.525	>3.35	mm

2.5.3. Proceso alcalino

Este método fue propuesto por Velázquez-Valadez et al., (2016). El bagazo de agave fue colocado en un frasco Schott de 2 L con una solución de hidróxido de sodio al 6% en peso, en una proporción 1:5 g/mL. El frasco Schott se colocó en el autoclave a 120 °C y 2 atm durante una hora. Una vez frío el frasco, la mezcla se filtró para separar la biomasa del líquido café. El sólido se lavó con agua destilada

hasta pH neutro. El líquido café se ajustó a pH 2 con H_2SO_4 con la finalidad de precipitar el sólido enriquecido en lignina. La recuperación de este sólido se llevó a cabo por centrifugación. Posteriormente al sólido se le realizaron tres lavados con agua acidificada y se secó en la estufa a 60 °C durante 24 h.

2.5.4. Proceso alcalino-organosolv

Este pretratamiento secuencial fue una combinación de los métodos reportados por Velázquez-Valadez et al., (2016) y Fernández-Rodríguez et al., (2017), de modo que después de realizar el PA y haber lavado la fibra hasta pH neutro se prosiguió con el pretratamiento de organosolv como se describió con anterioridad.

2.5.5. Proceso alcalino-PH

Este método fue reportado por Velázquez-Valadez et al., (2016). Después de realizar el PA como se describió con anterioridad, al frasco Schott se le agregó una solución de PH al 6% manteniendo la misma relación sólido/líquido, luego se incubó a 30 °C sin agitación durante tres tiempos diferentes 1.5 h, 6 h y 24 h. Posteriormente, la mezcla se filtró para separar la biomasa de una solución con coloración naranja. La fibra se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secó en estufa a 60 °C por 24 h. El líquido naranja se sometió al procedimiento propuesto por Su et al., 2015 para precipitar la lignina descrito con anterioridad.

Cabe resaltar que para este pretratamiento no se ajustó el pH a 11.5 como en el caso de los pretratamientos individuales porque después de agregar la solución de PH al 6% el líquido tenía un pH aproximadamente de 13. Con base en el diagrama de especiación para el PH (Anexo 2) se aprecia que a partir de un pH de 11.5, la concentración de los radicales hidropéroxidos se mantiene constante mientras que la concentración de los radicales hidroxilos incrementa hasta un pH de 14. Por tal motivo, mientras las condiciones sean más alcalinas, las concentraciones de los radicales hidroxilo se incrementará, por lo que se esperaría una mayor deslignificación (Munguía-Aguilar, 2016).

2.5.6. Cálculo de la remoción de lignina

Los porcentajes de remoción y recuperación de lignina para cada pretratamiento empleado se calcularon mediante el balance de masa, el análisis de fibras (Van Soest) y las siguientes ecuaciones.

$$\% \text{ Remoción} = \frac{L_{ap} - L_{dp}}{L_{ap}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

L_{ap} : Cantidad de lignina antes del pretratamiento presente en la fibra (g)
 L_{dp} : Cantidad de lignina después del pretratamiento presente en la fibra (g)

$$\% \text{ Recuperación} = \left(1 - \frac{L_r - L_{rec}}{L_r}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2.3}$$

$$L_r = L_{ap} - L_{dp} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde:

L_r : Cantidad de lignina removida después del pretratamiento (g)
 L_{rec} : Cantidad de lignina recuperada después de la precipitación (g)

2.6. Tratamiento enzimático

2.6.1. Condiciones de la hidrólisis enzimática

Las fibras de bagazo de agave pretratadas y sin pretratar fueron sometidos a una hidrólisis enzimática empleando Stonezyme (ENMEX, Estado de México), la cual es una preparación enzimática de fabricación nacional. Stonezyme es una enzima con actividad de celulasa principalmente y es utilizada en formulaciones de detergentes para eliminar el pilling y mejorar la apariencia de las prendas. Fue caracterizada por el grupo de trabajo y presentó las siguientes actividades con sustratos modelo: Celulasa: 44.53 FPU/mL, 1-4 β endoglucanasa: 560.42 EGU/mL, β glucosidasa: 6.19 U/mL y Xilanasa: 13312 U/mL.

En base a las actividades anteriores, la preparación enzimática Stonezyme presenta una actividad de celulasa comparable a la de Celluclast 1.5L y Viscozyme L (Anexo 3), las cuáles se han usado para hidrolizar biomasa lignocelulósica. Es importante resaltar que Stonezyme presenta una alta actividad de xilanasa, medida

con un sustrato modelo. Sin embargo, no necesariamente dicha actividad se expresa al hidrolizar el bagazo, por lo que, actualmente, se está midiendo la actividad de xilanasas sobre el bagazo.

Las condiciones óptimas para emplear Stonezyme también fueron determinadas por el grupo de trabajo. Estas condiciones fueron: 73.64 g/L de fibras de bagazo de agave suspendido en 25 mL de buffer de citratos a pH 6.21 y con 36.52 mg de proteína/mL de enzima Stonezyme. Todas las hidrólisis se incubaron a 50 °C por 12 horas a 120 rpm.

2.6.2. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos

2.6.2.1. Azúcares totales

La determinación de azúcares totales (AT) para cada hidrolizado se llevó a cabo en tubos HATCH, a los cuáles se les agregó 500 µL de muestra, 500 µL de fenol al 5% y 2.5 mL de ácido sulfúrico. Después se mezclaron y dejaron enfriar. Posteriormente fueron leídos en el espectrofotómetro a 490 nm. Como blanco se utilizó agua destilada (DuBois et al., 1956).

2.6.2.2. Demanda química de oxígeno

La determinación de DQO total para cada hidrolizado se llevó a cabo en tubos HATCH, a los cuáles se les agregó 2 mL de muestra, 2.5 mL de la solución digestora y 3.7 mL de la solución catalizadora. Posteriormente los tubos fueron colocados en el digestor a 150 °C y 2 h. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos se colocaron en una gradilla y se dejaron enfriar. Después fueron leídos en el espectrofotómetro a 600 nm. Como blanco se utilizó agua destilada (APHA, 1998).

2.7. Cinéticas de producción de metano

2.7.1. Producción de metano en lote

Los ensayos de producción de metano en lote se realizaron en un equipo con sistema automático de potencial de metano (AMPTS II. Bioprocess Control. Lund, Suecia), empleando el Protocolo BMP sustratos líquidos reportado en el grupo de trabajo. Para ello se utilizaron botellas de vidrio de 600 mL, con un volumen de

trabajo de 360 mL y un espacio de cabeza de 240 mL. Las condiciones de operación fueron: temperatura de incubación de 37 °C, tiempo de mezclado de 1 min a 120 rpm seguido de 3 min sin agitación, pH 7.

A cada botella se le agregó medio mineral (Tabla 2.2), 10 g SVT/L de inóculo y 5 gDQO/L de sustrato con la finalidad de alcanzar una relación sustrato/inóculo de 1:2 gSVT/gDQO. Adicionalmente, para llevar la alcalinidad final de la mezcla a un valor cercano a 3 gCaCO₃/L y mantener un pH entre 6.8 y 7.2, se agregó bicarbonato de sodio. Como sustrato se utilizaron los hidrolizados enzimáticos obtenidos de los mejores pretratamientos (en términos de producción de AT). Los ensayos se evaluaron por triplicado. Adicionalmente, se evaluó un control de glucosa, así como un control endógeno donde solo se empleó inóculo y medio mineral. A cada botella se le realizó un intercambio de atmósfera con gas N₂ durante 45 s para garantizar condiciones anaerobias.

Tabla 2.2. Medio mineral utilizado en los ensayos de producción de metano en lote

Solución A (100X)		Solución B (500X)	
Reactivo	Cantidad (g)	Reactivo	Cantidad (g)
NH ₄ Cl	100	KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	200
CaCl ₂ .H ₂ O	5		
MgCl.6H ₂ O	10		
NaCl	10		

2.7.2. Cálculos para la producción de metano

$$Rendimiento = \frac{P_M}{DQO_c * V_r} [=] \frac{NmLCH_4}{g DQO_c} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

P_M = Producción de metano corregida por el control endógeno

DQO_c = Demanda química de oxígeno consumida

V_r = Volumen de reacción

$$H(t) = Hmax * exp \left\{ -exp \left[\frac{2.71828 * Rmax}{Hmax} \right] (\lambda - t) + 1 \right\} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$H_{max} = \text{Máxima producción de metano} [=] \frac{NmL CH_4}{L_r}$$

$$R_{max} = \text{Velocidad máxima de producción de metano} [=] \frac{NmL CH_4}{L_r * d}$$

$$t = \text{tiempo} [=] d$$

$$\lambda = \text{Fase lag o tiempo de aclimatación de los microorganismos} [=] d$$

2.8. Cálculos para la conversión del bagazo de agave

$$\frac{g \text{ Celulosa}}{g \text{ bagazo}} = \frac{B_i * C_c}{B_i} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

$$\frac{g \text{ Hemicelulosa}}{g \text{ bagazo}} = \frac{B_i * C_h}{B_i} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

$$\frac{g \text{ lignina}}{g \text{ bagazo}} = \frac{L_r}{B_i} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

$$\frac{g CH_4}{g \text{ bagazo}} = \frac{P * V}{R * T} * PM \quad \text{Ecuación 2.11}$$

$B_i = \text{Bagazo inicial (g)}$

$C_c = \text{Composición de celulosa (\%)}$

$C_h = \text{Composición de hemielulosa (\%)}$

$L_r = \text{Lignina removida (g)}$

$P = \text{Presión} = 1 \text{ atm}$

$T = \text{Temperatura} = 293.15 \text{ K}$

$V = \text{Volumen producido de metano} [=] L$

$R = \text{Constante de los gases ideales} = 0.08205 \frac{\text{atm. L}}{\text{mol. K}}$

$PM = \text{Peso molecular del metano} = 16 \frac{g}{mol}$

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1. Composición química del bagazo de *Agave tequilana*

La composición química de BSP y BCP se muestran en la Tabla 3.1, así como los valores reportados en la literatura por Fernández-Rodríguez et al., (2017). El porcentaje de la concentración de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas es similar al valor reportado en la literatura. En lo que respecta al porcentaje de compuestos solubles, éstos difieren del valor reportado por Fernández-Rodríguez et al., (2017). Esta diferencia se debe principalmente a la metodología utilizada para determinar la composición química del bagazo de agave. En este estudio se utilizó el método de análisis de fibras propuesto por Keys et al., (1969), que consiste en hidrólisis secuenciales de la fibra de bagazo de agave con la finalidad de ir removiendo un componente en cada paso. En este caso, los compuestos solubles constan de proteína, almidón, azúcares, ácidos orgánicos y pectina. Mientras que en la metodología utilizada por Fernández-Rodríguez et al., (2017) primeramente se remueven los extraíbles (carbohidratos no estructurales) y, posteriormente a esa fibra sin extraíbles se le determinó el porcentaje de lignina mediante el método estándar TAPPI (Tappi standard, 2011) y el contenido de holocelulosa (Wise et al., 1946) y celulosa (Pettersen, 1984).

Por otro lado, para BCP se observa un incremento significativo en el porcentaje de celulosa. Esto se debe principalmente a que durante los pretratamientos se removió un porcentaje considerable de hemicelulosa, lignina y compuestos solubles, lo que se vio reflejado en un aumento en el porcentaje de celulosa. No hay que olvidar que los pretratamientos no son selectivos, pero con base en los balances de masa (Anexo 5), se puede corroborar que, para este caso, los pretratamientos se principalmente atacaron a la lignina. No obstante, sería importante evaluar otros parámetros en la fibra como lo son el número kappa, para la determinación de la lignina residual en las fibras pretratadas, y la viscosidad con la finalidad de determinar el grado de degradación de la celulosa.

Por otra parte, una de las desventajas del método de análisis de fibras es que subestima la cantidad de lignina presente en la muestra, debido a que la lignina ácido soluble no puede ser determinada. Este problema podría ser resuelto empleando otras metodologías para determinar la composición química de las fibras. Una de estas metodologías es la propuesta por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL).

Tabla 3.1. Composición química de BSP y BCP para este estudio y valores reportados en la literatura

Muestra	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Solubles (%)	Cenizas (%)
BSP	59.82±0.18	8.91±0.3	12.45±0.036	15.87±0.079	3.41±0.19
BSP*	54.60±1.70	13.95±0.28	16.20±0.48	5.42±0.23	4.50±0.33
BagOrg	57.95±0.25	10.53±0.81	12.02±0.26	12.48±0.14	5.31±0.13
BagNaOH	72.54±0.97	5.50±0.23	10.64±0.5	6.69±1.26	3.91±0.28
BagNaOH+Org	75.90±0.47	6.51±0.11	11.22±0.22	2.4±1.34	3.48±0.19
BagPHA7.36%	68.66±0.13	10.20±0.16	5.72±0.06	11.72±0.01	3.46±0.14
BagPHA15%	63.33±0.01	8.85±0.18	3.76±0.07	19.09±0.37	4.90±0.09
BagNaOH+PHA6%	70.53±0.05	6.66±0.33	7.81±0.13	9.90±0.97	5.67±0.14

* Datos reportados por Fernández-Rodríguez et al., 2017

3.1. Pretratamiento de PHA: evaluación de las mejores condiciones para la extracción de lignina.

El diseño factorial 2^k mencionado en la sección 2.5.2.1, generó once experimentos, los cuáles se muestran en la Tabla 3.2. El experimento 11 presentó las mejores condiciones para la extracción de lignina, lográndose un 67.28% de deslignificación. Rabelo et al., (2014) reportaron un 87.12% de remoción de lignina en el bagazo de caña de azúcar utilizando condiciones similares. Esta diferencia de remoción puede deberse a que las biomasas utilizadas son diferentes, así como el porcentaje de lignina que contienen (26.4% de lignina para el bagazo de caña).

Tabla 3.2. Remoción de lignina obtenida con las diferentes condiciones generadas por el diseño factorial 2^k con puntos centrales

Experimentos	Factores			Remoción de lignina (%)
	[H ₂ O ₂] (%)	Temperatura (°C)	Tamaño (mm)	
1	4.18	36.5	<2.525	38.81
2	4.18	36.5	<2.525	35.76
3	1	23	<1.7	0
4	7.36	50	<1.7	52.04
5	7.36	23	>3.35	47.64
6	7.36	23	<1.7	40.88
7	1	50	>3.35	16.48
8	4.18	36.5	<2.525	44.53
9	1	23	>3.35	13.13
10	1	50	<1.7	9.25
11	7.36	50	>3.35	67.28

Los resultados del diseño factorial 2^k se muestran en un diagrama de Pareto (Fig. 3.1), en el cual se indican las variables evaluadas. En base a este diagrama y al análisis de ANOVA (Anexo 4) se determinó que los tres factores analizados son significativos a un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), siendo la concentración de PH el factor que más afecta a la variable de respuesta debido a que posee una correlación de 0.910 y una contribución del 71.45% (Anexo 4) que comparada con la contribución por los otros dos factores (6.92% y 8.32%) es la que más influye en la variable de respuesta. Adicionalmente, como se muestra en el Anexo 4, las interacciones entre los factores no son significativas ($p > 0.05$), además, su contribución al modelo fue mínima (AB=0.41%, AC=2.18%, BC=1.00% y ABC=2.10%). El color naranja de las barras que representan a los tres factores en el diagrama de Pareto, indica que, a mayor valor de estos factores, mayor será la remoción de lignina.

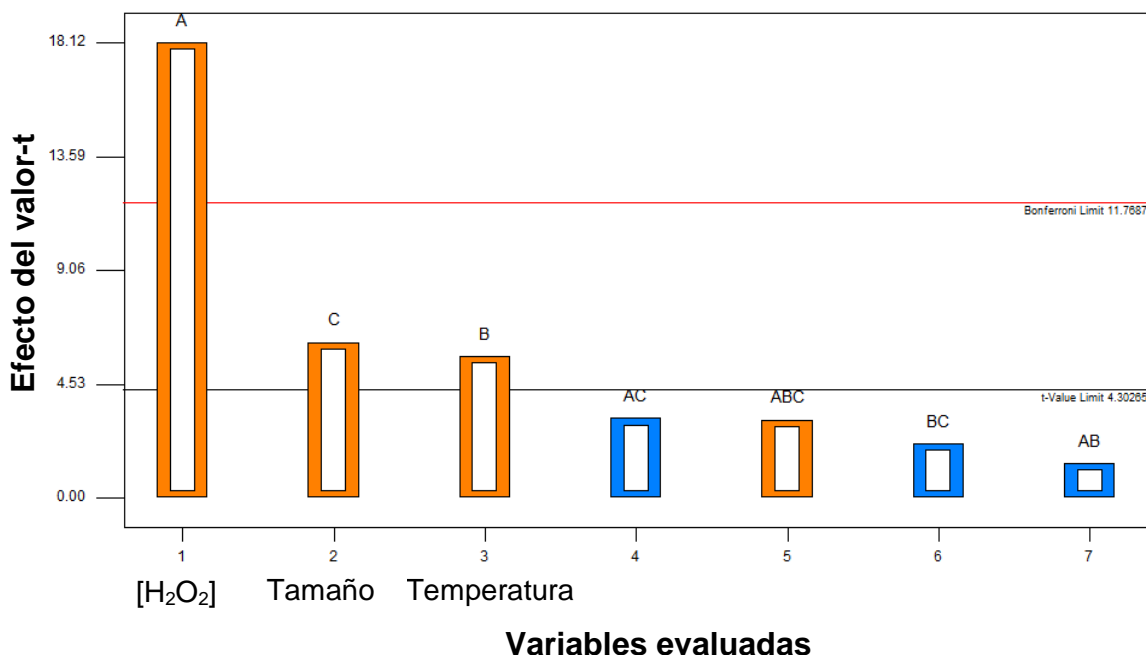


Figura 3.1. Diagrama de Pareto de los resultados obtenidos mediante el diseño factorial 2^k con puntos centrales. A: Concentración de PH, B: Temperatura y C: Tamaño de partícula

No obstante, a pesar de que el Diagrama de Pareto indica que, a mayor temperatura, mayor remoción de lignina (Fig. 3.1), la Figura 3.2 muestra que a temperaturas entre 23 °C y 50 °C los porcentajes de remoción de lignina no guardan correlación con la temperatura, lo que sugiere que no tiene un efecto tan importante como la concentración de PH. De hecho, en el Anexo 4, el cual corresponde al análisis ANOVA del modelo, se puede observar que la correlación del porcentaje de remoción con la temperatura es bajo (0.234) mientras que la correlación con la concentración de PH es alta (0.91). Sin embargo, Sun et al., (2000) realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de la temperatura (20 a 70 °C) en la remoción de lignina utilizando PHA como pretratamiento. Los resultados de dicho estudio mostraron que la tasa de deslignificación estaba influenciada por la temperatura. El aumento de la temperatura de 20 a 70 °C dio como resultado un modesto incremento en la lignina solubilizada de 7.8 a 13.0%. La razón de una tasa de deslignificación mayor a temperaturas altas fue que la formación de radicales libres a partir del PH depende fuertemente de la temperatura, lo que genera más radicales activos tales como radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (ver Ecuación 1.3), el cual participa en reacciones de degradación de lignina y polisacáridos. Por otra parte, Trabal (1974),

reportó que la velocidad de descomposición del PH a O₂ y H₂O (mostrada en la Ecuación 1.4) aumenta de manera exponencial con el incremento de la temperatura. El factor de incremento es de 2.2±0.1 por cada aumento de 10 °C. Sin embargo, la descomposición del PH disminuye la cantidad disponible para la remoción de lignina. Estas dos reacciones permiten explicar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de deslignificación.

Lo anterior indica que existe un equilibrio entre la descomposición del PH a O₂ y H₂O (Ecuación 1.4) y la formación de radicales activos (Ecuación 1.3 y 1.5), por lo que es necesario minimizar la descomposición del PH (Ecuación 1.4). Para ello, sería necesario la realización de un estudio cinético de la reacción de descomposición del PH a diversas temperaturas, que permita definir temperaturas de operación en las que la descomposición del peróxido (Ecuación 1.4) sea mínima. Por otra parte, Macorra-García et al., (2004) mencionan que a temperaturas inferiores a 70 °C, no predomina la descomposición de PH a O₂ y H₂O. Con base en lo anterior y considerando que el pretratamiento se llevó a cabo a pH 11.5, donde se ve favorecida la formación de los radicales hidroperóxidos e hidroxilos (Ecuación 1.3), se escogió la máxima temperatura ensayada (50°C) para los experimentos posteriores.

Por otra parte, el tamaño de partícula de la materia prima es un punto crucial en relación con la economía de la producción de metano. La necesidad de reducir el tamaño de partícula depende del tipo de biomasa y del pretratamiento aplicado, y los pretratamientos que no requieren reducción de tamaño de partículas deberían de ser beneficiosos para la economía del proceso (Rabelo et al., 2014). Se ha reportado previamente que a menores tamaños de partícula mayor porcentaje de deslignificación (0.17 mm-0.5mm) (Rabelo et al., 2011; Su et al., 2015; Banerjee et al., 2011). Sin embargo, en el presente trabajo, los resultados para la remoción de lignina obtenidos a partir del diseño experimental sugirieron lo contrario, ya que el diagrama de Pareto mostró que a mayor tamaño de partícula (>3.35mm), mayor deslignificación. Sin embargo, en el Anexo 4, se puede observar que la correlación del porcentaje de remoción con el tamaño de partícula es bajo (0.228). Además, la

Figura 3.3 muestra que para tamaños de partícula >3.35 mm y >1.7 mm, los porcentajes de remoción de lignina no presentan correlación con el tamaño de partícula. Debido a lo anterior, en los experimentos posteriores se decidió trabajar con un tamaño de partícula >3.35 mm.

Como se mencionó en la metodología, el objetivo de realizar un diseño experimental no consistió en optimizar el pretratamiento de PHA sino en determinar los parámetros más significativos que afectan la remoción de lignina. El modelo estadístico empleado (factorial 2^k con punto central) fue significativo, no mostró falta de ajuste y de la superficie de respuesta (Fig. 3.4) se puede observar que en el rango experimental estudiado presenta un comportamiento lineal. De dicha figura, se puede observar que los mayores porcentajes de remoción de lignina se obtuvieron para concentraciones altas de PH (7.36%) y que la influencia de la temperatura y el tamaño de partícula era débil, aunque se obtuvieron remociones de lignina ligeramente más altas para temperaturas altas (50°C) y tamaños grandes (>3.35mm).

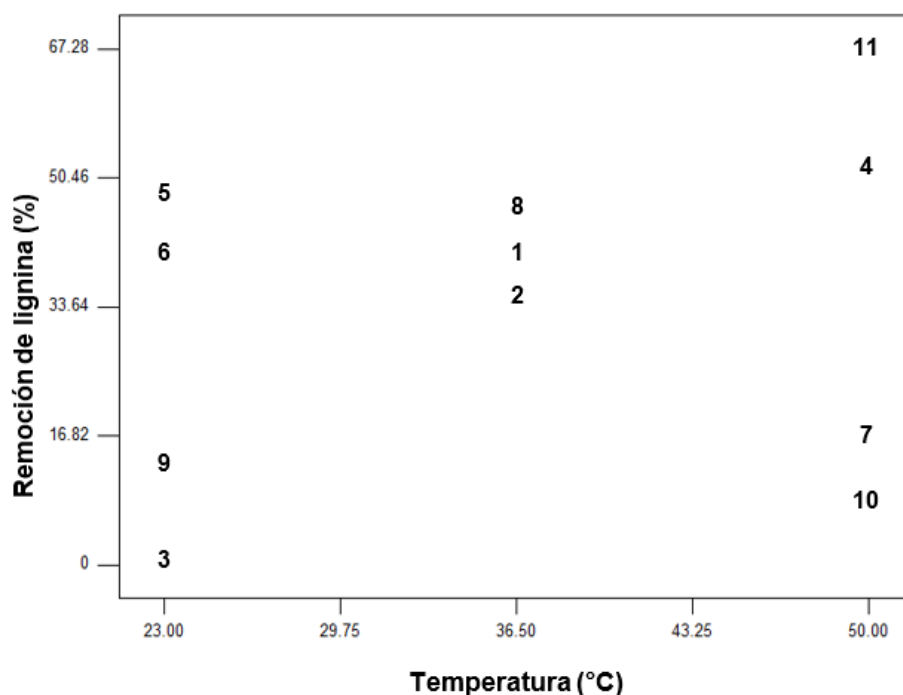


Figura 3.2. Efecto de la temperatura sobre la remoción de lignina. Los números en negrillas corresponden al número del experimento indicando en la Tabla 3.2

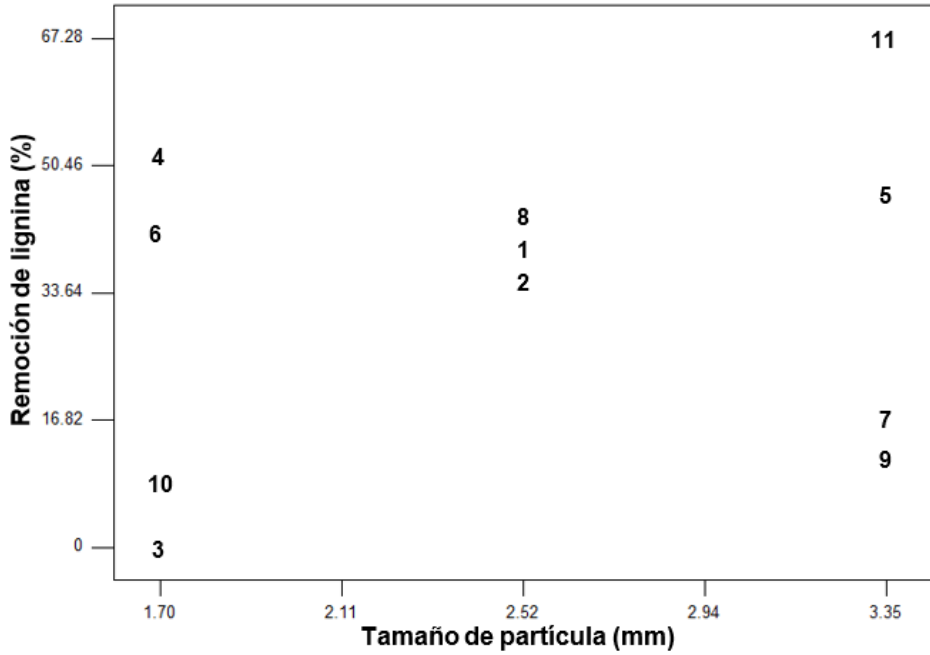
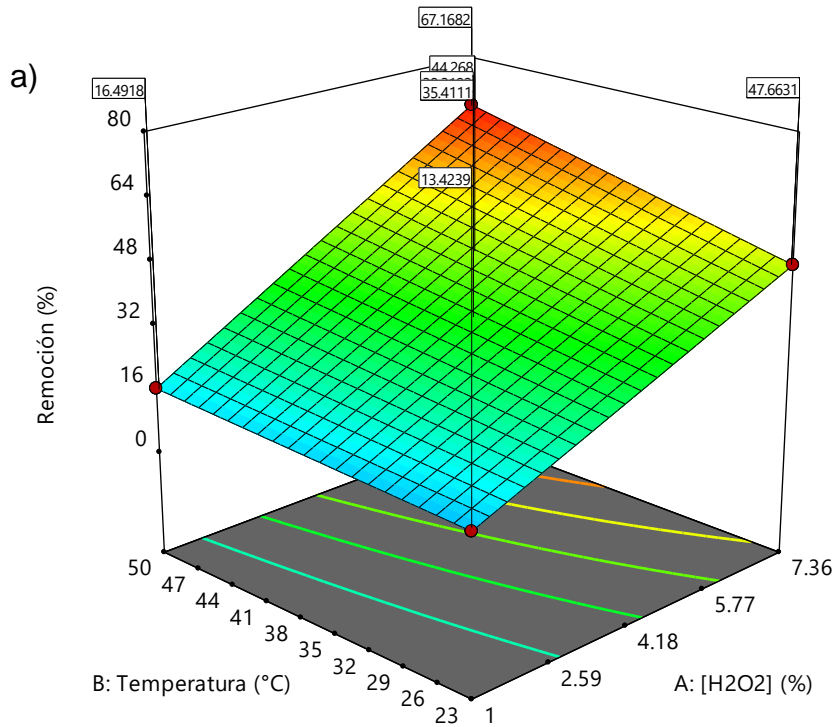


Figura 3.3. Efecto del tamaño de partícula sobre la remoción de lignina. Los números en negrillas corresponden al número de experimento indicando en la Tabla 3.2



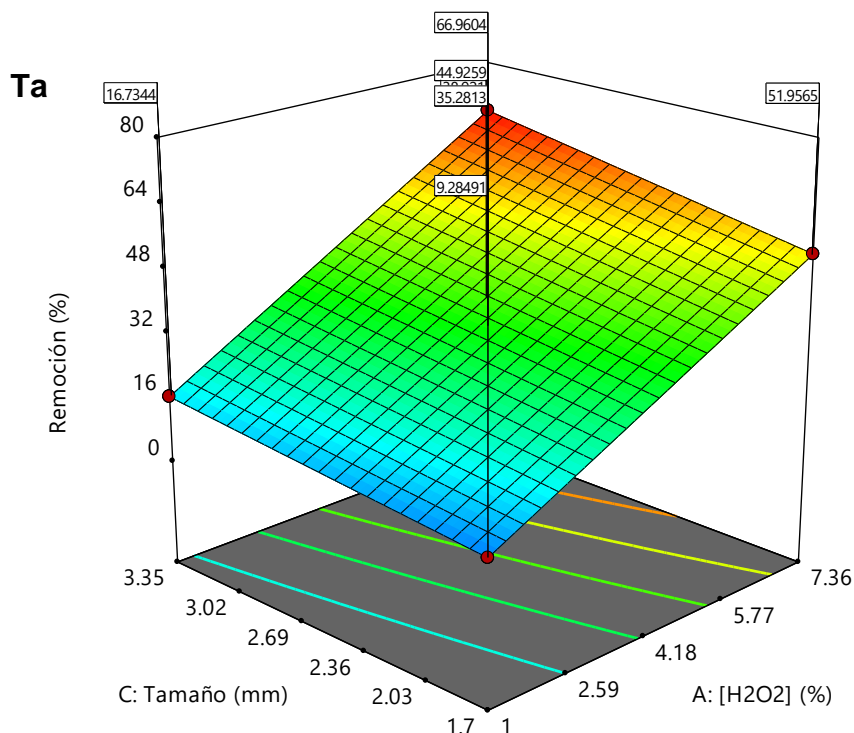


Figura 3.4. Modelos de superficie de respuesta de la remoción de lignina variando [H₂O₂], a) temperatura y b) tamaño de partícula

Por consiguiente, con base en lo discutido anteriormente, se determinó que la concentración de PH fue el factor que presentó una influencia mayor sobre el porcentaje de remoción de lignina. Para corroborar esto y como una primera aproximación, se decidió incrementar la remoción de lignina duplicando la concentración de PH (15% v/v), manteniendo las condiciones de temperatura y tamaño de partícula empleadas en el experimento 11.

Se determinó el porcentaje de remoción para esta nueva condición obteniendo un 81.46% de deslignificación. Este valor es más cercano al reportado por Rabelo et al., (2014) para el bagazo de caña, pero comparado con el pretratamiento de PHA al 7.36%, el porcentaje de remoción no aumentó considerablemente. Esto puede deberse a que en los procesos oxidativos se presenta un mecanismo por el cual la lignina después de haber sido atacada por los radicales hidroxilo e hidroperoxilo se puede condensar depositándose en la superficie de las fibras, afectando negativamente su remoción (Sección 1.3.2.1).

Por otra parte, la alta concentración de PH generó formación de espuma debida a la alta cantidad de oxígeno liberado por el peróxido, lo que ocasionó

desbordamiento de ésta y arrastre de fibra del matraz de reacción, ocasionando una pérdida de biomasa, de reactivo y a su vez, influyendo negativamente en el proceso de deslignificación. Por lo tanto, se decidió utilizar un antiespumante. El antiespumante, al ser un tensoactivo, ayudó a eliminar la espuma generada durante el experimento, pero no se logró aumentar apreciablemente el rendimiento de deslignificación, ya que solo se logró remover un 73% de lignina comparado con el 67.28% encontrado en el experimento 11 del diseño experimental. Además, se requirió una concentración de antiespumante de 0.002 mL de antiespumante/mLH₂O₂, la cual podrían interferir en los procesos posteriores de recuperación de la lignina. De acuerdo a los resultados presentados, una mejor opción sería reducir la descomposición de PH a oxígeno y agua con la finalidad de tener una mayor concentración efectiva de PH disponible para la formación de los radicales que se requieren para el proceso de deslignificación. Aunado a esto, hubiera sido importante determinar dos concentraciones de PH intermedias con la finalidad de corroborar si se presentaban los problemas de espuma y a su vez, determinar si en alguna de estas concentraciones se observaba un aumento en la deslignificación.

3.2. Pretratamientos organosolv, alcalino y secuenciales

Yuan et al., (2018) sugieren que un pretratamiento de PHA de un solo paso requiere una carga relativamente alta de PH, lo que probablemente se debe al consumo de H₂O₂ por compuestos aromáticos solubles en álcali. En este contexto, una etapa de preacondicionamiento podría reducir el consumo de PH y mejorar la deslignificación.

Con base en esto surgió la idea de implementar una etapa de preacondicionamiento con hidróxido de sodio, previo tanto al tratamiento con el PHA como al tratamiento organosolv, generando así dos pretratamientos secuenciales

Los porcentajes de remoción y de recuperación de lignina obtenidos con el pretratamiento con organosolv y con cada pretratamiento secuencial se muestran en la Tabla 3.3. Se puede observar que con el pretratamiento de organosolv se obtuvo la menor deslignificación, lo que puede deberse principalmente a que las condiciones utilizadas durante el proceso (ausencia de ácido y bajas temperaturas)

no fueron las más adecuadas, dado que en los trabajos reportados en la literatura (Tabla 1.2), los mayores porcentajes de remoción para el bagazo de agave se obtuvieron a temperaturas altas o en su defecto, utilizando un ácido como catalizador. Asimismo, Zhao et al., (2009) reportan que para que un pretratamiento de organosolv sea exitoso, debe llevarse a cabo a altas temperaturas (185-210 °C), sin la necesidad de agregar ácido, ya que se cree que los ácidos orgánicos liberados de la biomasa actúan como catalizadores para la ruptura del complejo lignina-carbohidrato. Sin embargo, cuando se añaden catalizadores ácidos, la velocidad de deslignificación aumenta y se obtienen mayores rendimientos de xilosa.

Los pretratamientos con los mayores porcentajes de remoción son el pretratamiento con PHA al 15% v/v y PHA al 7.36% v/v (Tabla 3.3) seguidos del pretratamiento NaOH+PHA6%. Sin embargo, en este último la etapa de preacondicionamiento con hidróxido de sodio por sí mismo es el responsable de la mayor remoción de lignina con un 58.81% y el pretratamiento subsecuente con PHA solo contribuyó con un 8.45% a la deslignificación. Cabe destacar que este pretratamiento secuencial ya había sido utilizado por Velazquez-Valadez et al., (2016) para el bagazo de agave, por lo que se intentó reproducir su método. La agitación es un parámetro que se tiene que considerar para que haya homogeneidad en el sistema, sin embargo, estos autores no la consideraron. La ausencia de agitación pudo haber disminuido la interacción entre el líquido y la biomasa, por lo que el porcentaje de deslignificación fue bajo. Asimismo, se evaluaron tres tiempos de incubación 1.5 h, 6 h y 24 h, para los cuales no hubo un incremento en la remoción de lignina, por lo que en la Tabla 3.3 solo se muestra el dato para el pretratamiento secuencial realizado a 1.5 h. Esta situación se repite para el pretratamiento secuencial hidróxido de sodio + organosolv (NaOH+Org), puesto que en la segunda etapa solo se logró incrementar un 1.25% la remoción de lignina. Además, como lo demuestra el balance de masa (Anexo 5c), el pretratamiento con hidróxido de sodio elimina un 71.35% de la celulosa contenida en la fibra de BSP. Esto tendría un efecto negativo en la sacarificación enzimática posterior, ya que disminuiría el contenido de los azúcares disponibles para la producción de metano.

Finalmente, aunque se logra remover la lignina del bagazo su recuperación para todos los pretratamientos evaluados fue muy baja (Tabla 3.3), lo que se debe principalmente al método utilizado para su recuperación: una precipitación en condiciones ácidas.

Al momento de llevar a cabo la precipitación de la lignina hay que tomar en cuenta el hecho de que ésta se encuentra dispersa en forma microcoloidal en la solución y su comportamiento es equivalente al de otros coloides. Esto es debido a la presencia de grupos fenólicos y diversos grupos ácidos de la lignina, que en la solución se encuentran desprotonados. Esto tiene como consecuencia que las moléculas de lignina estén bien dispersadas en forma microcoloidal, debido a la carga negativa de los grupos fenolato que provoca que las partículas de lignina se repelan. Cuando el pH de la solución se disminuye, se adicionan protones, los cuales disminuyen la solubilidad de la molécula de lignina debido a la neutralización de su carga negativa y las moléculas de lignina empiezan a precipitar (Hernández Yzarra 2007). Por consiguiente, la precipitación de la lignina depende del tipo de ácido o coagulante utilizado, del tipo de cationes presentes en el coagulante, de la concentración y cantidad adicionada de coagulante, así como de la temperatura de operación y la forma de la agitación, lo que puede generar distintos tipos de lignina con características y propiedades diferentes.

En lo que respecta a la lignina recuperada del licor obtenido por el PA ésta precipitó junto con Na_2SO_4 , por lo que no se pudo determinar su porcentaje de recuperación. Esto también es atribuido al método de precipitación ácida tradicional en un solo paso, debido a que las ligninas alcalinas, aisladas por este método, contienen altas cantidades de materiales diferentes a la lignina. Polisacáridos, proteínas, cenizas y hemicelulosas son los materiales predominantes (Sun et al., 1997). Esto se puede comprobar por el balance de masa (Anexo 5c), el análisis de ICP-OES y el análisis de TGA que se muestran más adelante en donde la lignina alcalina tiene un 66% de cenizas. Adicionalmente, se han reportado estudios donde se aisló lignina alcalina con NaOH 1 M a 35 °C de paja de trigo con una purificación posterior mediante extracción líquido-líquido y a pesar de eso, la lignina alcalina

todavía contenía 18.2% de polisacáridos (Scalbert et al., 1987); por ello, lo más recomendable es realizar una precipitación en dos pasos, donde primeramente se recuperen los polisacáridos extraídos durante el PA como pueden ser hemicelulosa y complejos lignina-hemicelulosa mediante la adición de etanol y posteriormente, por medio de una disminución de pH (1.5) se logre precipitar una lignina libre de polisacáridos. Además, al utilizar ácido sulfúrico como agente precipitante se propicia a la formación de sulfato de sodio (Prado et al., 2013), el cual es un agente contaminante en la lignina que dificulta su comercialización.

Tabla 3.3. Porcentajes de remoción y recuperación de lignina de los diferentes pretratamientos empleados con el bagazo de agave

Muestra	Remoción	Recuperación
BagPHA 7.36%	67.28%	8.61%
BagPHA 15%	81.46%	*
BagOrg	8.35%	11.57%
BagNaOH+Org	60.06%	4.97%
BagNaOH+PHA6%	67.26%	3.45%
BagNaOH	58.81%	-

*Debido a los problemas experimentales no se realizaron duplicados para la precipitación de la lignina, por lo que no se tiene un dato confiable.

- Durante la precipitación de la lignina por el PA se generaron sales (Na_2SO_4), por lo que el precipitado estaba contaminado con Na_2SO_4 . Esto impidió determinar la cantidad de lignina precipitada.

Con base en lo anteriormente discutido, el pretratamiento que es más prometedor sería el PHA al 7.36% debido a que obtuvo la remoción de lignina más alta, no generó problemas experimentales durante su evaluación y, además, la cantidad de azúcares removidos en comparación con el PA es mínima, por lo que no tiene un efecto negativo en el proceso de hidrólisis enzimática. No obstante, es necesario mejorar las condiciones de precipitación de la lignina con la finalidad de aumentar el porcentaje de recuperación.

3.3. Caracterización de las fibras de bagazo de agave antes y después de los pretratamientos

3.3.1. XRD

El índice de cristalinidad de BSP, BCP y estándar de celulosa (Avicel) se muestran en la Tabla 3.4.

La fibra de bagazo pretratado con PHA al 15% (BagPHA15%) y al 7.36% (BagPHA7.36%) fueron las fibras que presentaron un menor índice de cristalinidad, incluso menor que el IC del BSP. Esto puede deberse a que el pretratamiento de PHA, aunque removió las fracciones amorfas de hemicelulosa y lignina (Anexo 5a), lo cual incrementaría el IC, también facilitó la ruptura de la estructura de la celulosa cristalina provocando una disminución neta del IC. Esto último ha sido sugerido por Shen et al., (2011), Banerjee et al., (2011) y Kerley et al., (1988) quienes encontraron que el pretratamiento de PHA reduce la cristalinidad de la celulosa haciéndola más susceptible a la hidrólisis enzimática. Esta disminución de la cristalinidad se podría ver reflejada en una mayor producción de AT para BagPHA15% y BagPHA7.36% comparado con BSP como así lo indica la hidrólisis enzimática que se discute posteriormente.

Lo anterior contradice a lo reportado por algunos autores como Su et al. (2015), quienes trabajaron con la mazorca de maíz utilizando PHA al 2% v/v como pretratamiento y encontraron que la mazorca de maíz pretratada incrementó un 7% su IC, ya que el PHA removió las fracciones amorfas de hemicelulosa y lignina produciendo un incremento en el IC de las biomásas pretratadas. Esta diferencia puede atribuirse a que la concentración de PH es muy baja, lo que genera una concentración pequeña de radicales hidroxilo e hidroperoxilo comparado con los pretratamientos de PHA al 7.36% y 15%, por lo que estos radicales solo logran atacar a las fracciones amorfas (lignina y hemicelulosa) presentes en la fibra, aumentado así, el IC.

En lo que respecta a la fibra de bagazo de agave pretratada con hidróxido de sodio al 6% (BagNaOH) ésta tuvo un IC sumamente alto comparado con BSP y el

estándar de celulosa cristalina Avicel (Tabla 3.4). Esto probablemente se debe a que el PA hidrolizó los enlaces glucosídicos de la región amorfa de la fibra de celulosa, como fue descrito por Shahabazuddin et al., (2018). Esto puede inferirse del balance de masa (Anexo 5c), donde se aprecia que el PA tuvo un fuerte efecto sobre la celulosa amorfa, ya que solubilizó un 71.35% de la celulosa amorfa contenida en BSP. Asimismo, Shahabazuddin et al., (2018) observaron el mismo efecto para la paja de arroz, la cual contenía un IC de 64.5% antes del pretratamiento mientras que la paja de arroz con PA presentó un IC de 72.1%.

Por otra parte, la fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio+PHA al 6% (BagNaOH+PHA6%) presenta un IC mayor que BagPHA7.36% y BagPHA15% pero a su vez, su IC es menor que el de BagNaOH. Esto puede deberse a que el pretratamiento con NaOH es el predominante en el pretratamiento secuencial, de modo que, al someter a la biomasa a un PA la región amorfa de la celulosa es removida, generando un incremento en el IC. Sin embargo, al momento de emplear el PHA como pretratamiento en una fibra previamente pretratada con NaOH, el IC disminuye debido a que el PA removió las fracciones amorfas y dejó expuesta la estructura cristalina de la celulosa que puede fragmentarse con mayor facilidad por los radicales generados a partir del PH.

Tabla 3.4. Porcentajes del índice de cristalinidad de las fibras de bagazo con y sin pretratamiento y del estándar de celulosa (Avicel)

Muestra	IC (%)
Avicel	61.93
BSP	56.00
BagOrg	57.68
BagNaOH	70.08
BagNaOH+Org	57.93
BagPHA7.36%	50.49
BagPHA15%	50.32
BagNaOH+PHA6%	59.59

Por otra parte, en la Figura 3.5 se muestran los difractogramas de BSP, BCP y estándar de celulosa (Avicel). Los picos de celulosa microcristalina se encuentran

a valores de 2θ de 15° , 16.5° , 22.8° y 34.6° . Cheng et al., (2011) reporta que el pico de 22.8° indica la distancia entre las cadenas paralelas de celulosa, mientras que el pico pequeño a 34.2° corresponde a un cuarto de la longitud de una unidad de celobiosa. Para el caso de la BagPHA7.35%, BagPHA15% y BagNaOH+PHA6% la señal cristalina a 34.5° desaparece comparada con BSP y el estándar, mientras que el pico principal (22.8°) disminuye en intensidad volviéndose más anchos. Además, la señal cristalina a 16° redujo su intensidad y se convirtió en un pico de hombro débil. Estos efectos, son consistentes con una distorsión severa de la celulosa tipo I y que da como resultado una disminución del IC (Perez-Pimienta et al., 2016).

Adicionalmente, se ha reportado que además de las señales de celulosa, existen señales bien definidas a $2\theta = 15^\circ$, 24.5° , 30.5° y 38° que corresponden a los oxalatos de calcio presentes en el bagazo de agave (Perez-Pimienta et al., 2016), los cuales pudieron observarse en las micrografías obtenidas mediante los análisis de SEM y de espectroscopía de dispersión de energía (EDS) (Anexo 6) que se presentan más adelante.

Finalmente, determinar el IC para las fibras de bagazo con y sin pretratamientos es de suma importancia, ya que bajo el concepto de biorrefinería la celulosa microcristalina ha ganado recientemente más interés debido a que se puede obtener a partir de materiales renovables, su no toxicidad, su valor económico, su mejor biodegradabilidad, sus elevadas propiedades mecánicas, su gran área superficial y su biocompatibilidad. Actualmente se están desarrollando nuevas fuentes, nuevos procesos de aislamiento y nuevos tratamientos para satisfacer la creciente demanda de producir nuevos tipos de materiales basados en celulosa microcristalina a escala industrial (Trache et al., 2016).

Hasta el momento solo se han publicado tres trabajos sobre el aislamiento de celulosa microcristalina de agave; dos de ellos consideran las hojas de agave directamente (Ponce et al., 2013, Rosli et al., 2013) mientras que uno se enfoca al bagazo de agave (Espino et al. 2014). Los resultados mostrados en el presente trabajo indican que un PA con NaOH en el bagazo de agave podría ser un método viable para obtener celulosa microcristalina.

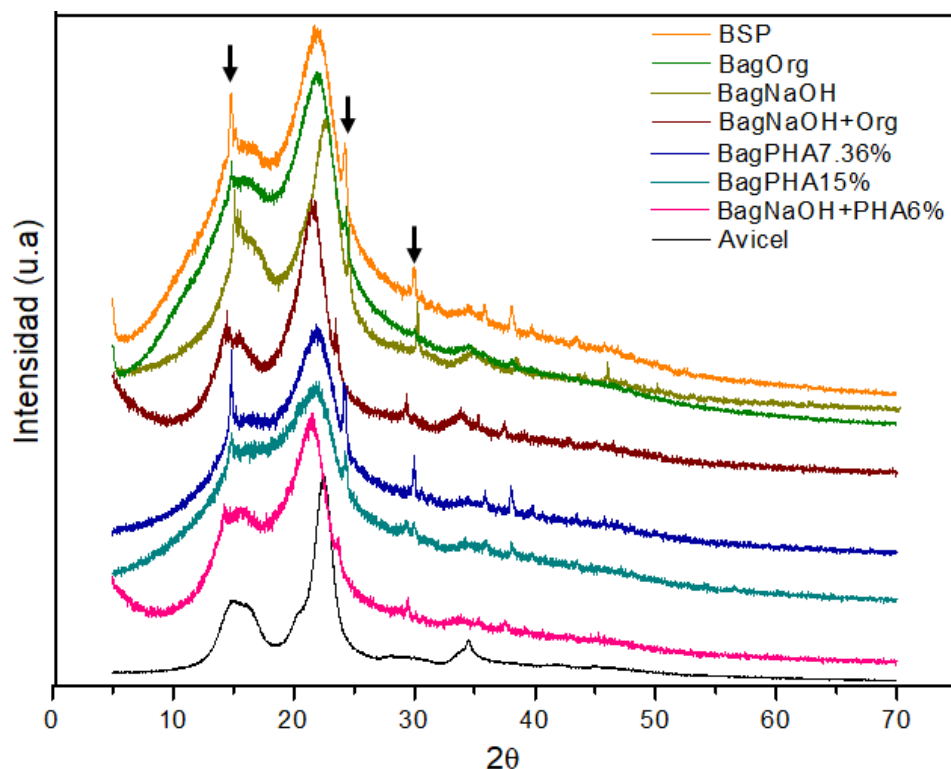


Figura 3.5 Difractogramas obtenidos para el BSP, BCP y estándar de celulosa (Avicel). Las flechas indican las señales de oxalato de calcio

3.3.2. ATR-FTIR

En la Figura 3.6 se muestran los espectros obtenidos para el estándar de celulosa (Avicel), BSP y BCP. En la Tabla 3.5 se resumen las bandas principales identificadas tanto para el estándar como para las fibras de bagazo. La señal presente a 1734 cm^{-1} corresponde a grupos carbonilo proveniente de grupos éster de complejos de hemicelulosa o hemicelulosa-lignina (Su et al. 2015). La desaparición de esta señal en las muestras BagNaOH, fibra de bagazo obtenida del PA con NaOH y organosolv (BagNaOH+Org), BagPHA7.36%, BagPHA15% y BagNaOH+PHA6% es debido a la deslignificación y a la disolución parcial de la hemicelulosa durante los pretratamientos (Yuan et al. 2018). Por consiguiente, esta señal es asignada a las fracciones de hemicelulosa y lignina. El estiramiento de grupos carbonilo conjugados con anillos aromáticos presentes en la lignina, según la literatura, se encuentran en la banda de 1605 cm^{-1} (Tejado et al., 2007). Esta señal disminuye para BagNaOH, BagNaOH+Org y BagPHA15% debido a la

deslignificación de ambos pretratamientos. Con la muestra BagNaOH+PHA6% ocurre todo lo contrario, la señal se intensifica, esto puede deberse a que el pretratamiento dejó expuesta a la lignina, pero no logró solubilizarla por completo como se observa en las micrografías de SEM que se discuten más adelante. La banda a 1427 cm^{-1} se atribuye a una disminución progresiva de la región amorfa de la celulosa (Owolabi et al., 2017), debido a que el PA remueve celulosa amorfa, esta señal desaparece para BagNaOH y BagNaOH+Org. Además, la banda que se encuentra a 1027 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-O de la celulosa y hemicelulosa (Su et al. 2015). Esta señal está presente en todas las muestras, pero para BagNaOH y BagNaOH+Org es menos intensa debido a que el PA además de remover hemicelulosa también removi6 gran parte de la celulosa contenida en el bagazo de agave (Anexo 5c). La señal a 1227 cm^{-1} hace referencia a enlaces C-O que corresponden a las unidades de guayacil presentes en la lignina (Fernández-Rodríguez et al. 2017). Esta señal disminuy6 para las fibras de bagazos de agave pretratados debido a la deslignificación generada por los pretratamientos.

Por otro lado, la banda de absorbanca a 3341 cm^{-1} corresponde a grupos OH, hidroxilo o fenoles (Su et al. 2015), presentes en la celulosa y lignina, principalmente; por ello este grupo funcional se encuentra en todas las muestras. Finalmente, la seña a 2920 cm^{-1} corresponde al estiramiento de C-H en grupos metil o metileno (Fernández-Rodríguez et al., 2017; Owolabi et al., 2017). Tal y como se muestra en la Tabla 3.5 estos grupos pueden ser atribuidos a la celulosa o lignina presentes en las muestras de BSP, fibras bagazo de agave a diferentes pretratamientos y en el estándar de celulosa.

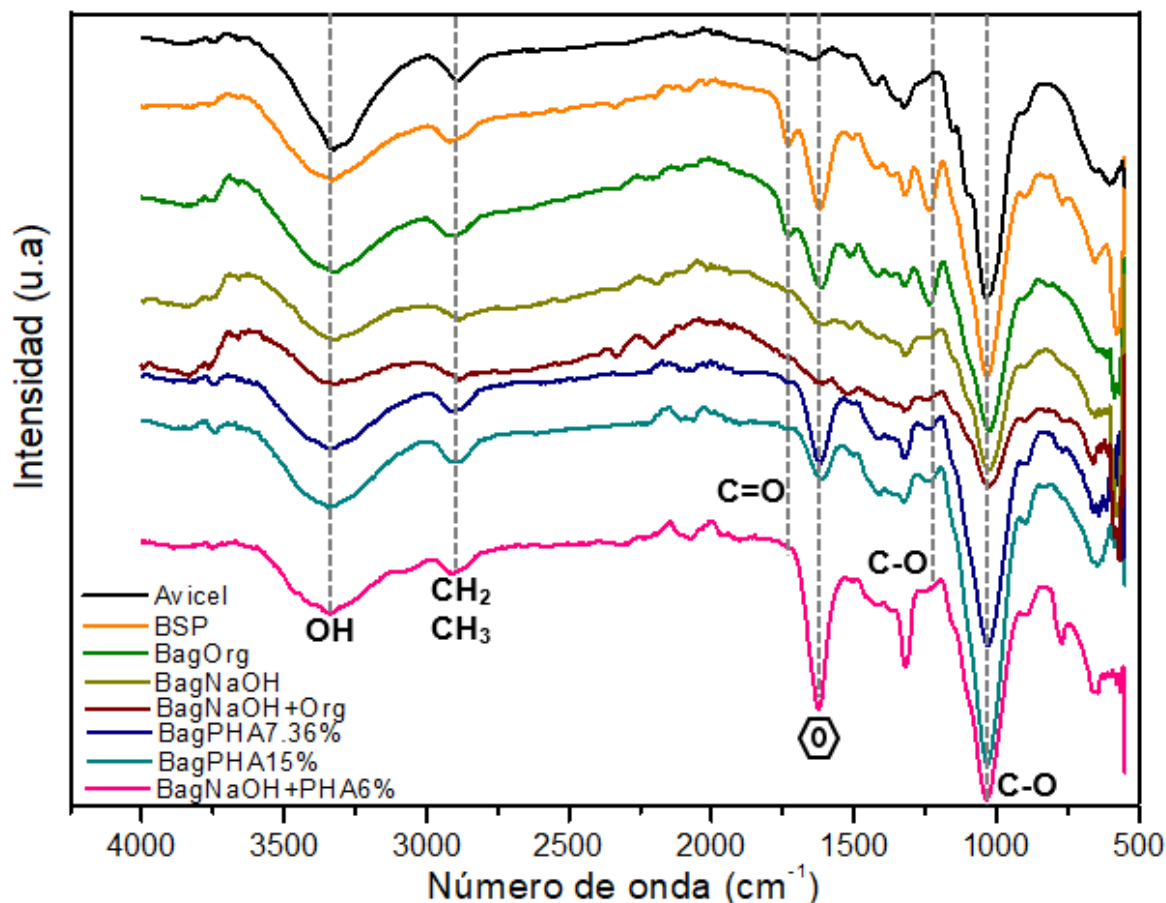


Figura 3.6. Espectros ATR-FTIR para el estándar de celulosa (Avicel), y fibras de bagazo de agave con y sin pretratamiento

Tabla 3.5. Bandas características de los espectros de FT-IR del estándar de celulosa (Avicel), BSP y BCP pretratamientos mostrados en la Figura 3.6

Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Posible fuente
3341	Estiramiento de OH	Celulosa, lignina
2920, 2890	Estiramiento de CH en CH ₂ y CH ₃	Celulosa, hemicelulosa, lignina
1745	Estiramiento C=O	Lignina
1734	Estiramiento de grupos éster	Hemicelulosa, hemicelulosa-lignina
1640	Absorción de agua	Celulosa, hemicelulosa
1622		Oxalatos de calcio
1605	Vibración del anillo aromático	Lignina
1510	Vibración del anillo aromático	Lignina
1426		Celulosa amorfa
1227	Estiramiento C-O	Lignina (Guayacil)
1027	Estiramiento C-O	Celulosa, hemicelulosa
897	Deformación de C-H	Celulosa
834	Flexión de C-H fuera del plano	Lignina (Siringilo)

3.3.3. Caracterización morfológica (SEM)

El análisis de SEM se utilizó con la finalidad de evaluar los cambios morfológicos generados en las fibras de bagazo de agave obtenidas por diferentes pretratamientos. Las micrografías obtenidas se muestran en la Figura 3.7 donde se observa que el PA, PHA (7.36% y 15%) y pretratamientos secuenciales generaron un mayor daño estructural en la fibra comparados con BSP (Fig. 3.7a) y con el proceso de organosolv, porque destruyeron los tejidos esclerenquimático y parenquimático de la pared celular.

El esclerénquima es un tejido de sostén formado por células no vivas con pared secundaria lignificada; su principal función es de índole mecánica (Esaú, 1985). Por ello, en las Figuras 3.7c-3.7g se observa que BagNaOH, BagNaOH+Org, BagPHA7.36%, BagPHA15% y BagNaOH+PHA6% carecen de este tejido debido a que presentaron una alta remoción de lignina (Tabla 3.3). Cabe resaltar que ningún pretratamiento logró solubilizar la lignina en su totalidad, por lo que en las micrografías se aprecia como la lignina que cubría los haces vasculares queda expuesta. Esta observación también se puede corroborar en el análisis de ATR-FTIR de la sección 3.3.2, donde la banda a 1605 cm^{-1} , característica del anillo aromático de la lignina se intensifica para algunas muestras a pesar de la alta remoción de este compuesto.

El parénquima es un tejido fundamental constituido por células vivas con pared primaria, rica en hemicelulosa y sustancias pécticas y solubles (Esaú, 1985). Los pretratamientos alcalino y PHA, además de remover lignina, también remueven hemicelulosa (Su et al., 2015 & Yuan et al., 2018), por lo tanto, las fibras pretratadas con alguno de estos pretratamientos carecen o en su defecto presentan un adelgazamiento de este tejido (Fig. 3.7c-3.7g).

La destrucción del esclerénquima y parénquima se vio reflejado en los análisis de XRD. La lignina y la hemicelulosa son polímeros amorfos, por lo que su remoción genera un incremento en el IC. Esto es congruente para BagNaOH, BagNaOH+Org y BagNaOH+PHA6% (Tabla 3.4) debido a que tuvieron un incremento en el IC por la remoción de estos polímeros. Sin embargo, para

BagPHA7.36% y BagPHA15% (Tabla 3.4) ocurrió el caso contrario, debido a que la alta concentración de PH, además de remover los tejidos esclerenquimático y parenquimático (Fig. 3.7e, Fig. 3.7f), facilitó la ruptura de la estructura de la celulosa cristalina provocando una disminución neta del IC.

Finalmente, el pretratamiento de PHA y el secuencial NaOH+PHA6% destruyeron los oxalatos de calcio presentes en las fibras de bagazo de agave. Esto se demostró mediante un análisis químico por espectroscopia de dispersión de energía (EDS) (Anexo 6), el análisis de XRD, donde los picos característicos para los oxalatos de calcio disminuyeron para las fibras de bagazo de agave obtenidas mediante estos pretratamientos y el análisis de ATR-FTIR, donde la banda a 1622 cm^{-1} es característica de estas sales y presenta una menor intensidad para BagNaOH, BagPHA7.36%, BagPHA15% y BagNaOH+PHA6%.

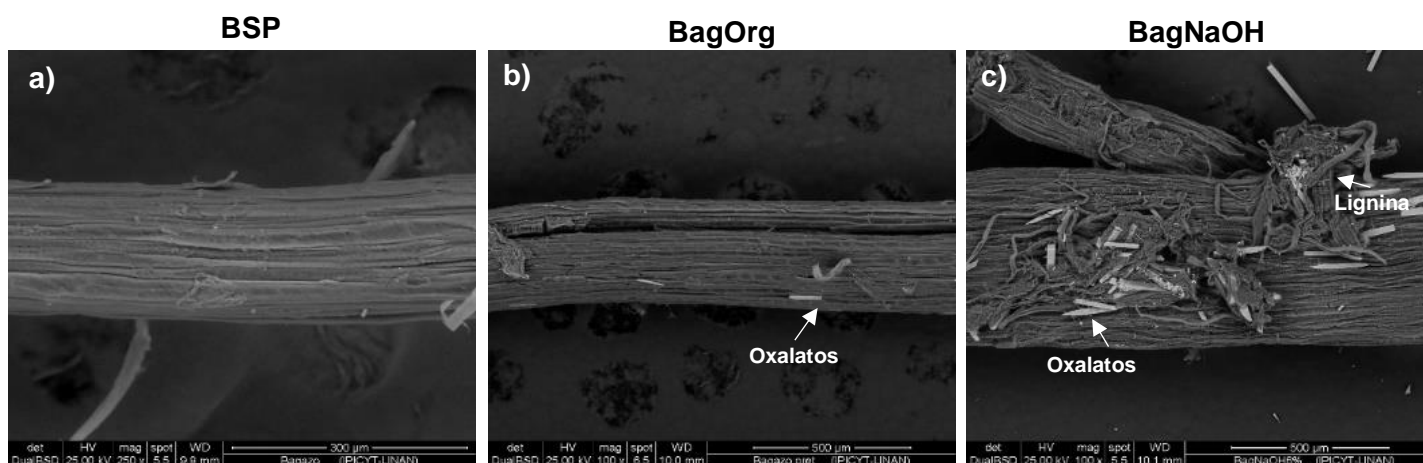


Figura 3.7. Micrografías de SEM que muestran el efecto de los pretratamientos en el bagazo. a) fibra de bagazo de agave sin pretratar (BSP), b) fibra de bagazo pretratada con organosolv (BagOrg), c) fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio al 6% (BagNaOH)

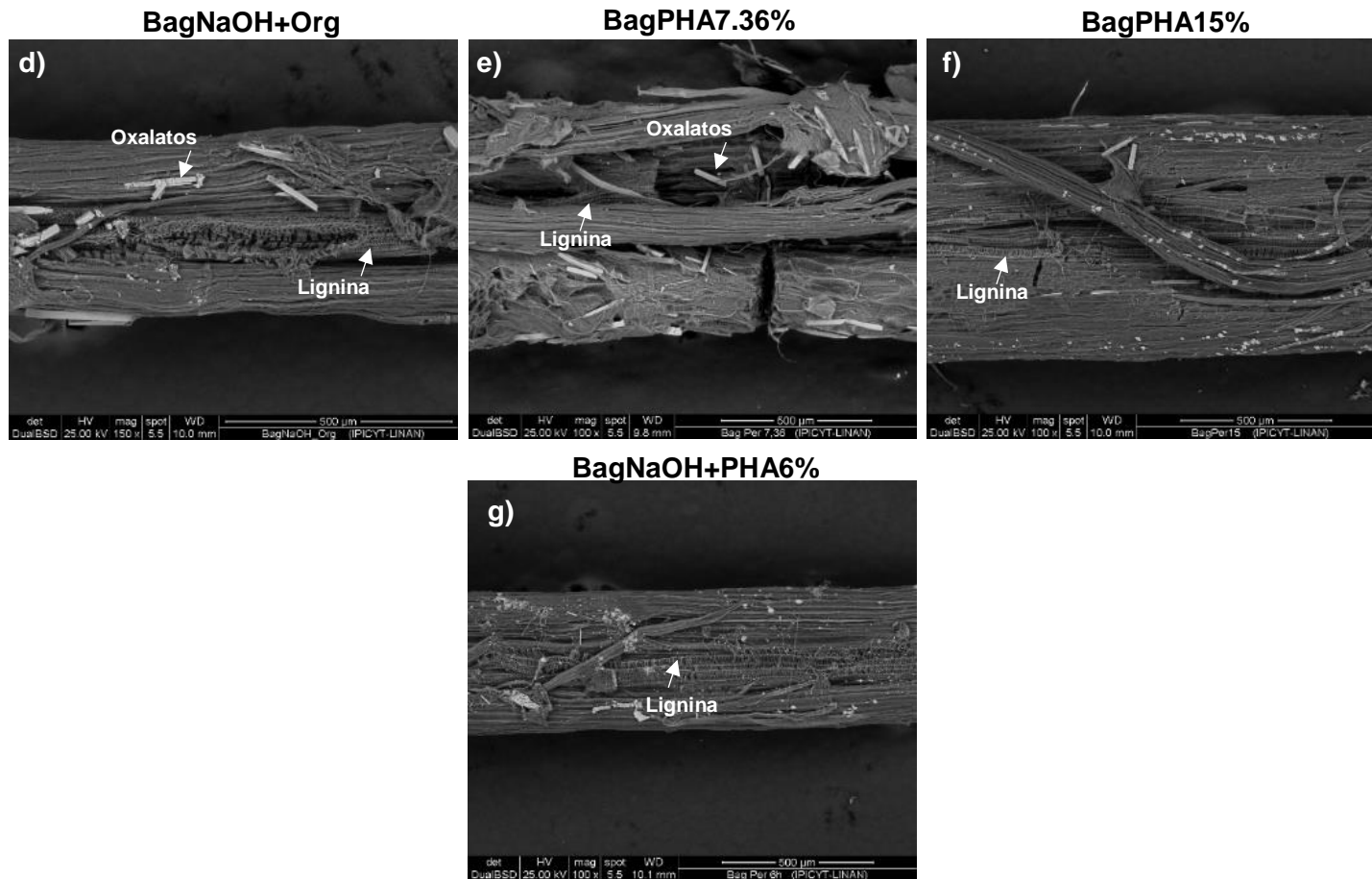


Figura 3.7 (cont.) d) fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio y organosolv (BagNaOH+Org), e) fibra de bagazo pretratada con PHA al 7.36%(BagPHA7.36%), f) fibra de bagazo pretratada con PHA al 15% (BagPHA15%), g) fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio y PH al 6% (BagNaOHA+PHA6%)

3.4. Caracterización de las ligninas de bagazo de agave

3.4.1. ATR-FTIR

La Figura 3.8. muestra los espectros obtenidos mediante el análisis de ATR-FTIR para el estándar de lignina y para las ligninas de bagazo de agave obtenidas por diferentes pretratamientos y la asignación de las bandas se muestra en la Tabla 3.6.

La banda presente a 3377 cm^{-1} hace referencia a grupos hidroxilo o fenoles que se encuentran en la celulosa y en la lignina (Su et al. 2015). Para las ligninas extraídas del bagazo de agave con los diferentes pretratamientos, se observan bandas a 2924 cm^{-1} y a 2886 cm^{-1} relacionadas con el estiramiento C-H en grupos metil y metileno de la lignina (Tejado et al., 2007 & Fernández-Rodríguez et al.,

2017). La banda que se observa en el rango de 1705-1727 cm^{-1} , corresponde al estiramiento de los grupos cetona y carboxilo no conjugado, perteneciente al enlace éster de los ácidos fenólicos en la lignina, generados durante la ruptura del complejo lignina-hemicelulosa (Wang et al., 2013; Sun et al., 2000). Para la lignina obtenida del bagazo pretratado con hidróxido de sodio + PHA al 6% (LigNaOH+PHA6%) y para la lignina obtenida del bagazo pretratado con PHA (LigPHA) esta señal es más intensa, lo que nos indica que estas ligninas se encuentran oxidadas en comparación con las demás ligninas debido a la introducción de grupos cetona y carboxilo durante el proceso oxidativo. Esta señal también se observa en la lignina obtenida del bagazo pretratado con organosolv (LigOrg) debido a que el proceso de organosolv tiende a liberar el ácido acético de la hemicelulosa que es uno de los agentes químicos que conduce a la disolución de la lignina (Tejado et al., 2007). Las señales a 1605 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} y 1425 cm^{-1} son atribuidas a las vibraciones del esqueleto aromático presente en todas las ligninas. Las intensidades de estas bandas son similares, lo que sugiere que ninguno de los pretratamientos afectó la estructura general de la lignina (Sun et al., 2000). A 1459 cm^{-1} se aprecia una señal correspondiente a la deformación asimétrica del enlace C-H en grupos metil o metilenos (Tejado et al., 2007). En el caso del proceso de organosolv, la escisión de los enlaces β -aril éter mediante la liberación del ácido acético de la hemicelulosa provoca la pérdida de los grupos terminales metil y metileno que se encuentran en la cadena lateral de la lignina (Pan et al., 2006). Es por lo que, para LigOrg y para la lignina obtenida del bagazo pretratado con NaOH + organosolv (LigNaOH+Org) la intensidad de esta señal es menor comparada con LigPHA y LigNaOH+PHA6%, debido a que el proceso de organosolv tiene la finalidad de extraer una lignina nativa (Zhao et al., 2009), mientras que el PHA lleva a cabo una escisión oxidativa de los enlaces presentes entre las unidades de lignina (Ma et al., 2017).

La intensidad de la banda de adsorción a 1220 cm^{-1} que pertenece a la deformación del grupo carbonilo (C=O) en los espectros de LigPHA y LigNaOH+PHA6% fue mayor en comparación a las otras ligninas y esto indica un incremento en el grupo carboxilo (-COOH) después de la oxidación (He et al., 2017).

Por otro lado, la banda a 1031 cm^{-1} para LigOrg es intensa. Esto quizás es debido a la escisión solvolítica de los enlaces β -éter que da como resultado el alcohol correspondiente en la cadena lateral alifática del anillo aromático (Rossberg et al. 2015), mientras que para LigPHA y LigNaOH+PHA6% esta banda es más pequeña debido a la degradación de los grupos hidroxilo durante la reacción de oxidación. Finalmente, para la lignina obtenida del bagazo pretratado con hidróxido de sodio al 6% (LigNaOH6%) solo predomina una banda con vibración muy intensa a 1100 cm^{-1} . De acuerdo con Prado et al., (2013), esta señal corresponde a sulfato de sodio (Na_2SO_4), compuesto formado durante la precipitación de la lignina alcalina con ácido sulfúrico. Como se discutió en la sección 3.2, la cantidad formada de Na_2SO_4 fue muy alta, por consiguiente, esta impureza no permitió que en el análisis de ATR-FTIR se pudiera observar la vibración de los grupos funcionales correspondientes a la lignina alcalina.

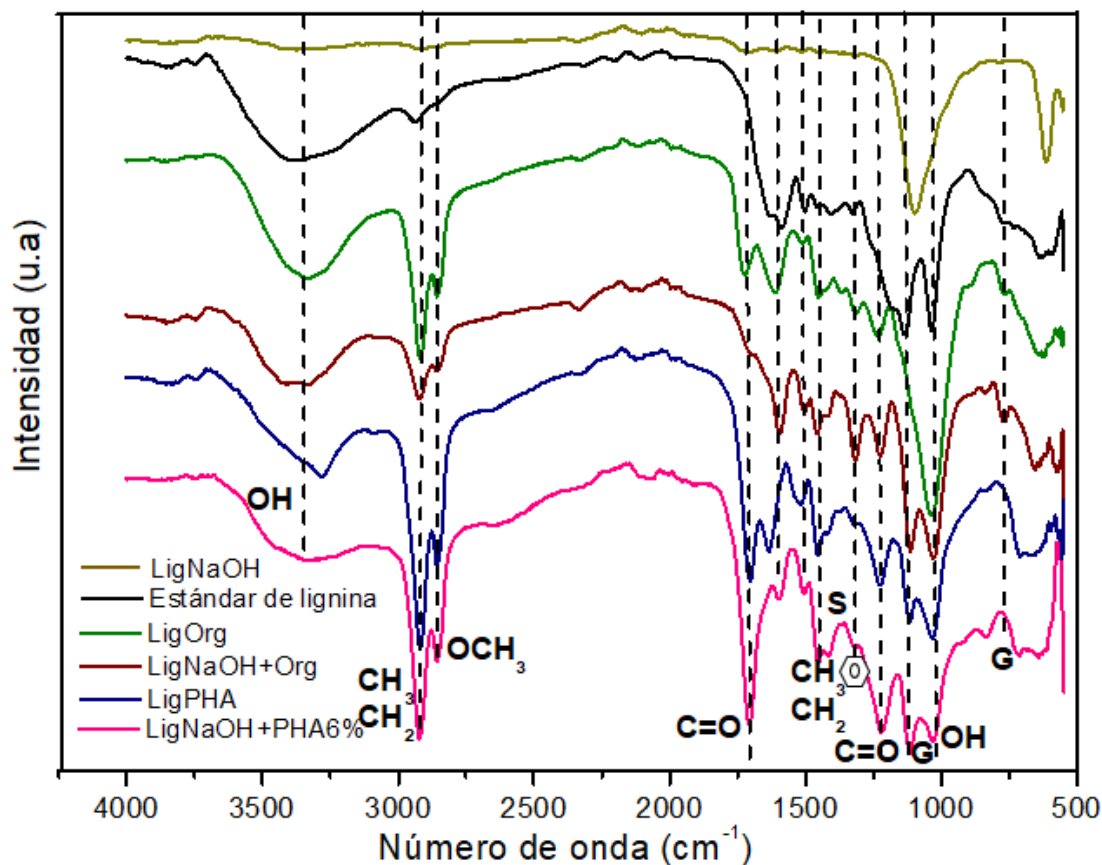


Figura 3.8. Espectros obtenidos mediante el análisis de ATR-FTIR para el estándar de lignina y ligninas de bagazo de agave obtenidas por diferentes pretratamientos

Tabla 3.6. Bandas características de los espectros de FT-IR del estándar de lignina y ligninas de bagazo de agave obtenidas por diferentes pretratamientos

Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibración	Posible fuente
3360	Estiramiento O-H	OH fenólicos + OH alifáticos
2934, 2856	Estiramiento C-H	CH ₃ +CH ₂ +OCH ₃
1727	Estiramiento C=O	Grupos C=O no conjugados
1650	Estiramiento C=O	Grupos C=O conjugados
1605	Estiramiento C-C	Esqueleto aromático
1506	Estiramiento C-C	Esqueleto aromático
1459	Deformación en plano C-H	CH ₃ +CH ₂
1425	Estiramiento C-C	Esqueleto aromático
1312	Estiramiento C-O	Siringilo
1270	Estiramiento C-O	Guayacilo
1220	Estiramiento C-O	OH fenólico+éter
1125	Deformación en plano C-H	Guayacilo
1113	Deformación en plano C-H	Siringilo
1031	Estiramiento C-O	OH alifático de 1er orden
834	Deformación fuera del plano C-H	Guayacilo
825	Deformación fuera del plano C-H	Siringilo
810	Deformación fuera del plano C-H	Guayacilo

Los datos mostrados en esta sección indican que el método de deslignificación utilizado para el aislamiento de la lignina juega un papel importante en las características químicas y la estructura final de las ligninas removidas.

3.4.2. Análisis de espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

En la Tabla 3.7 se muestran los metales encontrados en las ligninas mediante el análisis de ICP-OES. La mayoría de estos metales también se encuentran en el bagazo de agave (Tabla 3.7) (materia prima de donde se extrajo la lignina) y en los reactivos utilizados durante los pretratamientos (NaOH, HCl y H₂SO₄). Sin embargo, los metales como aluminio, cobre y zinc no se encuentran en el bagazo de agave, pero sí en las muestras de lignina. Esto es porque aparecen como impurezas en los reactivos utilizados durante los pretratamientos, por lo que la introducción de estos metales en las ligninas es ocasionada por los reactivos.

En lo que respecta a las ligninas, se ha reportado que éstas poseen una gran capacidad de adsorción de metales debida a los fenoles y otros grupos funcionales presentes en su superficie, lo que aumentan el carácter ácido de la lignina en solución acuosa (Gomez-Rengifo et al., 2013). Los pretratamientos utilizados tienden a romper los enlaces éster que se encuentran entre la lignina y la hemicelulosa y los enlaces éter entre las ligninas, generando su fraccionamiento y dejando expuestos a una variedad de grupos funcionales como se observó en el análisis de ATR-FTIR. Estos grupos funcionales son los que le dan a la lignina una carga negativa y a su vez, son los responsables de la atracción de los iones metálicos.

Tabla 3.7. Elementos determinados por ICP-OES presentes en el bagazo de agave y en las ligninas obtenidas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos

Muestra	LigNaOH	LigOrg	LigNaOH+Org	LigPHA	LigNaOH+PHA6%	Bagazo
Metales (mg/mg)						
Aluminio	1.46×10^{-4}	6.84×10^{-5}	2.28×10^{-4}	1.00×10^{-4}	2.44×10^{-6}	*
Boro	9.13×10^{-4}	3.50×10^{-4}	5.02×10^{-4}	6.03×10^{-4}	3.95×10^{-5}	6.5×10^{-6}
Bario	8.29×10^{-5}	3.63×10^{-5}	1.70×10^{-4}	*	*	4.87×10^{-5}
Calcio	1.28×10^{-2}	1.01×10^{-2}	2.85×10^{-2}	1.24×10^{-3}	3.40×10^{-5}	3.12×10^{-3}
Cobre	5.29×10^{-5}	3.07×10^{-5}	5.97×10^{-4}	2.75×10^{-5}	1.02×10^{-6}	*
Hierro	8.04×10^{-5}	5.79×10^{-5}	9.68×10^{-5}	2.28×10^{-5}	2.95×10^{-7}	1.41×10^{-4}
Potasio	1.15×10^{-3}	1.96×10^{-4}	3.59×10^{-4}	6.02×10^{-4}	3.88×10^{-5}	1.96×10^{-4}
Magnesio	3.47×10^{-4}	2.17×10^{-5}	6.80×10^{-5}	3.17×10^{-5}	2.21×10^{-6}	2.80×10^{-4}
Sodio	4.11×10^{-2}	1.70×10^{-3}	1.58×10^{-3}	2.79×10^{-2}	4.15×10^{-3}	1.03×10^{-3}
Fósforo	2.67×10^{-4}	6.01×10^{-4}	6.04×10^{-4}	1.55×10^{-3}	1.37×10^{-5}	4.14×10^{-5}
Azufre	3.42×10^{-1}	9.56×10^{-5}	2.60×10^{-4}	7.39×10^{-4}	6.58×10^{-5}	2.29×10^{-4}
Silicio	4.31×10^{-3}	7.75×10^{-3}	7.85×10^{-3}	1.39×10^{-3}	5.87×10^{-4}	2.80×10^{-4}
Estroncio	1.89×10^{-4}	5.90×10^{-6}	7.50×10^{-5}	4.97×10^{-5}	*	1.01×10^{-4}
Zinc	1.76×10^{-5}	9.91×10^{-6}	9.86×10^{-6}	3.29×10^{-6}	6.45×10^{-7}	*

*: Por abajo del límite de detección.

Todas las muestras de lignina presentan calcio, esto es por la gran cantidad de oxalatos de calcio en forma de rafidio y estiloides que presenta el bagazo de agave. Como se observó en las micrográficas de SEM, la mayoría de los pretratamientos rompieron a estos oxalatos generando su solubilización en la

solución acuosa. Por otra parte, específicamente, LigNaOH tiene una cantidad mayor de sodio, esto es debido al PA, donde se utilizó NaOH como reactivo. Adicionalmente, para esta lignina, se encuentra una cantidad de azufre demasiado alta con respecto a las otras ligninas, esto se debe a que se utilizó H₂SO₄ al 72% para su precipitación. Como Prado et al., (2013) reporta, utilizar H₂SO₄ como agente precipitante de ligninas alcalinas genera Na₂SO₄, lo que justifica las grandes cantidades de azufre en LigNaOH. Además, este elemento fue observado en el análisis de ATR-FTIR de la sección 3.4.1.

Por otro lado, se sabe que el oxalato de calcio reacciona exotérmicamente o es incompatible con ciertos oxidantes fuertes como el PH o el ozono (Pérez-Pimienta et al., 2016). Además, como se mencionó anteriormente, algunos metales de transición como el Mn, Fe, Cu aceleran la descomposición del PH. Norkus et al., (2006) utilizaron un agente quelante para remover estos metales de transición de la pulpa de celulosa alcalina deslignificada con oxígeno. Las concentraciones iniciales de los metales contenidos en la pulpa fueron: 1.07×10^{-5} de Mn, 5.12×10^{-5} de Fe, 7.7×10^{-6} de Cu, 1.08×10^{-3} de Ca y 1.54×10^{-3} de Na. Después de la etapa quelante, los metales presentes en la fibra se redujeron en un 50% para el Fe y Mn, 70% para el Cu, 30-60% para el Ca y Na. Las concentraciones para el Fe y Ca contenidos en el bagazo (Tabla 3.7) son ligeramente superiores a las concentraciones presentes en la pulpa reportadas por Norkus et al., (2006), mientras que para el Na es similar. Por consiguiente, para el caso del bagazo, estos metales pueden estar reaccionando con el PH, disminuyendo su efectividad en la deslignificación, por lo que en el proceso de deslignificación con PHA probablemente sería conveniente emplear una etapa quelante para estos pretratamientos.

3.4.3. Análisis Termogravimétrico TGA

La descomposición térmica de los polímeros orgánicos se determina habitualmente mediante análisis termogravimétrico (TG) en atmósfera inerte (helio o nitrógeno) conocida como pirólisis, en atmósfera de aire controlada (gasificación) o con exceso de aire (combustión) (Tejado et al., 2007; Quesada-González, 2011). En este trabajo, el comportamiento térmico de las ligninas se determinó mediante el análisis

termogravimétrico con exceso de aire, con la finalidad de determinar el contenido de metales (% ceniza) presentes en la lignina, debido a que primeramente la lignina se oxida a gas y carbón y posteriormente a gas (COx) y cenizas (Lotf et al., 2018). En la Figura 3.9 se muestran los termogramas obtenidos para las ligninas extraídas de bagazo de agave con diferentes pretratamientos. La curva TG para la combustión de las ligninas hace referencia a la pérdida de peso con respecto a la temperatura. Al principio la pérdida de peso fue lenta; aumentó rápidamente en el rango de 248-605°C, donde la mayoría de las ligninas perdieron aproximadamente del 74% al 92% de su peso inicial.

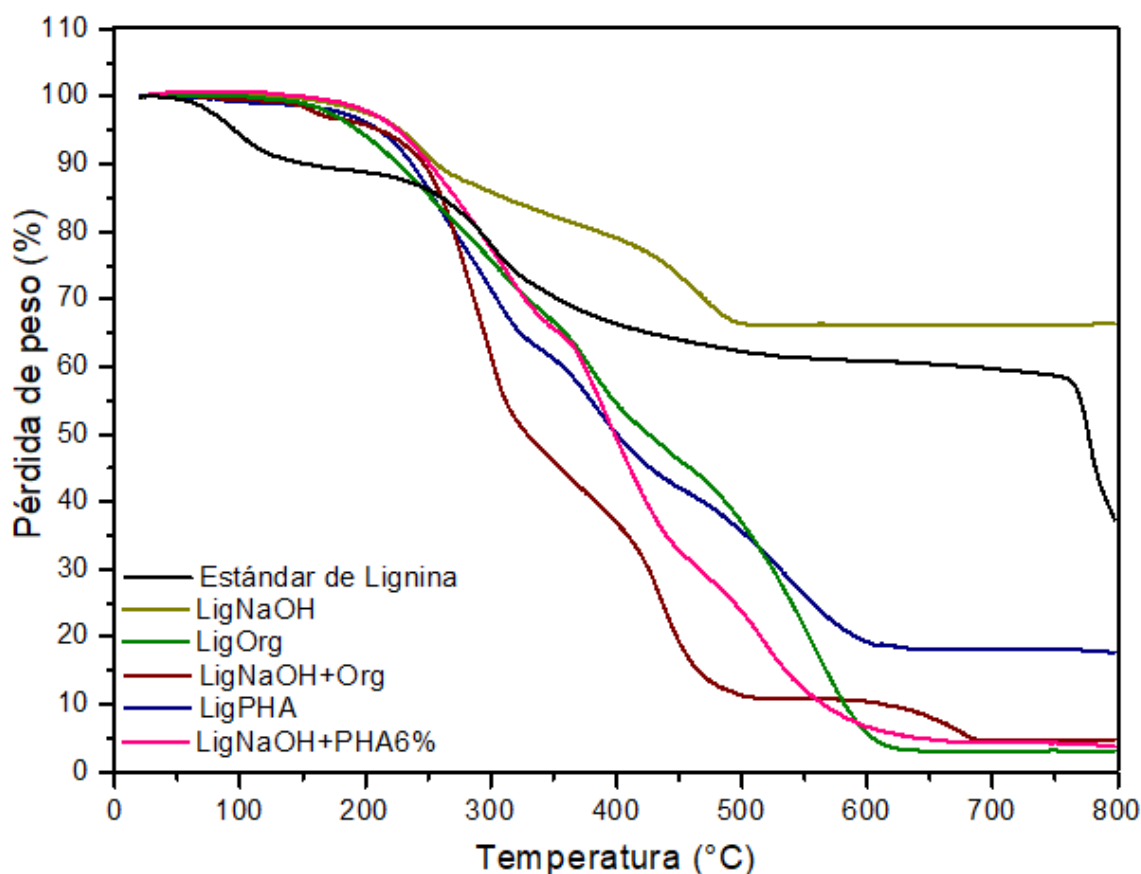


Figura 3.9. Termogramas en atmósfera de aire de las ligninas de bagazo de agave extraídas con diferentes pretratamientos

En la Tabla 3.8 se muestra el porcentaje de cenizas obtenido para cada muestra. Cabe resaltar que LigNaOH es la lignina que posee una mayor cantidad de cenizas. Como se discutió con anterioridad, esto es debido al Na_2SO_4 producido durante su precipitación y al ión sodio que se ancla en la lignina. Por consiguiente,

esta lignina no se puede comercializar, a menos que previamente se haya realizado un proceso de purificación o en su defecto, el método de precipitación sea diferente. Por otro lado, a pesar de que el pretratamiento de organosolv tuvo el menor porcentaje de deslignificación, LigOrg fue la lignina que presentó un menor porcentaje de cenizas (2.64%), esto es porque un proceso de organosolv tiende a extraer ligninas más puras (Zhao et al., 2009). Esto sugiere que podría ser la lignina más apta para comercializarse.

En lo que respecta a LigPHA, su alto contenido de cenizas se debe principalmente a que contiene una alta cantidad de sodio. Esto es porque durante el pretratamiento con PHA se utilizó una solución de NaOH para ajustar el pH a 11.5. Como se mencionó con anterioridad, el NaOH en solución acuosa se disocia en los iones OH^- y Na^+ y, específicamente este último es el que se ancla en la lignina (Fig. 1.5).

Tabla 3.8. Porcentaje de cenizas a 800 °C, medidas por TGA, presentes en las ligninas obtenidas de bagazo de agave con diferentes pretratamientos

Muestra	Cenizas (%)
Estándar de lignina	37.30
LigNaOH	66.23
LigOrg	2.64
LigNaOH+Org	5.19
LigPHA	17.69
LigNaOH+PHA6%	4.07

3.4.4. DSC

En la Figura 3.10 se muestran los termogramas obtenidos para las ligninas extraídas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos. A partir de dichos termogramas se calcularon las temperaturas de transición vítrea (T_g) mostradas en la Tabla 3.9.

Las T_g para todas las ligninas extraídas del bagazo y del estándar estuvieron en el rango de 120-161°C, estos valores concuerdan con lo reportado por Sammons

et al., (2013), donde la Tg de las ligninas se encuentra en el rango de 90-180°C. A pesar de que todas las ligninas provienen de la misma biomasa, presentan distinto valor de Tg. Esto puede deberse a que el valor de Tg depende de varios factores como el peso molecular del polímero, la presencia de humedad, la presencia de fase cristalina, el contenido de polisacáridos, el tratamiento térmico y la presencia de diversos contaminantes en las muestras de lignina (Thakur et al., 2014; Gregorova et al., 2013). Por otro lado, las señales que se presentan a temperaturas menores a 70°C pueden atribuirse a la pérdida adicional de moléculas de agua (Lange et al., 2016).

La importancia de determinar la Tg de las ligninas radica principalmente en la aplicación polimérica de éstas. Por ejemplo, Bahl et al., (2014) utilizaron lignina Kraft con una Tg de 128°C para desarrollar un sistema híbrido (lignina+negro de humo) de relleno que se utilizará como reforzante en la elaboración de compuestos de caucho. El caucho es un polímero elástico (elastómero) y para que la lignina pueda fungir como relleno de compuesto de caucho se tiene que manejar a temperaturas por debajo de su Tg que es donde la lignina se vuelve elástica y flexible.

Tabla 3.9. Temperaturas de transición vítrea para las ligninas extraídas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos

Muestra	Tg (°C)
Estándar	120.80
LigNaOH	146.55
LigOrg	152.03
LigNaOH+Org	161.51
LigPHA7.36%	150.17
BagNaOH+PHA6%	123.49

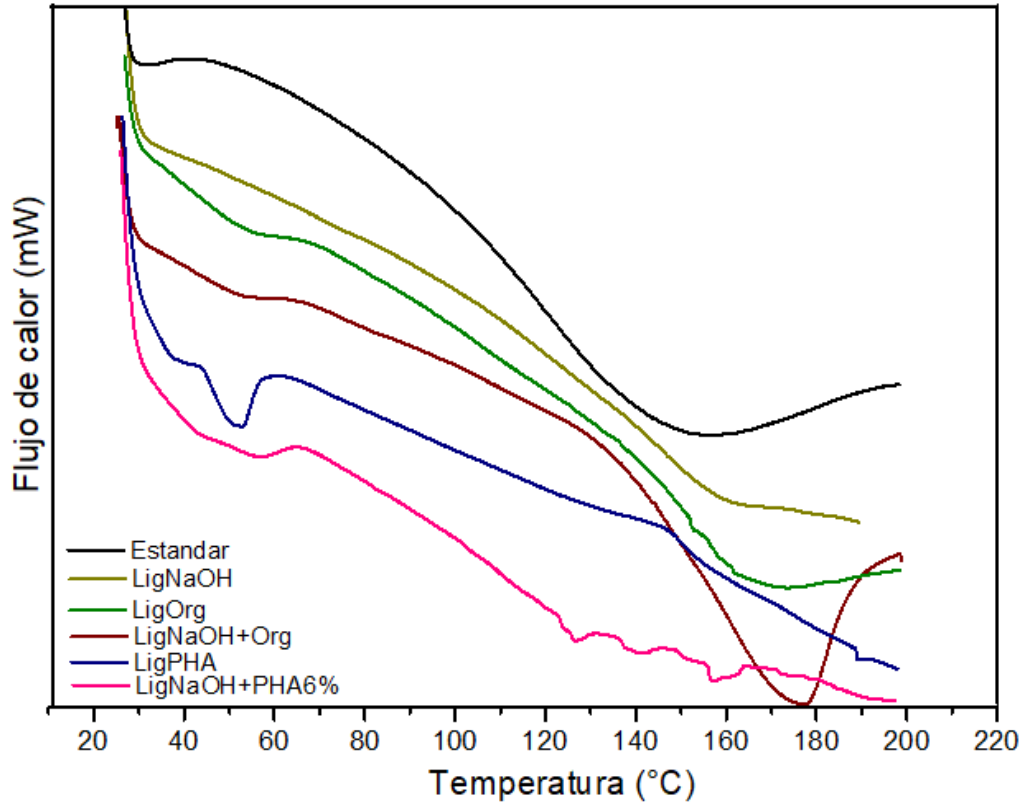


Figura 3.10. Termogramas DSC de las ligninas extraídas del bagazo de agave con diferentes pretratamientos

3.4.5. Aplicaciones para las ligninas extraídas.

En el análisis de FTIR se observó que la estructura fenólica de LigOrg no se vio afectada por el pretratamiento. Dizhbite et al., (2004) reportaron que los fenoles contenidos en la lignina son los responsables de que ésta posea la propiedad de antioxidante, debido a que atraen a los radicales libres de oxígeno. Debido a lo anterior, una posible aplicación para LigOrg sería utilizarla como antioxidante natural y como inhibidor de la corrosión de metales. Por otra parte, la presencia de grupos funcionales OH⁻, C=O y -COOH en este tipo de lignina son los responsables de que ésta forme complejos con iones metálicos. Además, como se observó en el análisis de ICP-OES y TGA, LigOrg fue la lignina que presentó menor cantidad de metales en comparación con las otras ligninas, por lo que puede ser considerada como una lignina menos contaminada y debido a la presencia de radicales fenólicos

e hidroxilo puede ser utilizada como adsorbente de metales pesados como plomo, cobre, cadmio, zinc y níquel en el tratamiento de aguas residuales.

Para el caso de LigPHA, como se discutió anteriormente en el análisis de FTIR, el pretratamiento de PHA originó que los grupos carbonilos presentes en la lignina dieran origen a grupos carboxilos los cuales poseen propiedades ácidas. Es por ello que este tipo de lignina podría ser una opción sostenible para la futura tecnología de superplastificante que consiste en agregar aditivos (superplastificantes) al concreto con la finalidad de hacerlo más fuerte (Kalliola et al. 2015). Otra razón es lo reportado por Kalliola et al., (2015) quienes proponen que, en condiciones alcalinas, se propicia la formación de radicales hidroxilo e hidrperoxilo que pueden reaccionar con la lignina fenólica para formar un radical fenoxilo. Esto conduce a la despolimerización de la lignina y a la introducción de grupos ácidos en éstas. Por consiguiente, LigPHA también puede ser utilizada como dispersante aniónico en suspensiones de caolín con el fin de mejorar su fluidez en aplicaciones como la elaboración de cerámica, papel, formulaciones para el cuidado de la salud y aplicaciones farmacéuticas (He et al., 2017; Konduri and Fatehi, 2018). Existen estudios en la literatura (He et al., 2017; Kalliola et al., 2015) donde se ha reportado el uso de PH u oxígeno en lignina Kraft o lignina alcalina con la finalidad de oxidarlas para poder utilizarlas como plastificantes o como dispersante en soluciones de caolín.

Por otra parte, como se observó en el análisis de ICP-OES y TGA, LigPHA presenta una cantidad importante de metales. Esto puede deberse a que durante el pretratamiento de PHA se generaron diversos grupos funcionales debido a la escisión de los enlaces éster entre la lignina y la hemicelulosa. Estos grupos pueden fungir como sitios activos para metales. Esto podría permitir el empleo de LigPHA como adsorbente de metales.

En el caso de la lignina alcalina extraída de pseudotallos de plátano, Ramírez et al., (2015) reportaron su uso como adsorbente de plomo. Las pruebas de adsorción mostraron una alta afinidad de la lignina por el plomo, con una remoción máxima de plomo del 55%.

Por otro lado, si la lignina obtenida por el PA lograra purificarse, podría ser aprovechada en la formulación de adhesivos como lo son las resinas fenólicas. En este tipo de productos, el fenol proviene de la industria petroquímica, por lo cual se ha buscado productos biológicos que puedan sustituirlo y uno de ellos es la lignina. Martínez et al., (2007) reportaron el uso de lignina alcalina proveniente del bagazo de caña como modificador de resinas fenólicas. En dicho estudio se encontró que la lignina genera importantes variaciones sobre las características de las resinas fenólicas que pueden afectar su posterior curado, y por ende las aplicaciones de la resina. Pese a esto, la lignina ofrece una interesante alternativa ambiental para este sector industrial.

Desde otra perspectiva, la lignina es la fuente más abundante de compuestos químicos aromáticos en la naturaleza, que ha atraído una gran atención en las últimas décadas porque la despolimerización de la lignina puede producir derivados de fenol como productos químicos de valor agregado y combustibles alternativos (Chen et al., 2018). Actualmente, un gran número de investigaciones se ha dirigido a la despolimerización de la lignina (Park et al., 2018; Gosselink et al., 2012) con el fin de encontrar vías para la descomposición de este biopolímero en compuestos monofenólicos. Una vez que las ligninas hayan pasado por un proceso de purificación con la finalidad de eliminar los polisacáridos, metales y otros contaminantes presentes en ellas, las ligninas podrían ser sometidas a algún proceso de despolimerización (Fig. 3.11) con la finalidad de obtener productos químicos valiosos. Actualmente, el mercado de la lignina se limita a productos de bajo valor como combustibles, agentes dispersantes y aglutinantes (2% de lignina). La conversión de la lignina a productos químicos es una alternativa prometedora para agregar valor a la cartera de productos de biorefinerías, garantizando su viabilidad (Lotfi et al., 2018).

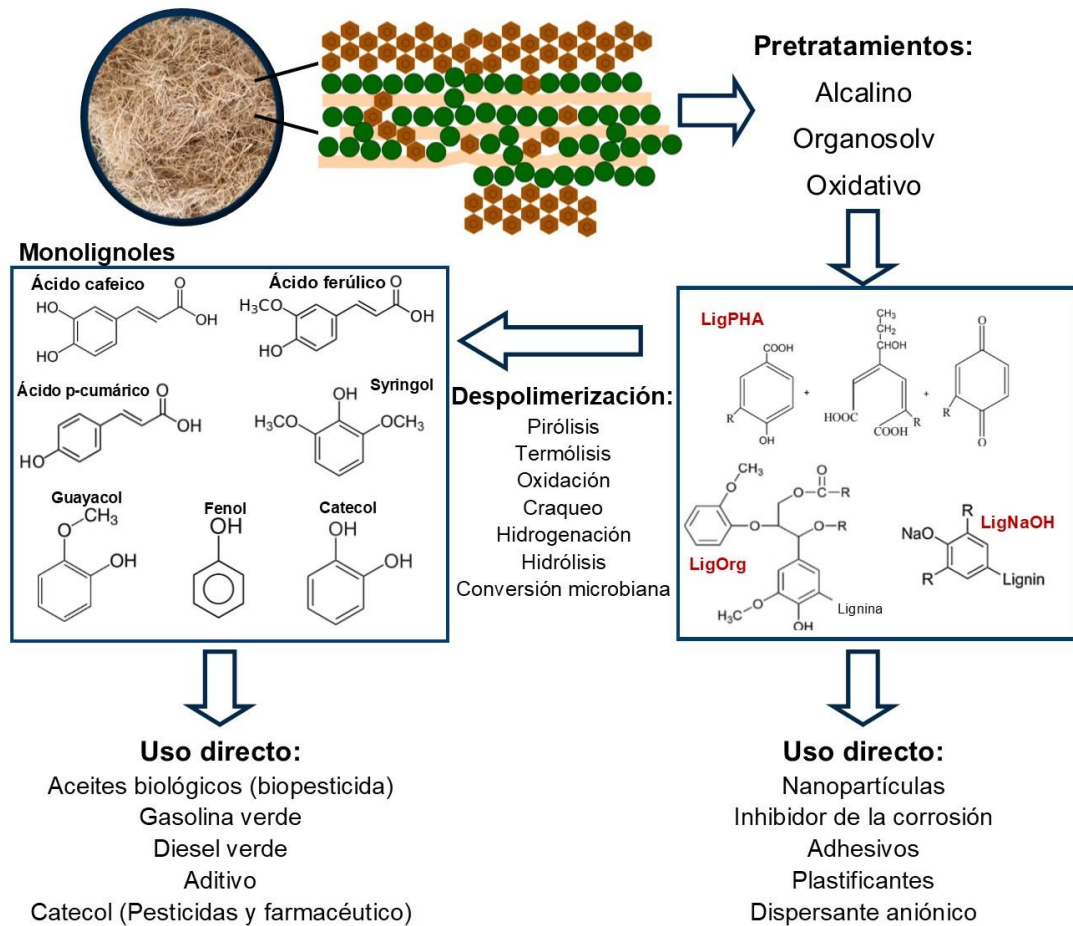


Figura 3.11. Esquema de un proceso para la valorización de la lignina a productos químicos de valor agregado

3.5 Hidrólisis enzimática

En la Figura 3.12 se muestran los AT obtenidos mediante hidrólisis enzimática de BSP y de las fibras del bagazo de agave con diferentes pretratamientos. En dicha figura se observa que, a excepción del pretratamiento de organosolv, todos los demás ayudaron a incrementar la disponibilidad de los polisacáridos debido a la remoción de lignina ya que se pudo observar una mayor sacarificación de la celulosa y hemicelulosa. Los resultados obtenidos mostraron que los hidrolizados de bagazo de agave alcanzaron concentraciones de 37 g AT/L, aproximadamente, cuando se utilizó el pretratamiento oxidativo (PHA). En comparación con la concentración de AT obtenida con BSP (27.35 g AT/L), los pretratamientos oxidativos lograron

incrementar hasta 1.5 veces más la concentración de AT. Esto se debe principalmente a la remoción de lignina ya que los pretratamientos oxidativos obtuvieron un mayor porcentaje de deslignificación (Tabla 3.3) en comparación con los otros pretratamientos evaluados.

Es importante mencionar que los componentes presentes en la enzima Stonezyme aportan AT y pueden ser empleados para la producción de metano. Esta contribución es muy pequeña (2.25 g AT/L) comparado con los AT producidos durante la hidrólisis de BagPHA7.36% (39.12 g AT/L) y BagPHA15% (36.65 g AT/L), los cuáles son aproximadamente 16 veces más que los AT contenidos en la enzima.

A pesar de que BagPHA15% tuvo una mayor remoción de lignina en comparación con BagPHA7.36%, con ambas fibras se obtuvo prácticamente la misma cantidad de AT. Esto puede deberse, principalmente, a que cuando se utilizó el pretratamiento con PHA al 15% se removió una cantidad mayor de celulosa y hemicelulosa comparado con el pretratamiento de PHA al 7.36% (Anexo 5a y 5b), disminuyendo con ello la cantidad de azúcares disponibles para ser hidrolizados.

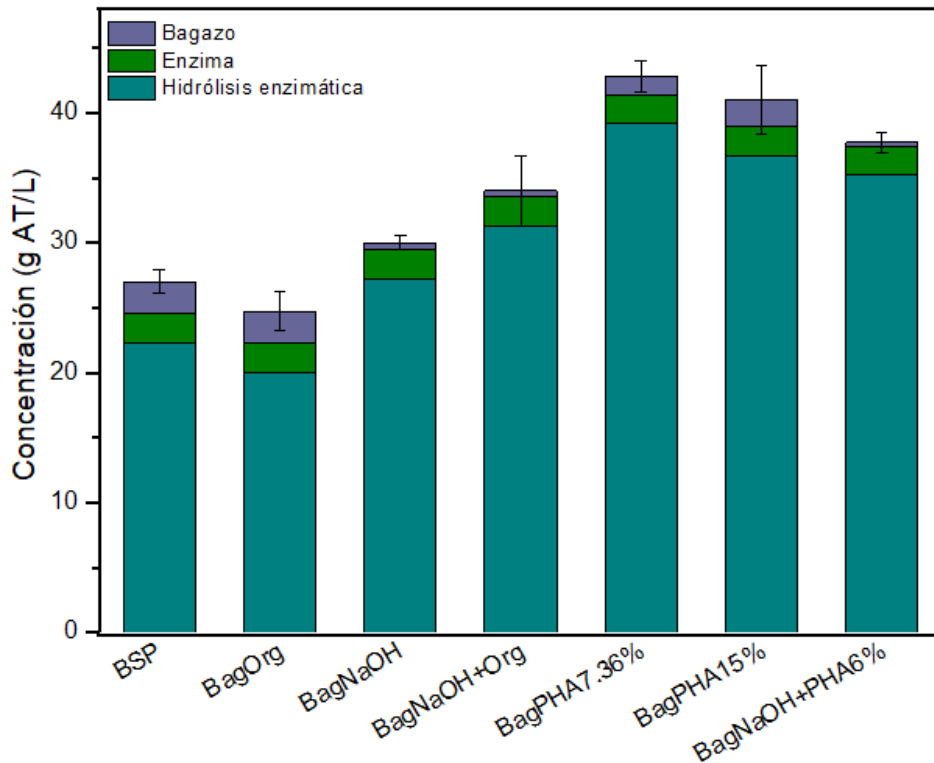


Figura 3.12. AT de los hidrolizados enzimáticos de las fibras de bagazo de agave con y sin pretratamiento

En lo que respecta a la demanda química de oxígeno (DQO) (Fig. 3.13), se puede apreciar el mismo efecto que en los AT, donde los hidrolizados de BagPHA7.36% y BagPHA15% presentan las mayores concentraciones de DQO en comparación con los otros hidrolizados evaluados. Los hidrolizados obtenidos del pretratamiento oxidativo aumentaron 1.3 veces más la DQO en comparación con la DQO obtenida del hidrolizado de BSP.

Algo de suma importancia que hay que resaltar, es que la enzima (Stonezyme) utilizada para llevar a cabo las hidrólisis tiene un aporte importante a la DQO en todos los hidrolizados. Sin embargo, en el caso de los hidrolizados de BagPHA7.36% y BagPHA15% se puede observar que la contribución debida a la hidrólisis enzimática es mayor que en el resto de los pretratamientos, y casi comparable con la contribución de los componentes de la enzima. El hecho de que la enzima contribuya a la DQO se debe a los componentes de los estabilizantes que contiene, ya que pueden estar presentes sustancias orgánicas susceptibles a ser oxidadas aumentando con ello la DQO.

Con base en estos resultados, para la producción de metano en lote, se decidió utilizar el hidrolizado de BagPHA7.36% porque fue el hidrolizado que obtuvo una concentración mayor de AT y DQO. No se empleó el hidrolizado de BagPHA15%, ya que para este último se tuvieron problemas experimentales cuando se realizó el pretratamiento, como ya fue descrito anteriormente. También se utilizó el hidrolizado de BagNaOH debido a que presentó una concentración de AT más alta que el hidrolizado de BSP y en los pretratamientos secuenciales el PA es el que removió la mayor cantidad de lignina. Además, se quería observar el efecto de un PA en la producción de metano.

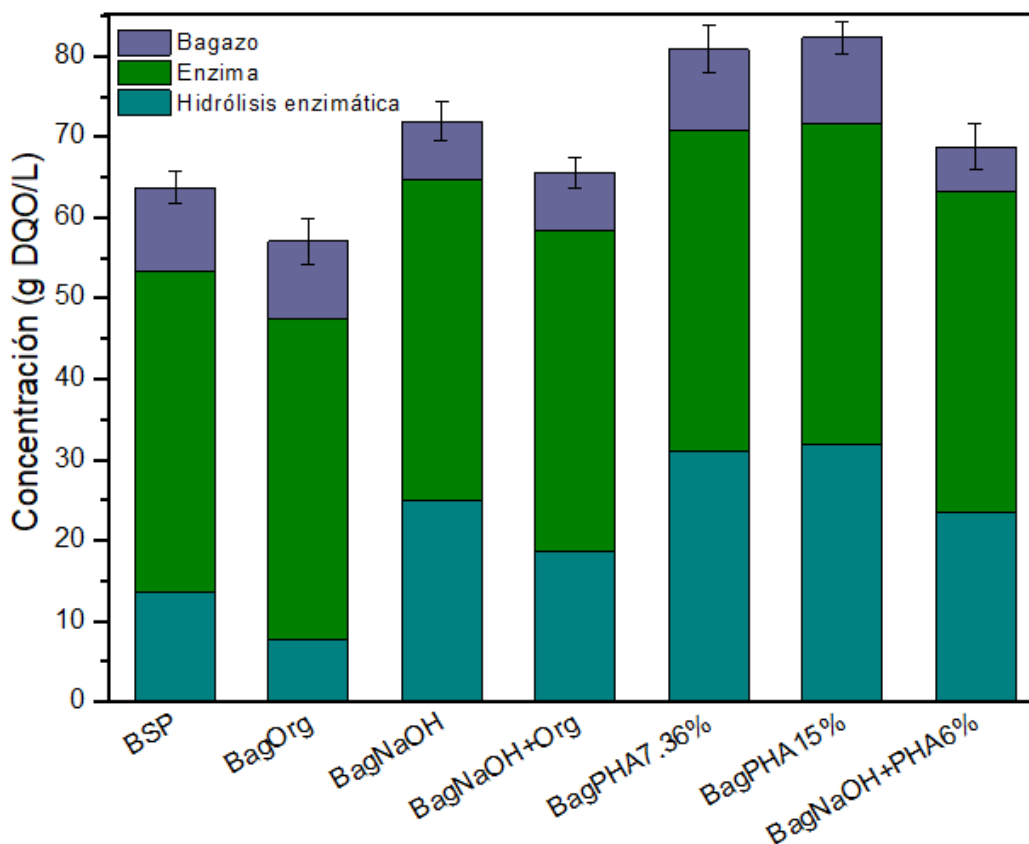


Figura 3.13. Demanda química de oxígeno de los hidrolizados de las fibras de bagazo con y sin pretratamiento

3.6 Producción de metano

En la Figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de producción de metano en lote a partir de los hidrolizados de BSP, BagPHA7.36% y BagNaOH, así como el control de glucosa. Estos rendimientos están ligeramente por abajo del teórico (350 NmL CH₄/gDQO), lo que probablemente se deba a variabilidad experimental. Sin embargo, dichos valores se encuentran en el rango de valores aceptables en la prueba de BMP's (297.50-402.50 NmL CH₄/g DQO).

Por otro lado, al comparar los rendimientos de producción de metano (NmL CH₄/g DQO_{cons}) de los hidrolizados evaluados, se observa que los resultados obtenidos son similares, lo que podría llevar a pensar que los pretratamientos no tuvieron un efecto positivo en la producción de metano. Esta similitud se debe a que se utilizó la misma concentración de DQO inicial. Sin embargo, se puede apreciar

en la Figura 3.16 que en el caso del rendimiento de producción de metano para el hidrolizado de BSP, la mayor contribución corresponde a los componentes presentes en la enzima, mientras que la contribución a los componentes generados por la hidrólisis enzimática del bagazo de agave solo corresponde a un 35.11%. En cambio, para el caso de los hidrolizados de BagPHA7.36% y BagNaOH la contribución de la enzima a la producción de metano disminuye mientras que la contribución debida a los componentes liberados durante la hidrólisis aumenta. Por otro lado, si expresamos el rendimiento de producción de metano en NmL CH₄/g Bagazo (Tabla 3.10), se puede apreciar que los hidrolizados obtenidos a partir de BagPHA7.36% y BagNaOH aumentaron aproximadamente 1.5 veces, el rendimiento de producción de metano en comparación con el hidrolizado del BSP. Por lo que, el uso de estos pretratamientos, además de extraer un subproducto de valor agregado como lo es la lignina, incrementa la producción de metano.

Finalmente, el rendimiento (NmL CH₄/g bagazo) obtenido en el presente estudio para el hidrolizado de BSP fue mayor que el reportado por Arreola-Vargas et al., (2016), como se puede observar en la Tabla 3.10. Esta diferencia puede deberse principalmente al tipo de enzima utilizada, ya que en el presente trabajo se utilizó Stonezyme, enzima que contiene una cantidad considerable de DQO y que en los ensayos de BMP's contribuyó con un 65% a la producción de metano, mientras que en el trabajo de Arreola-Vargas et al., (2016) se utilizó Celluclast 1.5L, para la cual, la contribución de DQO no es tan alta como con Stonezyme.

Por otro lado, Galindo-Hernández et al., (2018) reportó un rendimiento de 393.4 NmL CH₄/g BCP utilizando una mezcla enzimática para obtener un hidrolizado de bagazo pretratado con un proceso oxidativo. Comparado con lo obtenido en el presente estudio (423 NmL CH₄/g BCP) ese valor es similar. La pequeña diferencia se debe probablemente a que en el presente trabajo la enzima utilizada en este trabajo contiene una cantidad considerable de DQO, por lo que en los ensayos de BMP's contribuye con más del 50% a la producción de metano (Fig. 3.14).

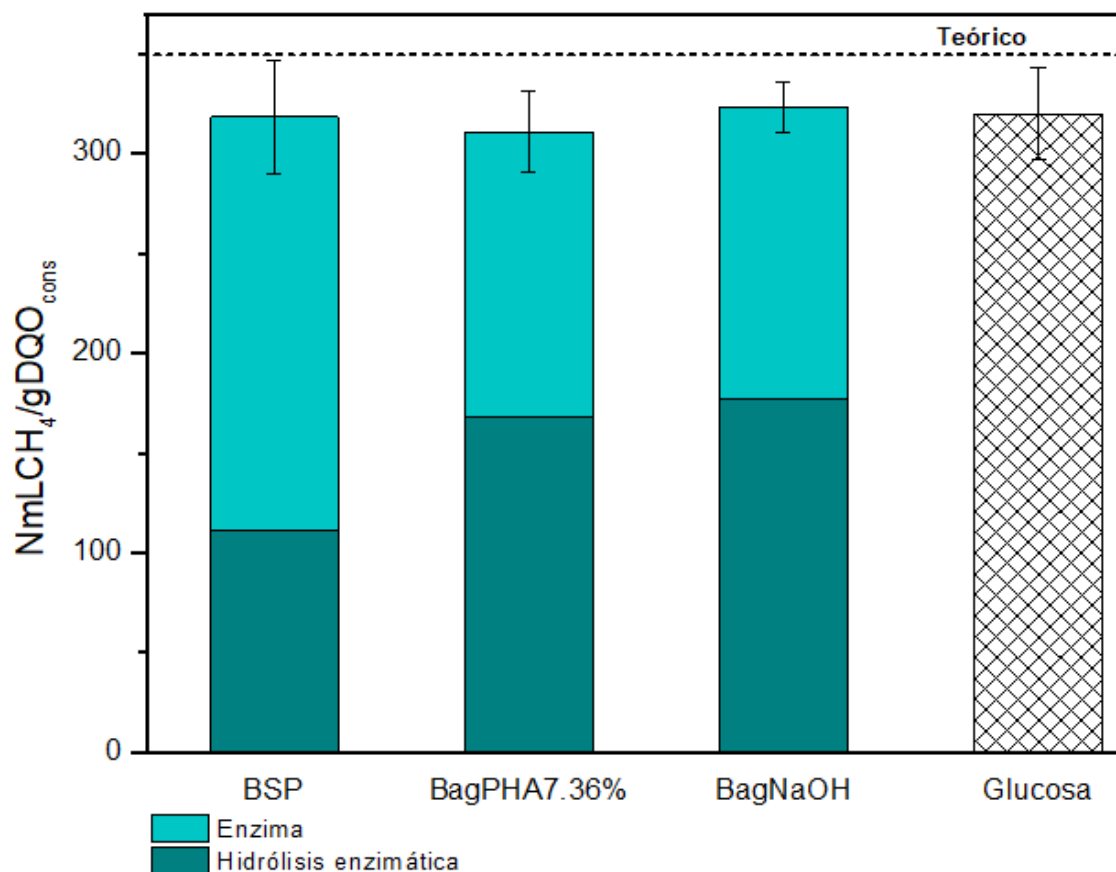


Figura 3.14. Rendimientos de producción de metano (BMP's) obtenidos con los hidrolizados enzimáticos de la fibra de bagazo sin pretratar (BSP), fibra de bagazo pretratado con PHA al 7.36% (BagPHA7.36%) y fibra de bagazo pretratada con hidróxido de sodio al 6% (BagNaOH) y del control de glucosa

Tabla 3.10. Rendimientos de la producción de metano en lote obtenidos con los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave con y sin pretratamiento

Fibra Hidrolizada	Rendimiento	Fuente
BSP	286.90±14.77 NmL CH ₄ /g BSP	En este estudio
BSP	~87.5 NmL CH ₄ /g BSP	Arreola-Vargas et al., 2016
BagPHA7.36%	423.00±16.12 NmL CH ₄ /g BCP	En este estudio
BagPAH2%	393.40 NmL CH ₄ /g BCP	Galindo-Hernández et al., 2018
BagNaOH	380.40±8.96 NmL CH ₄ /g BCP	En este estudio

BSP: Fibra de bagazo sin pretratamiento

BCP: Fibra de bagazo con pretratamiento

BagPHA7.36%: Fibra de bagazo pretratado con PHA al 7.36%

BagPHA2%: Fibra de bagazo pretratado con PHA al 2%

BagNaOH: Fibra de bagazo pretratado con hidróxido de sodio

Por otra parte, en la Fig 3.15 se muestran las curvas correspondientes a la producción en lote de metano para los hidrolizados de BSP, BagPHA7.36%, NaOH6%, así como para sus respectivos controles de enzima, y para los controles de glucosa y endógeno. En la Tabla 3.11 se muestran los parámetros de Gompertz. Como se puede observar el valor la fase lag (λ) para todas las muestras evaluadas fue cercano a cero. Esto puede deberse a que aunque durante la digestión anaerobia la etapa de hidrólisis es el paso limitante, debido a que se realizó una hidrólisis enzimática, los azúcares necesarios estaban fácilmente disponibles para que los microorganismos los transformaran a metano.

Por otro lado, la máxima producción de metano (H_{max}) para los hidrolizados de las fibras con y sin pretratamientos estuvieron en el rango de 1709-1737 NmLCH₄/Lr y son similares al control de glucosa. Esto nos indica que durante este proceso no se encontraron inhibidores que afectaran negativamente la producción de metano. En el caso del hidrolizado de BSP la H_{max} es 2.5 veces mayor al valor reportado por Arreola-Vargas et al., (2016). Esta diferencia puede deberse principalmente al tipo de enzima utilizada. Debido a que en el presente estudio se utilizó Stonezyme, enzima que contribuye con el 70% al valor de H_{max} del hidrolizado de BSP. Para el caso de los hidrolizados obtenidos a partir de fibra pretratada, los valores de H_{max} son muy cercanos a los reportados por Galindo-Hernández et al., (2018).

En lo que respecta a la velocidad máxima de producción de metano (R_{max}), los valores para los hidrolizados de las fibras pretratadas y sin pretratar fueron similares al valor del control de glucosa y a lo reportado en la literatura. Asimismo, el valor más alto de H_{max} y R_{max} se obtuvo con el hidrolizado de BSP. Esto pareciera indicar que la deslignificación no tuvo un efecto significativo en la producción de metano. Sin embargo, como se discutió anteriormente, en los hidrolizados de BagPHA7.36% y BagNaOH se observó una mayor contribución de la DQO obtenida por la hidrólisis al metano producido (Fig. 3.14) y se observó un aumento del rendimiento de producción de metano (NmLCH₄/g bagazo pretratado).

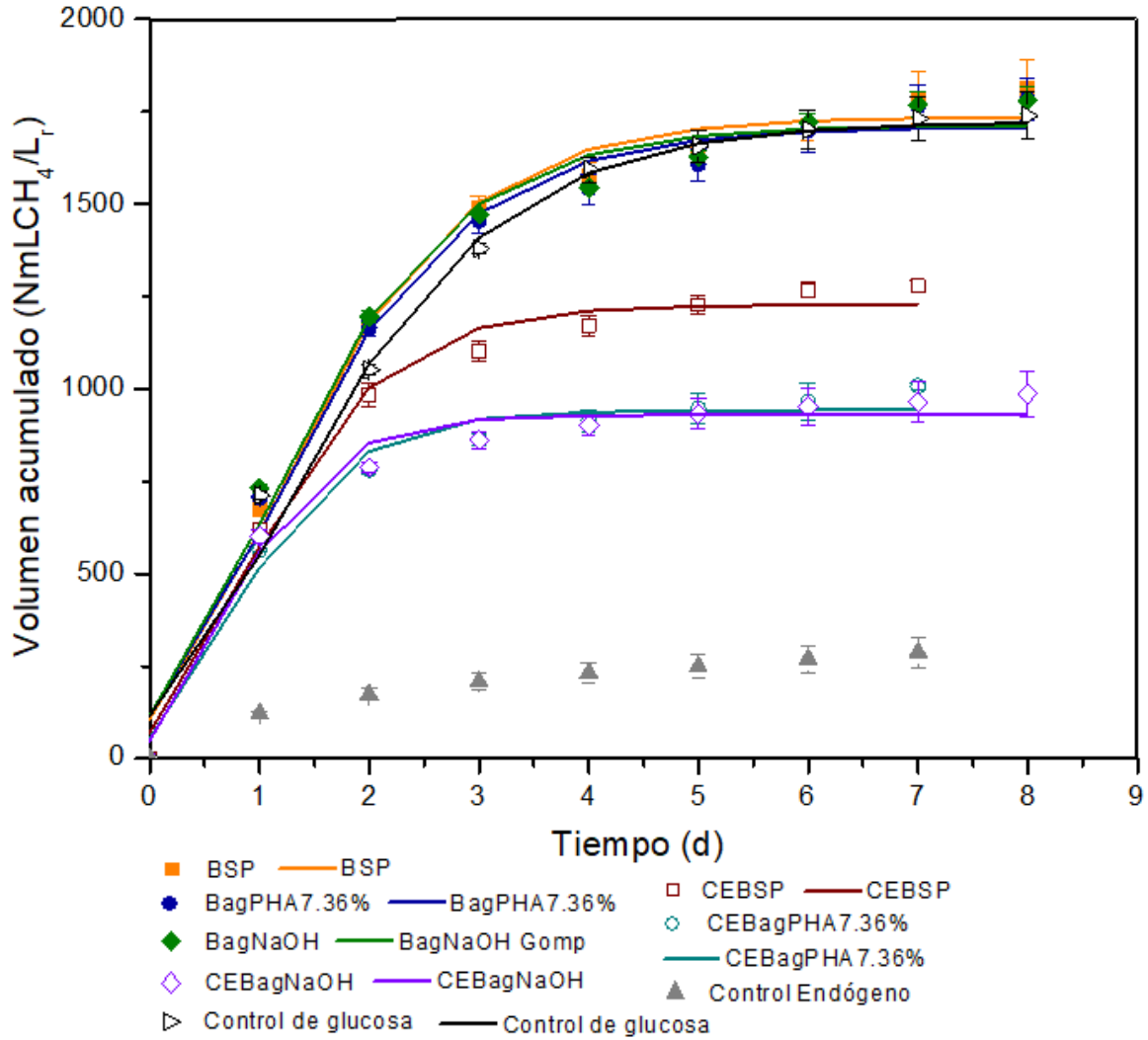


Figura 3.15. Producción en lote de metano (puntos) con su ajuste a Gompertz (línea sólida) para los hidrolizados de la fibra de bagazo sin pretratar (BSP), las fibras pretratadas con PHA al 7.36% (BagPHA7.36%) y con NaOH al 6% (BagNaOH) así como sus respectivos controles de enzima, glucosa y endógeno

Tabla 3.11. Parámetros cinéticos calculados con la ecuación de Gompertz para los ensayos de producción de metano en lote a partir de los hidrolizados de las fibras de bagazo con y sin pretratamiento, de los controles de enzima, de glucosa y de endógeno

Fibra Hidrolizada	Hmax (NmLCH ₄ /L _r)	Rmax (mL/L _r .d)	λ (d)	R ²	Fuente
BSP	1737	634.5	0.03721	0.989	Este estudio
CEBSP	1228	600.9	0.04811	0.9876	Este estudio
BagPHA7.36%	1709	609.7	0	0.9855	Este estudio
CEBagPHA7.36%	942.2	540.9	0.03409	0.9795	Este estudio
BagNaOH	1714	632.6	0	0.9851	Este estudio
CEBagNaOH	929.9	606.7	0.05578	0.9789	Este estudio
Control Glucosa	1724	549.2	0	0.9867	Este estudio
BSP	~700	~540	*	*	Arreola-Vargas et al., 2016
BagPHA2%	1743.30	670	*	*	Galindo Hernández et al., 2018

*: No reportado

Lr: Litros de reactor

CE: Control de enzima

Adicionalmente, en la Tabla 3.12 se puede observar la conversión de BSP en sus respectivos productos para dos de los pretratamientos estudiados

. Como se puede observar la suma de todos los productos no cierra a uno. Esto se debe a que el bagazo de agave presenta otros componentes que no están incluidos en la Tabla 3.12. Por otro lado, el valor de la conversión de bagazo a metano para los pretratamientos PHA al 7.36% y PA es similar al valor teórico que es 0.18 g CH₄/g BSP y 0.127 g CH₄/g BSP, respectivamente. Asimismo, el valor de conversión de metano para BagNaOH es casi la mitad comparado con el valor obtenido para BagPHA7.36%. Esta diferencia puede deberse a que durante el PA se pierde aproximadamente el 50% de celulosa que puede ser utilizada durante la producción de metano. La remoción de celulosa por el PA también se observa en la Tabla 3.12, debido a que el valor de la conversión de bagazo a celulosa para BagNaOH fue menor comparado con el valor obtenido por BagPHA7.36%, además esta observación ya se había reportado en la sección 3.3.1. Finalmente, como se discutió anteriormente el pretratamiento con PHA al 7.36% removió una mayor cantidad de lignina (0.084 g lignina/g BSP) comparado con el PA (0.064 g lignina/g BSP).

Tabla 3.12. Conversión del bagazo de agave pretratado en sus respectivos productos

Muestra	Celulosa (g/g BSP)	Hemicelulosa (g/g BSP)	Lignina (g/g BSP)	Metano (g CH₄/g BSP)
BagPHA7.36%	0.4891	0.0726	0.084	0.20
BagNaOH	0.2888	0.043	0.064	0.12

Para el caso de la lignina, el valor utilizado para calcular la conversión fue la cantidad de lignina extraída, mientras que para la celulosa y hemicelulosa fue la cantidad presente de estos polímeros en la fibra remanente después del pretratamiento.

La lignina, es el segundo polímero más abundante en la tierra y se encuentra en la biomasa lignocelulósica. Actualmente, su principal aplicación es como combustible, aunque, se ha utilizado como surfactante, adhesivo y aditivo de polímeros, pero tiene potencial para ser empleado en la industria farmacéutica, en la agricultura, en la industria cosmética, entre otras, ya que puede ser un sustituto de los polímeros que no son biodegradables y con ello, disminuir el impacto ambiental. Es por ello, que es necesario determinar las mejores condiciones de un pretratamiento químico para maximizar la remoción de lignina y a su vez, obtener una recuperación alta de ella. Sin embargo, en este estudio las recuperaciones de lignina fueron bajas, por lo que es necesario optimizar un método para precipitar lignina. Por otro lado, se observó que la remoción lignina incremento los rendimientos de producción de metano de las dos fibras deslignificadas a las que se sometió a hidrolisis enzimática.

Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas

4.1. Conclusiones

En base al análisis de Van Soest y a los balances de masa, se determinó que el pretratamiento que presenta una mayor remoción de lignina es el pretratamiento de PHA al 15%. Sin embargo, debido a los problemas experimentales para trabajar a esa concentración, la mejor opción para deslignificar es utilizar el pretratamiento de PHA al 7.36%.

Se observaron bajos porcentajes de recuperación de lignina para todos los pretratamientos evaluados, debido a que la precipitación ácida no fue un buen procedimiento para precipitar lignina.

En las micrografías de SEM se apreció que la lignina que recubre al xilema y floema en las fibras de bagazo pretratadas, quedó expuesta debido a los pretratamientos utilizados. Además, los pretratamientos generaron una modificación estructural de estos haces vasculares. La exposición de la lignina también se observó en el análisis de ATR-FTIR mediante un aumento en la intensidad de las bandas características de las ligninas.

Mediante el análisis de XRD se determinó que los pretratamientos oxidativos generan una modificación en la región cristalina de la celulosa, disminuyendo su IC. Mientras que el PA remueve gran parte de la celulosa amorfa, además de lignina y hemicelulosa, lo que hace que el IC aumente.

En base al análisis de TGA e ICP-OES se determinó que LigOrg contiene una menor cantidad de metales comparada con las otras ligninas obtenidas en este trabajo.

Con ayuda del análisis de ATR-FTIR en las ligninas extraídas se demostró que LigOrg posee radicales fenólicos e hidroxilo por lo que podría tener aplicaciones industriales como antioxidante, inhibidor de la corrosión y adsorbente de metales pesados principalmente. Mientras que LigPHA probablemente no necesita un tratamiento posterior para modificar sus grupos funcionales y así como se extrae

podría emplearse en plastificantes o como dispersante en soluciones de caolín y como adsorbente de metales.

En base a la Tg determinada y datos reportados en la literatura, LigNaOH+PHA es la lignina que podría formar un sistema híbrido (lignina + negro de humo) con la finalidad de reforzar un polímero elastómero como lo es el caucho.

Los BMPs de los hidrolizados de bagazo sin pretratar y pretratados fueron semejantes. Sin embargo, la fracción de metano proveniente de la DQO liberada durante la hidrolisis fue mayor para los hidrolizados pretratados

El rendimiento de producción de metano del hidrolizado enzimático de BagPHA7.36% (423 NmL CH₄/g BCP) fue 1.5 veces mayor que el obtenido con el hidrolizado enzimático del BSP (286.90 NmL CH₄/g BCP).

4.2. Perspectivas

Una opción para incrementar el porcentaje de deslignificación en las fibras pretratadas sería utilizar una etapa posterior al pretratamiento químico donde se utilicen lacasas, con la finalidad de que éstas remuevan la lignina remanente.

Para el caso del pretratamiento secuencial álcali+PHA, sería importante evaluar el parámetro de agitación para observar si se presenta un incremento significativo en la remoción de lignina.

Sería conveniente implementar una etapa quelante para el pretratamiento con PHA con la finalidad de evaluar si aumenta la deslignificación del bagazo de agave.

Debido a que LigOrg fue la lignina que presentó una menor cantidad de metales y en base a la literatura donde se reporta que este tipo de lignina es nativa, se recomienda optimizar el pretratamiento de organosolv con la finalidad de maximizar la extracción de este tipo de lignina.

Con la finalidad de aumentar la recuperación de las ligninas hay que realizar un estudio donde se evalúen los parámetros que afectan la precipitación de la lignina, tales como, tipo de ácido o coagulante, concentración y cantidad de éste, pH de precipitación y temperatura.

Con la finalidad de obtener una lignina libre de sulfatos y metales se recomienda utilizar otros agentes precipitantes que no sean HCl o H₂SO₄. Un ejemplo de agente precipitante es el hexano. Adicionalmente, es necesario utilizar una precipitación en dos pasos, donde inicialmente se precipiten los polisacáridos y posteriormente la lignina, ya que de esta manera se obtendría una lignina más pura.

Se requiere emplear otras técnicas analíticas que permitan obtener una caracterización más completa de las ligninas, lo cual ayudaría a determinar sus aplicaciones industriales. Una de estas técnicas es el potencial zeta con el que se podría definir la capacidad de absorción de la lignina mediante la medición de la carga superficial de ésta. La dispersión de luz dinámica tiene la finalidad de determinar el radio hidrodinámico promedio y la polidispersidad de las partículas de lignina, lo que sería de gran utilidad para caracterizar nanopartículas de lignina

empleadas en la liberación de drogas. La resonancia magnética nuclear (C NHR, por sus siglas en inglés) permite elucidar la estructura de la lignina proporcionándonos información sobre las unidades estructurales de ésta, así como la presencia de impurezas.

Referencias

- Abdelaziz Omar Y., Gadalla Mamdouh A., El-Halwagi Mahmoud M., Ashour Fatma H.** (2015). "A hierarchical approach for the design improvements of an Organocat Biorefinery". *Bioresource Technology*, 181, 321–329.
- Ago, M., Borghei, M., Haataja, J. S., & Rojas, O. J.** (2016). Mesoporous carbon soft-templated from lignin nanofiber networks: Microphase separation boosts supercapacitance in conductive electrodes. *RSC Advances*, 6, 85802–85810.
- Alekhina, M., Ershova, O., Ebert, A., Heikkinen, S., & Sixta, H.** (2015). Softwood kraft lignin for value-added applications: Fractionation and structural characterization. *Industrial Crops and Products*, 66, 220–228.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J.** (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4851–4861.
- 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).
- 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, 897–904.
- Ávila-Lara A. I., Camberos-Flores J. N., Mendoza-Pérez J. A.** (2015) Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of Agave bagasse by response surface methodology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 1–10.
- Bahl, K., Miyoshi, T., & Jana, S. C.** (2014). Hybrid fillers of lignin and carbon black for lowering of viscoelastic loss in rubber compounds. 55, 3825–3835.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J. S., Hodge, D. B., & Walton, J. D.** (2011). Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: Effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 1–15.
- Barana, D., Salanti, A., Orlandi, M., Ali, D. S., Zoia, L.** (2016). Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*, 86, 31–39.
- Bautista-Justo M., García-Oropeza, J., Barboza-Corona L.** (2001). EL Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta universitaria*, 2, 26-34.
- Buratti, C., Foschini, D., Barbanera, M., Fantozzi, F.** (2018). Fermentable sugars production from peach tree prunings: Response surface model optimization of NaOH alkaline pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 112, 128–137.
- Carrillo J., Razo E., Celis B.,** (2016). "Biotecnología: Biocombustibles". 2da Edición. 216-231.
- Carvajal, J. C., Gómez, Á., Cardona, C. A.** (2016). Comparison of lignin extraction processes: Economic and environmental assessment. *Bioresource Technology*, 214, 468–476.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Gírio, F. M.** (2008). Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, 849–864.
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., Martínez, A.** (2014). Enzymatic

hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286.

Chávez, M., & Domine, M. (2013). *Lignin, structure and applications: Depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. Avances en Ciencias e Ingeniería* (Vol. 4).

Chen, C., Jin, D., Ouyang, X., Zhao, L., Qiu, X., Wang, F. (2018). Effect of structural characteristics on the depolymerization of lignin into phenolic monomers. *Fuel*, 223, 366–372.

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160, 196–206.

Cheng, H. H., Whang, L. M., Chung, M. C., Chan, K. C. (2016). Biological hydrogen and methane production from bagasse bioethanol fermentation residues using a two-stage bioprocess. *Bioresource Technology*, 210, 49–55.

Cheng, G., Varanasi, P., Li, C., Liu, H., Melnichenko, Y. B., Simmons, B. A., Singh, S. (2011). Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules*, 12, 933–941.

Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2012. Estadísticas oficiales de producción de tequila y consumo de agave en el periodo 2012-20161. <http://www.crt.org.mx>. (Consultado enero, 2018).

Córdiba Bolaños, R. G., Cultid Chamorro, G. R. (2015). Estudio comparativo de la actividad enzimática de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) de "Pleurotus ostreatus" cultivado en residuos lignocelulósicos de raquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café. Trabajo de grado. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto.

Costa-Correia, J. A., Júnior, J. E. M., Gonçalves, L. R. B., & Rocha, M. V. P. (2013). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. *Bioresource Technology*, 139, 249–256.

Cybulska, I., Brudecki, G. P., Zembrzuska, J., Schmidt, J. E., Lopez, C. G. B., Thomsen, M. H. (2017). Organosolv delignification of agricultural residues (date palm fronds, *Phoenix dactylifera* L.) of the United Arab Emirates. *Applied Energy*, 185, 1040–1050.

Deuss, P. J., & Barta, K. (2016). From models to lignin: Transition metal catalysis for selective bond cleavage reactions. *Coordination Chemistry Reviews*, 306, 510–532.

Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkjane, V., Viesturs, U. (2004). Characterization of the radical scavenging activity of lignins - Natural antioxidants. *Bioresource Technology*, 95, 309–317.

Dong, X., Dong, M., Lu, Y., Turley, A., Jin, T., & Wu, C. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 34, 1629–1634.

DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

Esau K. 1985. *Anatomía Vegetal*. 3ra edición. Ediciones OMEGA, S.A., Barcelona.

- Espino, E., Cakir, M., Domenek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., & Bras, J.** (2014). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of *Agave tequilana* and barley. *Industrial Crops and Products*, *62*, 552–559.
- Fernández-Rodríguez, J., Gordobil, O., Robles, E., González-Alriols, M., Labidi, J.** (2017). Lignin valorization from side-streams produced during agricultural waste pulping and total chlorine free bleaching. *Journal of Cleaner Production*, *142*, 2609–2617.
- Galindo-Hernández, K. L., Tapia-Rodríguez, A., Alatraste-Mondrag, F., Celis, L. B., Arreola-Vargas, J., & Razo-Flores, E.** (2018). Enhancing saccharification of *Agave tequilana* bagasse by oxidative delignification and enzymatic synergism for the production of hydrogen and methane. *Luis J. Jiménez* No. 78216, 2–11.
- Ge, Y., Qin, L., Li, Z.** (2016). Lignin microspheres: An effective and recyclable natural polymer-based adsorbent for lead ion removal. *Materials and Design*, *95*, 141–147.
- Gomez Rengifo, V. E., Velásquez Jiménez, J. A., Quintana Marín, G. C.** (2013). Lignina como adsorbente de metales pesados. *Revista Investigaciones Aplicadas*, *7*, 74–85.
- González-Sánchez, M. E., Pérez-Fabiel, S., Wong-Villarreal, A., Bello-Mendoza, R., Yañez-Ocampo, G.** (2015). Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*, *47*, 229–235.
- Gosselink, R. J. A., Teunissen, W., van Dam, J. E. G., de Jong, E., Gellerstedt, G., Scott, E. L., Sanders, J. P. M.** (2012). Lignin depolymerisation in supercritical carbon dioxide/acetone/water fluid for the production of aromatic chemicals. *Bioresource Technology*, *106*, 173–177.
- Grassino S.** (2018). Calorimetría diferencial de barrido. Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.pslc.ws/spanish/dsc.htm>. (Consultado, Marzo, 2018).
- Gregorova, A.** (2013). Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers. *Intech*, 3–20.
- Gurgel, L. V. A., Pimenta, M. T. B., Curvelo, A. A.** (2016). Ethanol–water organosolv delignification of liquid hot water (LHW) pretreated sugarcane bagasse enhanced by high–pressure carbon dioxide (HP–CO₂). *Industrial Crops and Products*, *94*, 942–950.
- Gutiérrez-Hernández, J. M., Escalante, A., Murillo-Vázquez, R. N., Delgado, E., González, F. J., Toríz, G.** (2016). Use of *Agave tequilana*-lignin and zinc oxide nanoparticles for skin photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *163*, 156–161.
- He, W., Gao, W., & Fatehi, P.** (2017). Oxidation of Kraft Lignin with Hydrogen Peroxide and its Application as a Dispersant for Kaolin Suspensions. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *5*, 10597–10605.
- Hernández Yzarra, Á. E.** (2007). Precipitación de lignina a partir de licores negros nacionales. Proyecto de grado. Universidad Simón Bolívar.
- Hossain, M. M., Scott, I. M., McGarvey, B. D., Conn, K., Ferrante, L., Berruti, F., Briens, C.** (2015). Insecticidal and anti-microbial activity of bio-oil derived from fast pyrolysis of lignin, cellulose, and hemicellulose. *Journal of Pest Science*, *88*, 171–179.
- 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*, 25–32.
- Iñiguez, C. G., Bernal, C. J. J., Ramírez, M. W., Villalvazo, N. J.** (2014). Recycling *Agave*

Bagasse of the Tequila Industry. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 04, 135–142.

Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 6, 4497–4559.

Jang, S. K., Kim, H. Y., Jeong, H. S., Kim, J. Y., Yeo, H., Choi, I. G. (2016). Effect of ethanol organosolv pretreatment factors on enzymatic digestibility and ethanol organosolv lignin structure from *Liriodendron tulipifera* in specific combined severity factors. *Renewable Energy*, 87, 599–606.

Kalliola, A., Vehmas, T., Liitiä, T., Tamminen, T. (2015). Alkali-O₂ oxidized lignin -A bio-based concrete plasticizer. *Industrial Crops & Products*, 74, 150–157.

Kang, X., Sun, Y., Li, L., Kong, X., Yuan, Z. (2018). Improving methane production from anaerobic digestion of Pennisetum Hybrid by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, 255, 205–212.

Kerley, M. S., Garleb, K. A., Fahey, G. C., Berger, L. L., Moore, K. J., Phillips, G. N., Gould, J. M. (1988). Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment of cotton and wheat straw on cellulose crystallinity and on composition and site and extent of disappearance of wheat straw cell wall phenolics and monosaccharides by sheep. *Journal of Animal Science*, 66, 3235–3244.

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.

Keys, J. E., Van Soest, P. J., & Young, E. P. (1969). Comparative study of the digestibility of forage cellulose and hemicellulose in ruminants and nonruminants. *Journal of Animal Science*, 29, 11–15.

Khare, S. K., Pandey, A., Larroche, C. (2015). Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 102, 38–44.

Kim, I., & Han, J. (2012). Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. *Biomass and Bioenergy*, 46, 210–217.

Kim, J. S., Lee, Y. Y., Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42–48.

Kohlstedt, M., Starck, S., Barton, N., Stolzenberger, J., Selzer, M., Mehlmann, K., Wittmann, C. (2018). From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering*, 47, 279–293.

Konduri, M. K. R., & Fatehi, P. (2018). Designing anionic lignin based dispersant for kaolin suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 639–650.

Kun, D., & Pukánszky, B. (2016). Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. *European Polymer Journal*, 93, 618–641.

Lange, H., Schiffels, P., Sette, M., Sevastyanova, O., & Crestini, C. (2016). Fractional Precipitation of Wheat Straw Organosolv Lignin: Macroscopic Properties and Structural Insights. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4, 5136–5151.

Li, X., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A. J., Klett, A. S., Thies, M., & Zheng, Y. (2018). Inhibitory effects of lignin on enzymatic hydrolysis: The role of lignin chemistry and molecular

weight. *Renewable Energy*, 123, 664–674.

Li, X., & Zheng, Y. (2017). Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnology Advances*, 35, 466–489.

Liu, Y., Ge, S., Li, Y., Li, B., & Li, H. (2018). Oxalate formation during hydrogen peroxide-reinforced oxygen delignification. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 58, 45–50.

Lotfi, S., Mollaabbasi, R., & Patience, G. S. (2018). Kinetics of softwood kraft lignin inert and oxidative thermolysis. *Biomass and Bioenergy*, 109, 239–248.

Lourençon, T. V., Hansel, F. A., Da Silva, T. A., Ramos, L. P., De Muniz, G. I. B., Magalhães, W. L. E. (2015). Hardwood and softwood kraft lignins fractionation by simple sequential acid precipitation. *Separation and Purification Technology*, 154, 82–88.

Ma, R., Guo, M., Zhang, X. (2017). Recent advances in oxidative valorization of lignin. *Catalysis Today*, 302, 50–60.

Macorra-García, C., Brizard, A., Rincón, P., Sánchez, R. (2004). Estudio cinético de la descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones de extrema alcalinidad. *Tecnología y desarrollo*, 2.

Mancini, G., Papirio, S., Riccardelli, G., Lens, P. N. L., Esposito, G. (2018). Trace elements dosing and alkaline pretreatment in the anaerobic digestion of rice straw. *Bioresource Technology*, 247, 897–903.

Mansouri, N. E., & Salvadó, J. (2006). Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and Products*, 24, 8–16.

Mattinen, M. L., Valle-Delgado, J. J., Leskinen, T., Anttila, T., Riviere, G., Sipponen, M., Österberg, M. (2018). Enzymatically and chemically oxidized lignin nanoparticles for biomaterial applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 111, 48–56.

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J. P., & Carrère, H. (2014). Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 32, 934–951.

Montiel Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, 249, 334–341.

Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 888–903.

Munguia-Aguilar, D. (2016). Deslignificación penca de Agave tequilana alcalino como pretratamiento para la producción de biohidrógeno. Tesis de maestría. *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C, SLP, México.*

Niño, L., Cárdenas Lilibeth, A. Z. A., Gelves, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Facultad de Ingeniería*, 317–326.

Owolabi, A. F., Haafiz, M. K. M., Hossain, S., Hussin, M. H., Fazita, M. R. N. (2017). International Journal of Biological Macromolecules Influence of alkaline hydrogen peroxide pre-hydrolysis on the isolation of microcrystalline cellulose from oil palm fronds. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 95, 1228–1234.

Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K. L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J. A., Razo-Flores, E. (2017). Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 1–19.

Pan, X., Kadla, J. F., Ehara, K., Gilkes, N., & Saddler, J. N. (2006). Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5806–5813.

Park, J., Riaz, A., Insyani, R., & Kim, J. (2018). Understanding the relationship between the structure and depolymerization behavior of lignin. *Fuel*, 217, 202–210.

Park S., Baker J.O., Himmel M., Parilla P. A., Johnson D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 1–10.

Parthasarathy, V.R., Klein, R., Tappi J. 73 (1990) 177.

Pérez-Denicia, E., Fernández-Luqueño, F., Vilarriño-Ayala, D., Montaña-Zetina, M. L., Maldonado-López, A. L. (2017). Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 597–613.

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.

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.

Ponce, C., Chanona, J., Garibay, V., Palacios, E., Calderon, G., Sabo, R. (2013). Functionalization of agave cellulose nanoparticles and its characterization by microscopy and spectroscopy techniques. *Microsc. Microanal.* 19, 200–201.

Prado, R., Erdocia, X., & Labidi, J. (2013). Lignin extraction and purification with ionic liquids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 1248–1257.

Quesada-González, O. (2011). Estudio de la degradación térmica del residuo de la naranja. *Revista Cubana de Química XXIII*, 25–33.

Rabelo, S. C., Amezquita Fonseca, N. A., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., Costa, A. C. (2011). Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 35, 2600–2607.

Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R., & Costa, A. C. (2014). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel*, 136, 349–357.

Ramírez Franco, J. H., & Enríquez Enríquez, M. K. (2015). Remoción de plomo (II) usando lignina obtenida a partir del procesamiento del seudotallo de plátano. *Acta Agronomica*, 64, 209–213.

Ren, Y., Luo, Y., Zhang, K., Zhu, G., Tan, X. (2008). Lignin terpolymer for corrosion inhibition of mild steel in 10% hydrochloric acid medium. *Corrosion Science*, 50, 3147–3153.

- Rosli, N.A., Ahmad, I., Abdullah, I.** (2013). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from *Agave angustifolia* fibre. *BioResources* 8, 1893–1908.
- Rossberg, C., Bremer, M., Machill, S., Koenig, S., Kerns, G., Boeriu, C., Fischer, S.** (2015). Separation and characterisation of sulphur free lignin from different agricultural residues. *Industrial Crops and Products*, 73, 81–89.
- Saini, J. K., Patel, A. K., Adsul, M., Singhania, R. R.** (2016). Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renewable Energy*, 98, 29–42.
- Sammons, R. J., Harper, D. P., Labbé, N., Bozell, J. J., Elder, T., Rials, T. G.** (2013). Characterization of organosolv lignins using thermal and FT-IR spectroscopic analysis. *BioResources*, 8, 2752–2767.
- Sandoval, A., Rodríguez, E., Fernández, A.** (2005). Aplicación del Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón, 72, 45–53.
- Scalbert, A., Monties, B.** (1986). Comparison of wheat straw lignin preparations. II. Straw lignin solubilisation in alkali. *Holzforschung*, 40: 249-254.
- Shahabazuddin, M., Sarat Chandra, T., Meena, S., Sukumaran, R. K., Shetty, N. P., & Mudliar, S. N.** (2018). Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. *Bioresource Technology*, 263, 199–206.
- Shen, G., Tao, H., Zhao, M., Yang, B., Wen, D., Yuan, Q., & Rao, G.** (2011). Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Food Process Engineering*, 34, 905–921.
- 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 Bioproducts Processing*, 94, 322–330.
- Sun, F. F., Tang, S., Liu, R., Tang, Y., Wang, R., Zhang, Z., Xiao, Z.** (2016). Biorefining fractionation of the *Camellia oleifera* Abel. hull into diverse bioproducts with a two-stage organosolv extraction. *Industrial Crops and Products*, 94, 790–799.
- Sun, R. C., Fang, J. M., & Tomkinson, J.** (2000). Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. *Industrial Crops and Products*, 12, 71–83.
- Sun, R., Lawther, J. M., Banks, W. B., & Xiao, B.** (1997). Effect of extraction procedure on the molecular weight of wheat straw lignins. *Industrial Crops and Products*, 6, 97–106.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K.** (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1621-1651.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I.** (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 4744–4753.
- Tejado, A., Peña, C., Labidi, J., Echeverria, J. M., Mondragon, I.** (2007). Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*, 98, 1655–1663.
- Thakur, V. K., Thakur, M. K., Raghavan, P., Kessler, M. R.** (2014). Progress in green polymer composites from lignin for multifunctional applications: A review. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2, 1072–1092.

- Toledo-Cervantes, A., Arreola-Vargas, J., Elias-Palacios, S. V., Marino-Marmolejo, E. N., Davila-Vazquez, G., González-Álvarez, V., Méndez-Acosta, H. O.** (2018). Evaluation of semi-continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Insight into the enzymatic cocktail effect over the co-production of methane. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2–10.
- Trabal, E.** (1974). Estabilidad y descomposición de las disoluciones de peróxido de hidrógeno. *Fortec S.A.*, 7–17.
- Trache, D., Hussin, M. H., Tan, C., Chuin, H., Sabar, S., Fazita, M. R. N., Haafiz, M. K. M.** (2016). International Journal of Biological Macromolecules Microcrystalline cellulose : Isolation , characterization and bio-composites application — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 789–804.
- Vega Quintana, M. A.** (2012). Aprovechamiento integral del bagazo de la piña de Agave tequilana Weber : Caracterización de fracciones lignocelulósicas obtenidas por un proceso organosolv. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, México.
- Velázquez-Valadez, U., Farías-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*, 998–1004.
- Wang, G., & Chen, H.** (2013). Fractionation of alkali-extracted lignin from steam-exploded stalk by gradient acid precipitation. *Separation and Purification Technology*, 105, 98–105.
- 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.
- Xin-Ping, O., You-dan, T. A. N., Xue-qing, Q. I. U.** (2014). Oxidative degradation of lignin for producing monophenolic compounds. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 42, 677–682.
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., & Wang, D.** (2013). Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, 104, 801–809.
- Yamashita, Y., Shono, M., Sasaki, C., & Nakamura, Y.** (2010). Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydrate Polymers*, 79, 914–920.
- Yuan, Z., Wen, Y., Kapu, N. S.** (2018). Ethanol production from bamboo using mild alkaline pre-extraction followed by alkaline hydrogen peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 247, 242–249.
- Yuan, Z., Wen, Y., Li, G.** (2018). Production of bioethanol and value added compounds from wheat straw through combined alkaline/alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 259, 228–236.
- Zhao, X., Cheng, K., & Liu, D.** (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 815–827.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y.** (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35–53.

Anexos

Anexo 1. Análisis por calorimetría diferencial de barrido

En la Figura A1 se puede apreciar una curva de DSC donde se muestran las tres temperaturas que puede presentar un polímero.

Los polímeros amorfos exhiben una temperatura de transición vítrea (T_g) que se induce por el cambio de temperatura de un polímero amorfo vítreo a un estado progresivamente gomoso cuando se calienta (Sandoval et al., 2005). En la T_g , la movilidad segmentaria de las cadenas moleculares aumenta y un polímero es más elástico y flexible (Gregorova 2013). Adicional a esta, existen otras dos temperaturas que se pueden manifestar en los polímeros. Por encima de la transición vítrea, los polímeros poseen una gran movilidad, pero cuando alcanzan la temperatura adecuada, han ganado la suficiente energía como para adoptar una posición sumamente ordenada, a estos polímeros se les conoce como cristalinos y a la temperatura a la cual el polímero alcanza su forma cristalina se le conoce como temperatura de cristalización (T_c). Si se sigue calentando al polímero más allá de su T_c , finalmente se llega a otra transición térmica que se denomina fusión. Cuando un polímero alcanza su temperatura de fusión, o T_m , los cristales poliméricos comienzan a separarse, es decir, se funden. Las cadenas abandonan sus arreglos ordenados y comienzan a moverse libremente (Grassino, 2018)

Para el caso de este estudio, debido a que la lignina es un polímero amorfo, solo se determinó la temperatura de transición vítrea para las ligninas obtenidas del bagazo de agave a diferentes pretratamientos. Debido a que el cambio en la capacidad calorífica (flujo de calor) no ocurre repentinamente, sino que tiene lugar a través de un rango de temperaturas hace que resulte complicado escoger una T_g discreta. Generalmente se toma como T_g , al punto medio de la región inclinada (Figura A1) (Grassino, 2018).

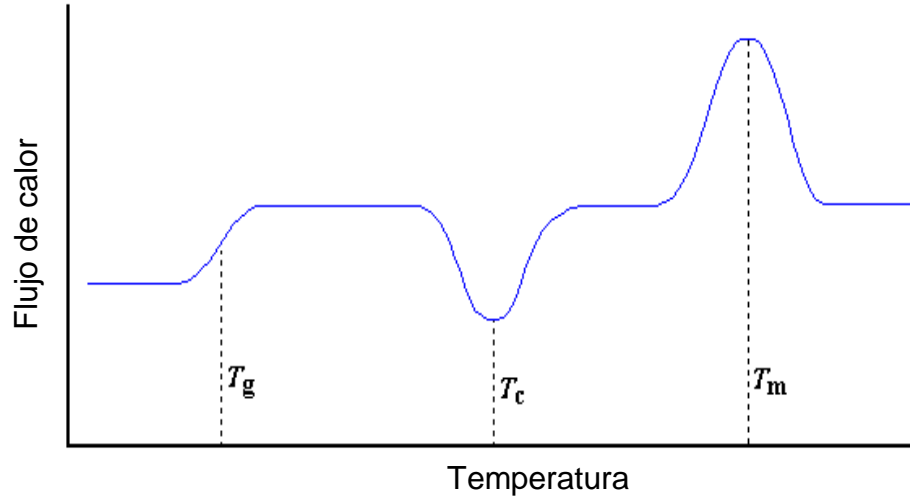
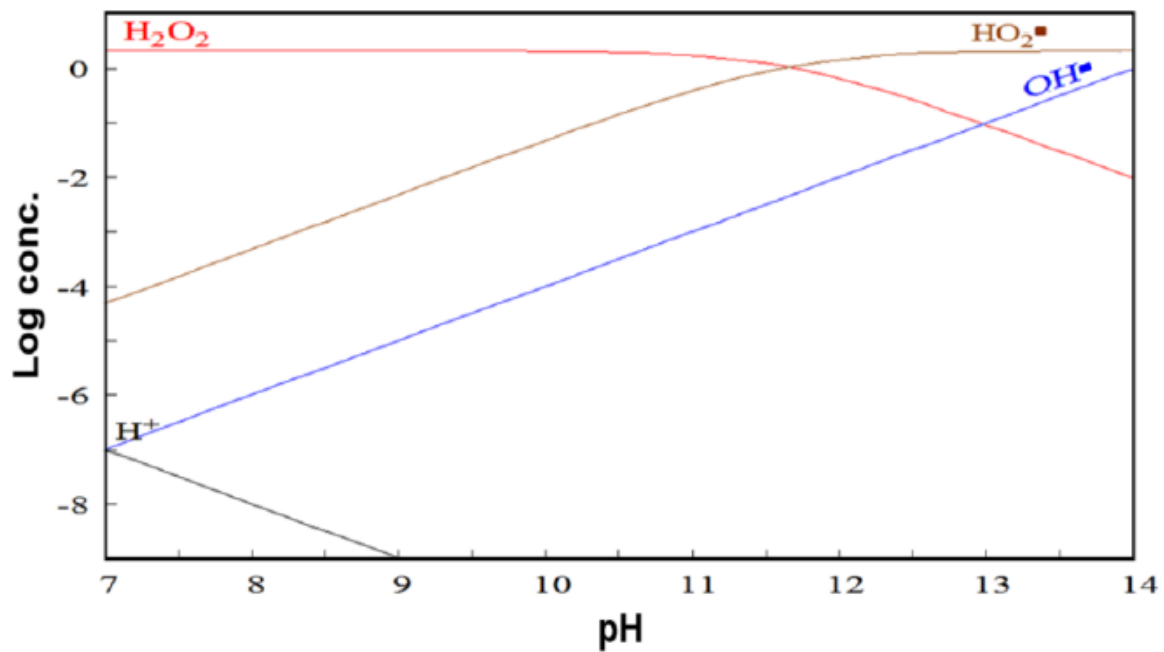


Figura A1. Curva de DSC para un polímero con dominios cristalinos y amorfos (Grassino, 2018)

Anexo 2. Diagrama de especiación del PH (Munguía-Aguilar, 2016)



Anexo 3. Actividades enzimáticas para Celluclast 1.5L, Viscozyme L y Stonezyme.

Enzima	Proteína (mg/mL)	Celulasa (FPU/mL)	1,4-β- endoglucanasa (EGU/mL)	β- glucosidasa (U/mL)	Xilanasa (U/mL)
Celluclast 1.5L	32.45	46.028	177.94	0.72	740
Viscozyme L	18.9	2	211.92	0.74	195
Stonezyme	36.52	44.53	560.42	6.19	13312

Anexo 4. Tabla de Anova generada para la variable de respuesta remoción de lignina (%)

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P	Correlación	Contribución (%)
Modelo	49.07	3	16.36	132.75	0.0002		
A-[H ₂ O ₂]	40.44	1	40.44	328.23	0.0030	0.910	71.45
B-Temperatura	3.92	1	3.92	31.79	0.03	0.234	6.92
C-Tamaño	4.71	1	4.71	38.23	0.0252	0.228	8.32
AB	0.23	1	0.23	1.87	0.3051		0.41
AC	1.24	1	1.24	10.03	0.0869		2.18
BC	0.56	1	0.56	4.58	0.1657		1.00
ABC	1.19	1	1.19	9.66	0.0898		2.10

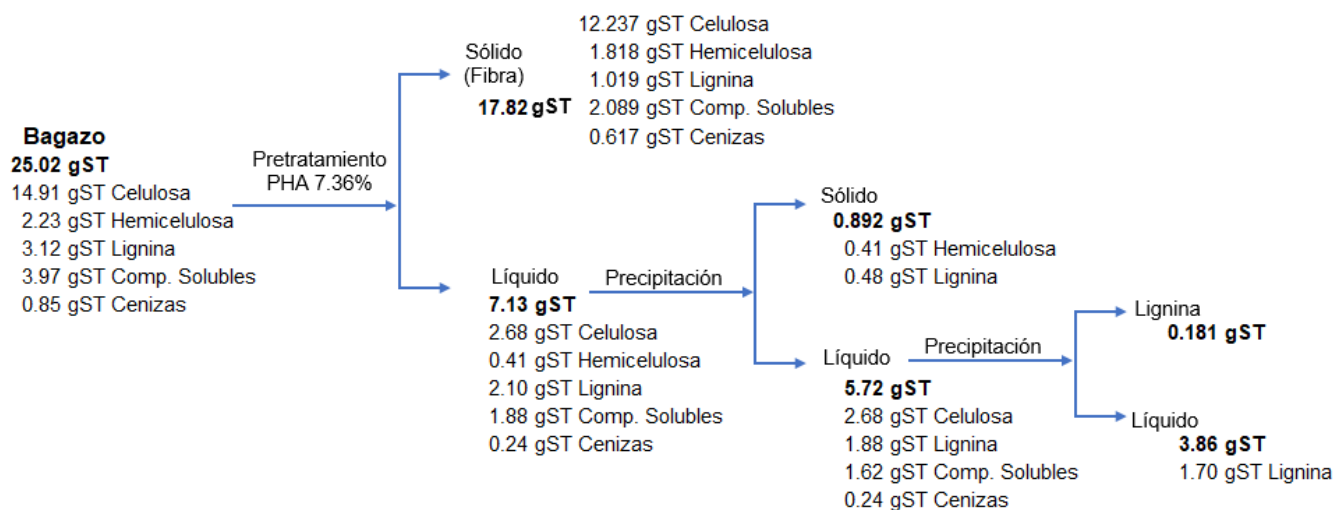
$R^2 = 0.9901$

R^2 ajustada = 0.9826

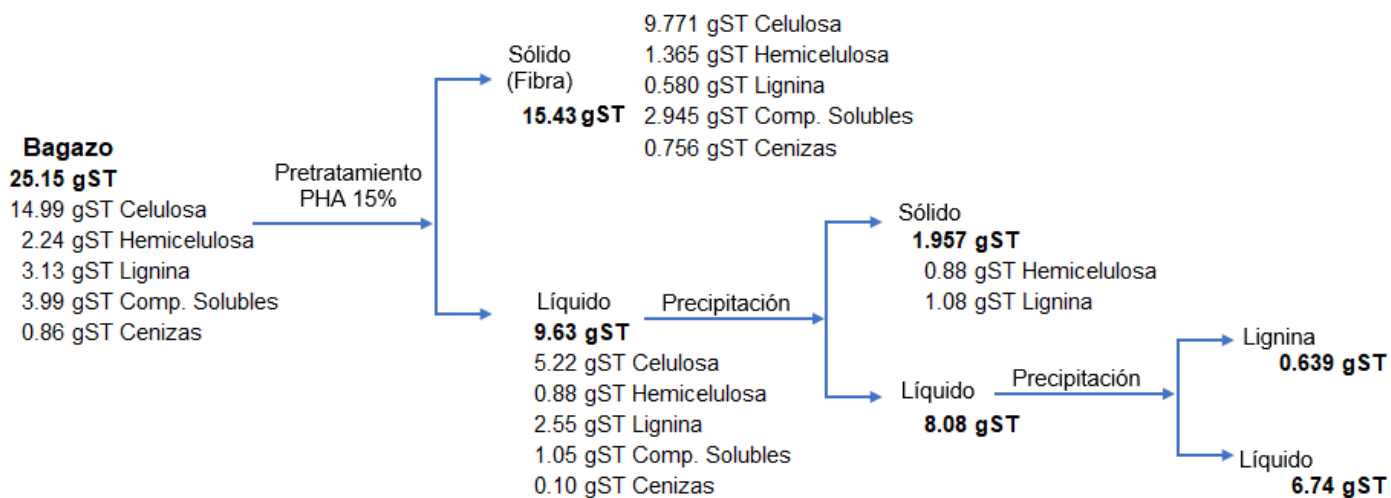
Modelo: Remoción = $-10.84403 + 2.23325 * A + 0.24315 * B + 4.08847 * C - 0.031448 * A * B - 0.54731 * A * C - 0.069371 * B * C + 0.010890 * A * B * C$

Anexo 5. Balances de masa de los pretratamientos

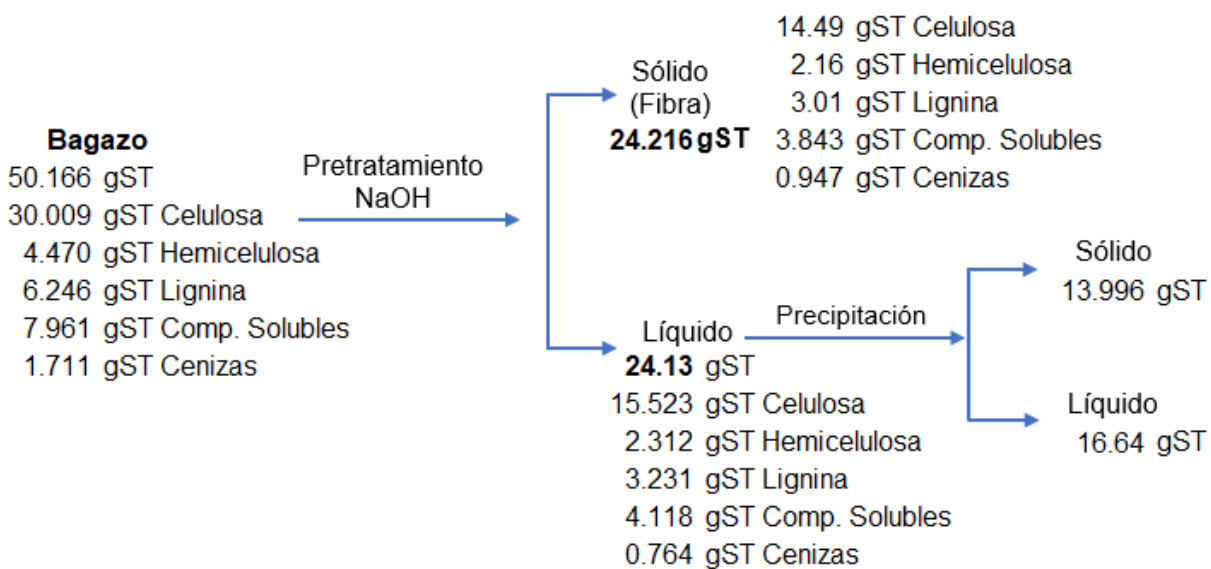
Anexo 5a. Balance de masa para el pretratamiento de PHA a una concentración del 7.36%.



Anexo 5b. Balance de masa para el pretratamiento de PHA a una concentración del 15%.



Anexo 5c. Balance de masa para el PA.



Anexo 6. EDS correspondiente a las microfografías de la Figura 3.7

