



IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Efecto de la composición de diferentes
hidrolizados enzimáticos a partir de bagazo de
agave sobre la eficiencia en la producción de
hidrógeno**

Tesis que presenta

Paola Janet Delgado Espitia

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosi, S.L.P., Enero de 2021

Constancia de aprobación de tesis

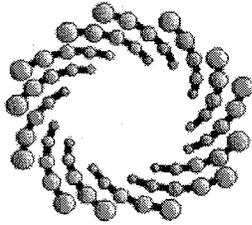


Créditos institucionales

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. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (932321), del Clúster Biocombustibles Gaseosos 247006 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

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



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 091 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 11 días del mes de enero del año 2021, se reunió a las 09:40 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Paola Janet Delgado Espitia

sobre la Tesis intitulada:

Efecto de la composición de diferentes hidrolizados enzimáticos a partir de bagazo de agave sobre la eficiencia en la producción de hidrógeno

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Elías Razo Flores

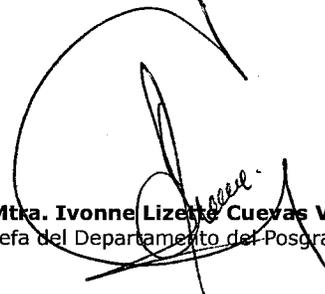
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:00 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 11 días del mes de enero de 2021.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



*A todas esas personas que han ido apareciendo en este viaje
llamado vida y de alguna u otra forma han contribuido en el
desarrollo de la persona que hoy soy.*

*A todas esas niñas y mujeres que sueñan con hacer ciencia y
contribuir en la creación de un mundo mejor.*

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme seguir mis sueños, por haberme dado la fuerza y perseverancia necesaria cuando quería darme por vencida, gracias por mostrarme que no existen los imposibles, con su ayuda y con la ciencia, todo es posible.

A mi familia; a mis padres por haberme criado con la idea de que cada día puedo ser mejor y que nunca debo conformarme, por siempre apoyarme y haberme acompañado en este camino, gracias por enseñarme que siempre debo perseguir mis sueños; a mis enanos Rubén y Dalí porque ellos siempre me han motivado a ser una mejor persona y estudiante, y así poder ser un ejemplo para ellos. Gracias a Jesús por su apoyo incondicional. Sus palabras de aliento y enseñanzas que me han hecho crecer cada vez más como persona. Gracias por seguir motivarme a seguir luchando y enseñarme que el límite no existe.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por permitirme crecer como investigadora. Agradezco al Dr. Elías Razo Flores por brindarme la oportunidad de trabajar con él, por todos sus consejos a lo largo de la investigación. Su apoyo y confianza fueron claves en la elaboración de este trabajo.

A mi comité tutorial por enseñarme, aconsejarme e instruirme en el camino del buen estudiante, por darme su apoyo y su comprensión en los momentos difíciles, ellos siempre estaban dispuestos a ayudar en los momentos más duros sin pedir nada a cambio.

A todos y cada uno de los maestros y técnicos docentes, que fueron parte de mi formación y contribuyeron de diferentes formas para desarrollar este proyecto. Especialmente a la M. en C. Karen Lizeth Galindo Hernández y al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar. Al grupo de trabajo del Clúster Biocombustibles Gaseosos por su apoyo y colaboración a lo largo de esta investigación. De forma especial agradezco a Rodolfo Palomo y Virginia Montiel por sus importantes aportaciones y comentarios que lograron mejorar mi trabajo.

A todas esas personitas que Dios puso en mi camino de una forma u otra y formaron parte de este logro, a mis compañeros: Pao, Lore, Rouse, Edith y Vic, gracias por esas largas jornadas de estudio, por siempre motivarnos unos a otros y nunca dejarnos vencer.

A mis amigos e incondicionales: Tessa, Clau, Sandra, Alexa, Ricardo, Lili, Dani, Cass, Pau y Dulce por darme ese apoyo extra que necesitaba y recordarme siempre que puedo lograr lo que quiera ser. Gracias por lograr hacer de San Luis Potosí mi segundo hogar.

Contenido

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Agradecimientos	v
Contenido	vii
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1 Introducción	1
1.1 El hidrógeno como alternativa energética.	1
1.2 Bagazo de agave y tratamientos enzimáticos	2
1.3 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos en reactores continuos	8
1.4 Asimilación de diferentes carbohidratos en la fermentación oscura.	11
2 Justificación, hipótesis y objetivos	14
2.1 Justificación	14
2.2 Hipótesis	14
2.3 Objetivo General	15
2.4 Objetivos Específicos	15
3 Materiales y métodos	16
3.1 Obtención y preparación del bagazo de agave	16
3.2 Hidrólisis enzimática	16
3.3 Inóculo y medio mineral	18
3.4 Ensayos de producción de hidrógeno en lote	19
3.5 Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos.	19
3.6 Efecto de la composición de los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno a partir de azúcares grado reactivo.	21
3.7 Efecto de la relación glucosa:xilosa en la producción de hidrógeno.	22

3.8	Evaluación de los azúcares individuales presentes en los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno.	23
3.9	Métodos analíticos.	24
3.10	Análisis cinético y estadístico.	24
4	Resultados y discusión	27
4.1	Caracterización de los hidrolizados enzimáticos	27
4.2	Cinética de producción de hidrógeno con los hidrolizados enzimáticos: consumo de azúcares específicos	31
4.3	Efecto de la composición de los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno a partir de azúcares grado reactivo	42
4.4	Efecto de la relación glucosa:xilosa en la producción de hidrógeno	48
4.5	Evaluación de los azúcares individuales presentes en los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno	52
4.6	Comparación de la producción de H ₂ a partir de los hidrolizados enzimáticos en procesos continuos	60
5	Conclusiones y perspectivas	64
5.1	Conclusiones	64
5.2	Perspectivas	66
	REFERENCIAS	67
	ANEXOS	73

Lista de Tablas

Tabla 1. Condiciones de operación y resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática del bagazo de agave.	7
Tabla 2. Resultados para la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.	9
Tabla 3. Condiciones de operación para la hidrolisis enzimática del bagazo de agave	17
Tabla 4. Relaciones Glucosa-Xilosa empleadas para la producción de hidrógeno en lote	23
Tabla 5. Caracterización de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos a partir de diferentes preparaciones enzimáticas	27
Tabla 6. Composición de los hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de bagazo de agave determinada por HPLC	29
Tabla 7. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz con los diferentes hidrolizados enzimáticos	35
Tabla 8. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz de los diferentes ensayos en los que se replica la composición de Celluclast 1.5 L – Viscozyme y Stonezyme	44
Tabla 9. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz para las diferentes relaciones glucosa-xilosa	51
Tabla 10. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz para los diferentes azúcares evaluados.	54

Lista de Figuras

- Figura 1.** Distribución de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la biomasa lignocelulósica. Adaptado de Wang et al. 2017). 3
- Figura 2.** Representación de la hidrólisis de la celulosa por la acción de las celulasas. Tomado de Sajith et al., (2016). 4
- Figura 3.** Representación de la hidrólisis de la hemicelulosa por la acción de las hemicelulasas. Adaptado de Madadi et al., (2017). 5
- Figura 4.** Vías fermentativas de monosacáridos derivados de hemicelulosa en *E. coli* , *Z. mobilis* , *S. cerevisiae* y *P. stipitis*. Tomado de Gírio et al. (2010). 11
- Figura 5.** Esquema de la botella empleada en los experimentos en lote. A: Motor, B: Agitador; C: Extensión para toma de muestra, D: Abrazadera de tubo de 4.5 mm, E: Puerto para toma de muestra, F: Salida del gas. 20
- Figura 6.** Producción de hidrógeno y consumo de azúcares en lote con diferentes hidrolizados. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L -Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL – Viscozyme (d), Stonezyme (e). La línea continua corresponde al modelo de Gompertz para la producción de H₂ de cada tratamiento. 32
- Figura 7.** Consumo de azúcares específicos durante la producción de hidrógeno en lote a partir de diferentes hidrolizados enzimáticos. 37
- Figura 8.** Cinética de producción de AGV en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL – Viscozyme (d), Stonezyme (e). 39
- Figura 9.** Perfil de contribución de DQO en la producción de H₂ en lote empleando los hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL – Viscozyme (d), Stonezyme (e). 40
- Figura 10.** Comparación de la producción de hidrógeno y el consumo de azúcares entre los hidrolizados enzimáticos y los hidrolizados sintéticos. Celluclast 1.5 L – Viscozyme (a), Celluclast – Viscozyme^{Sintético} (b), Stonezyme (c) y Stonezyme^{Sintético} (d) 42

- Figura 11.** Comparación de la cinética de producción de AGV a partir de los hidrolizados enzimáticos y los ensayos en los que se simula su composición a partir de azúcares grado reactivo. Celluclast 1.5 L – Viscozyme (a), Celluclast 1.5 L- Viscozyme^{Sintético} (b), Stonezyme (c), Stonezyme^{Sintético} (d) 47
- Figura 12.** Efecto de la relación glucosa-xilosa en la producción de hidrógeno. (a) 0:1, (b) 2:1 (c) 3.75:1, (d) 5.5:1, (e) 9:1, (f) 1:0. Producción de hidrógeno (●). Consumo de azúcares totales (●). 49
- Figura 13.** Producción de hidrógeno a partir de los azúcares individuales (grado reactivo) presentes en los hidrolizados enzimáticos. (a) celobiosa; (b) glucosa (◆), fructosa (◆) y galactosa (◇); (c) xilosa (▲) y arabinosa (▲); (d) sorbitol. 52
- Figura 14.** Balance de electrones en la producción de hidrógeno de los diferentes componentes de los hidrolizados enzimáticos. Glucosa (a), Celobiosa (b), Xilosa (c), Galactosa (d), Fructosa (e), Sorbitol (f) 55
- Figura 15.** Comparación de las diferentes velocidades volumétricas de producción de hidrógeno obtenidas con los sustratos evaluados (hidrolizados y azúcares puros). 56
- Figura 16.** Relación entre la composición de los hidrolizados enzimáticos y su VVPH. 58
- Figura 17.** Velocidad volumétrica de producción de H₂ obtenida empleando diferentes cargas orgánicas volumétricas de azúcares totales en sistemas continuos de tanque agitado a partir de los hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (●), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (●), Cellulase 50 XL (●), Cellulase 50 XL – Viscozyme (●) y Stonezyme (●) 60

Abreviaturas

AGV	Ácidos grasos volátiles
AMPTS II	Sistema automático de prueba de potencial de metano (por sus siglas en inglés, Automatic Methane Potential Test System)
AR	Azúcares reductores
AT	Azúcares totales
ATP	Adenosin trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
CSTR	Reactor de tanque agitado continuo (por sus siglas en inglés, Continuous Stirred-Tank Reactor)
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
DQOs	Demanda química de oxígeno soluble
EGU	Unidades de endoglucanasa por sus siglas en inglés, endoglucanase unit
H _{max}	Volumen máximo acumulado
H ₂	Hidrógeno
UASB	Reactor de flujo ascendente (por sus siglas en inglés, Upflow Anaerobic Sludge Blanket)
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno

Resumen

Recientemente se ha evaluado la hidrólisis enzimática como estrategia para poder aprovechar el alto contenido de azúcares del bagazo de agave en la producción de hidrógeno por fermentación oscura. Sin embargo, se ha observado que una alta concentración de azúcares no es directamente proporcional a altos rendimientos y velocidades volumétricas de producción de H₂. En este trabajo se realizó la caracterización de los azúcares presentes en cinco hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos a partir las enzimas Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL, empleadas de forma individual y en mezcla binaria con Viscozyme, y Stonezyme de manera individual, con la finalidad de evaluar la contribución de los principales carbohidratos presentes en tales hidrolizados en la producción de hidrógeno.

Con base en la caracterización realizada se determinó que los hidrolizados obtenidos a partir de mezclas binarias tienen un aumento en la concentración de azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa del bagazo de agave. Por otro lado, se llevó a cabo la evaluación del efecto en la producción de H₂ de las diferentes relaciones de glucosa y xilosa que se identificaron en los hidrolizados enzimáticos (entre 9:1 y 2:1).

De igual manera, se diseñaron experimentos con hidrolizados enzimáticos sintéticos en donde se replicaron las concentraciones de los azúcares presentes en Celluclast 1.5 L – Viscozyme y Stonezyme, con el fin de evaluar si existe algún factor externo a los azúcares identificados que tenga influencia directa en el proceso de fermentación. En estos ensayos se determinó que debido a las diferencias en la VVPH entre el hidrolizado enzimático y sintético de Celluclast 1.5 L-Viscozyme (4.42 L H₂/L-d y 2.60 L H₂/L-d, respectivamente), probablemente exista una sacarificación y fermentación simultánea durante el proceso de producción de H₂. Esto permitiría explicar la razón por la cual Celluclast 1.5 L-Viscozyme es el hidrolizado enzimático que presenta los mejores resultados en tanto en los sistemas en lote como continuos de producción de H₂.

Palabras clave: Bagazo de agave; hidrógeno; fermentación oscura; hidrolisis enzimática; carbohidratos.

Abstract

Agave bagasse is one of the most important lignocellulosic residues in our country, which has great potential to produce H₂ by dark fermentation given its high content of sugars, which can be released through enzymatic hydrolysis. Although the production of hydrogen with enzymatic hydrolysates has been studied recently, it must be considered that a high concentration of sugars is not directly proportional to high yields and volumetric H₂ production rates. In this work the characterization of the sugars present in five enzymatic hydrolysates of agave bagasse obtained from the enzymes Celluclast 1.5 L and Cellulase 50 XL used individually and in a binary mixture with Viscozyme, and Stonezyme individually, with the purpose of evaluating the contribution of the main carbohydrates present in such hydrolysates in the production of hydrogen.

Based on the characterization carried out, it was determined that the hydrolysates in binary mixtures have an increase in the concentration of sugars present in the hemicellulose fraction of the agave bagasse. In the same way, the evaluation of the effect of the different glucose and xylose ratios that were identified in the enzymatic hydrolysates (between 9: 1 and 2: 1) on the production of H₂ and the determination of whether there was any external factor besides to the identified sugars that have a direct influence on the fermentation process was carried out.

For this reason, synthetic enzymatic hydrolysates were prepared using the concentrations of the sugars previously identified in the characterization of Celluclast 1.5 L-Viscozyme and Stonezyme. In these tests it was determined that due to the differences in VHPR between the enzymatic and synthetic hydrolysate of Celluclast 1.5 L-Viscozyme (4.42 L H₂/L-d and 2.60 L H₂/L-d, respectively), there is probably a simultaneous saccharification and fermentation during the process of H₂ production. This would explain the reason why Celluclast 1.5 L-Viscozyme is the enzymatic hydrolysate that presents the best results in the continuous H₂ production systems previously evaluated.

Keywords: Agave bagasse, hydrogen, dark fermentation, enzymatic hydrolysis, carbohydrates.

1 Introducción

1.1 *El hidrógeno como alternativa energética.*

El hidrógeno (H_2) es un gas altamente reactivo que genera un alto poder calorífico (142.26 kJ/g) durante su combustión, siendo en promedio tres veces mayor a lo proporcionado por combustibles como el gas natural, butano o gasolina (Linares-Hurtado & Moratilla-Soria, 2007). La característica fundamental del H_2 radica en que es un portador de energía y no una fuente energética, de modo que como vector energético este gas permite almacenar y transportar la energía (Fúnez Guerra et al., 2010).

Debido a su contenido energético y a la nula emisión de dióxido de carbono durante su combustión, el H_2 ha recibido gran atención durante la última década. Sin embargo, dado que el 89% del H_2 que se produce en la actualidad proviene de los combustibles fósiles, en especial del reformado de gas natural con vapor (Nong et al., 2015), la adopción del H_2 como combustible requiere del desarrollo de tecnologías de producción limpias y sostenibles. En tal sentido, una economía basada en el hidrógeno podría contribuir a reducir las emisiones de dióxido de carbono y la contaminación atmosférica a largo plazo (Hydrogen Council, 2017).

La producción de H_2 por fermentación oscura es un método atractivo ya que presenta varias características, tales como: bajos requerimientos de energía, mayor velocidad de producción de H_2 , mejor economía de proceso, generación a partir de una amplia gama de sustratos ricos en carbohidratos que representa un menor daño al ambiente en comparación con otros métodos químicos y físicos de producción. (Fisher & Fong, 2014; Palomo-Briones et al., 2018; Raud et al., 2019).

Sin embargo, la fermentación oscura presenta bajos rendimientos de H_2 debidos a la degradación incompleta de la materia orgánica y la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes. Dada la fórmula molecular de la glucosa, la conversión teórica total de 1 mol de glucosa produciría 12 moles de H_2 . Sin embargo, al tener AGV como subproductos del metabolismo de la fermentación el rendimiento se limita a menos del 20% del valor teórico. Cuando se forma acetato se tiene un rendimiento máximo teórico de 4 mol H_2 /mol glucosa_{consumida}, mientras que cuando

se produce de butirato el rendimiento es solo de 2 mol H₂/glucosa_{consumida} (Montiel-Corona & Razo-Flores, 2018).

Este proceso biológico tiene la ventaja que se pueden utilizar diversas materias primas para la generación de H₂, entre estas destacan los residuos agrícolas lignocelulósicos, los cuales son un recurso natural, renovable y económico para la producción rentable de biocombustibles a gran escala. Estos residuos poseen la ventaja de no competir con la demanda alimentaria como es el caso de los biocombustibles de primera generación (Palomo-Briones et al., 2018a).

1.2 Bagazo de agave y tratamientos enzimáticos

Entre los residuos lignocelulósicos de mayor relevancia, ya que pueden ser aprovechados tanto para la producción de bioenergía como para el desarrollo de nuevos materiales se encuentra el bagazo de agave, el cual es un residuo del proceso de producción de tequila. En México en el año 2019 la industria tequilera generó aproximadamente 537,000 toneladas de bagazo de agave, por lo que se presenta como una opción prometedora para la producción de H₂ por fermentación oscura dado su alto volumen de generación y disponibilidad (CRT, 2019; Palomo-Briones et al., 2018a).

El bagazo de agave está compuesto principalmente por tres fracciones: celulosa (31-43% p/p), hemicelulosa (11-22% p/p) y lignina (11-20% p/p) (Arreola-Vargas et al., 2015a; Corona-González et al., 2016; Perez-Pimienta et al., 2016). La celulosa es un polisacárido que consiste en una cadena lineal de varias unidades de D-glucosa unidas por el enlace β (1-4) glucosídico; la hemicelulosa se encuentra recubriendo a las unidades de celulosa, esta fracción en general incluye tres subgrupos principales de componentes: mananos, xilanos y xiloglucanos. Estos constituyentes pueden hidrolizarse en pentosas como xilosa y arabinosa y en hexosas como glucosa, galactosa y manosa (Paz et al., 2019; Zhao et al., 2012). La lignina es un heteropolímero amorfo no carbohidrato que tiene como objetivo evitar la hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa, esto debido a la formación de una hetero-matriz basada en lignina-hemicelulosa que se encuentra formada por la reticulación de enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes en donde las moléculas

de celulosa forman el núcleo interno de la estructura tal como se muestra en la Figura 1 (Baksi et al., 2019; Fisher & Fong, 2014; Kumar et al., 2019).

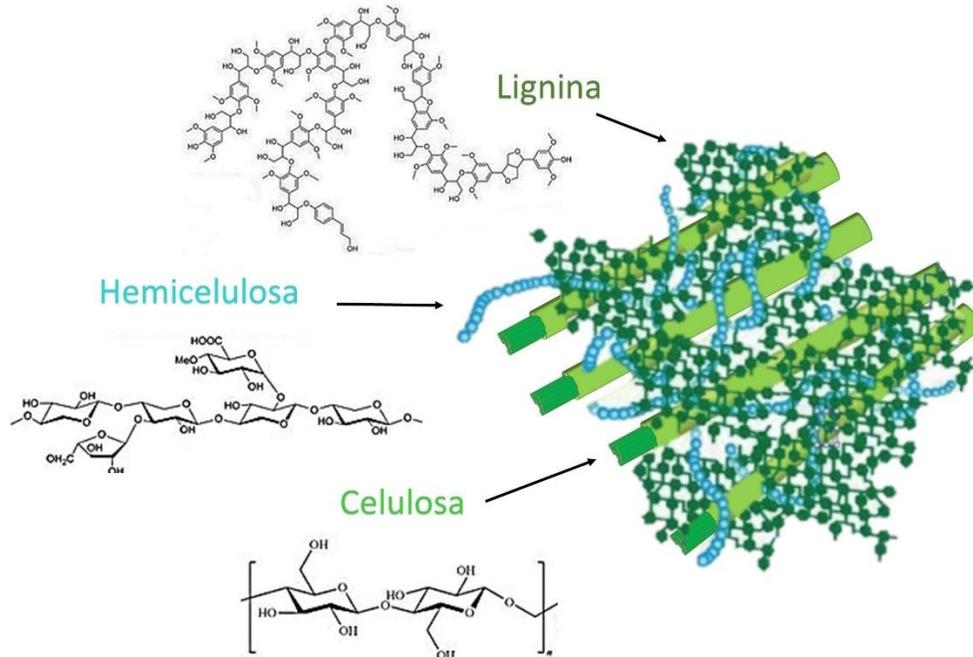


Figura 1. Distribución de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la biomasa lignocelulósica. Adaptado de Wang et al. 2017).

La baja disponibilidad de los carbohidratos presentes en la celulosa y hemicelulosa en residuos lignocelulósicos, como el bagazo de agave, genera la necesidad de aplicar un proceso de sacarificación para la liberación de los azúcares fermentables que se encuentran en dichas fracciones (Arreola-Vargas et al., 2015a). Entre las alternativas de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, la hidrólisis enzimática ha sido estudiada ampliamente ya que el uso de enzimas generalmente conduce a una reducción en el tiempo del proceso, el número de pasos de reacción y la cantidad de desechos. Las enzimas proporcionan una forma de producir compuestos específicos debido a su alta selectividad y previenen la formación de furanos y fenoles, compuestos inhibitorios en procesos de fermentación (Breton-Deval et al., 2018; Choi et al., 2015; Monlau et al., 2014). Además, el bagazo de agave tiene la ventaja de no requerir un tratamiento previo a la hidrólisis enzimática puesto que puede considerarse como una materia prima pretratada, ya que se produce después

de la cocción (100 ° C durante 24 h) y molienda para la extracción de jarabe durante el proceso de producción de tequila (Arreola-Vargas et al., 2016).

La hidrólisis enzimática incluye diferentes reacciones bioquímicas para convertir la celulosa y hemicelulosa en monosacáridos, principalmente. Para tal efecto, se requiere de diferentes enzimas hidrolíticas, como celulasas, hemicelulasas y enzimas accesorias para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Galindo-Hernández et al., 2018; Raud et al., 2019). Los componentes de las celulasas son endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. La fracción de los componentes presentes en cada mezcla enzimática depende de la fuente de la enzima. Las endoglucanasas se unen a la celulosa y exponen los extremos reductores y no reductores dando como resultado la formación de celooligómeros. Las exoglucanasas se unen a los extremos reductores y no reductores de los celooligómeros convirtiéndolos en celobiosa (dímeros de glucosa). El componente final que actúa es la β -glucosidasa, que convierte la celobiosa en glucosa (Kostylev & Wilson, 2012), tal como se muestra en la Figura 2.

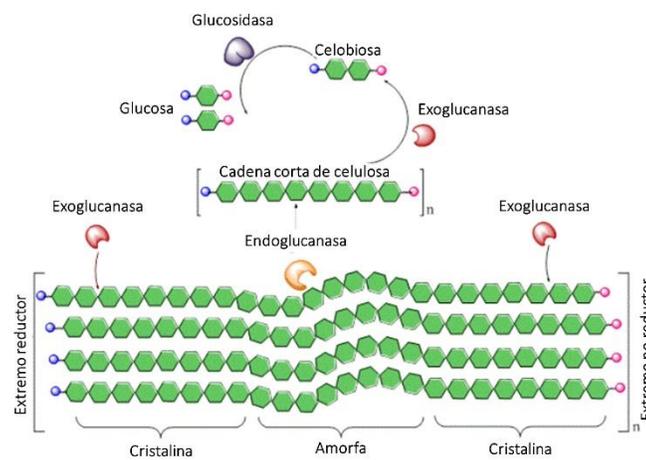


Figura 2. Representación de la hidrólisis de la celulosa por la acción de las celulasas. Tomado de Sajith et al., (2016).

Dentro del grupo de las hemicelulasas, las xilanasas constituyen el grupo enzimático más estudiado debido a que el xilano se encuentra en gran abundancia en la hemicelulosa de diversas especies vegetales. Las xilanasas, similares a las

celulasas, se componen básicamente de dos grupos de enzimas: endo-1,4-D-xilanasas y 1,4- D-xilosidasas (Beg et al., 2001). En Figura 3 se muestra una representación de la hidrólisis de la hemicelulosa empleando hemicelulasas.

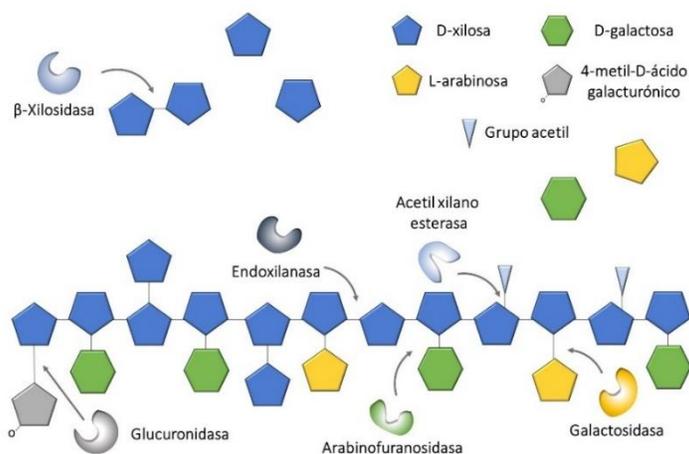


Figura 3. Representación de la hidrólisis de la hemicelulosa por la acción de las hemicelulasas. Adaptado de Madadi et al., (2017).

Existen diferentes enzimas comerciales disponibles para llevar a cabo la sacarificación del material lignocelulósico, entre ellas se encuentran Celluclast 1.5 L y Viscozyme producidas por la empresa danesa Novozymes™, siendo la primera una celulasa usada para hidrolizar la celulosa en azúcares fermentables como la glucosa, celobiosa y polímeros de glucosa más largos, mientras que la segunda contiene una gama de carbohidrasas incluyendo arabinasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa y xilanasas; esta mezcla enzimática tiene la capacidad de mejorar los rendimientos de extracción (Novozymes, 2019). Por otro lado, Stonezyme y Cellulase 50 XL son enzimas comerciales de origen nacional, que poseen la ventaja de reducir los costos implicados en el uso de las enzimas, ya que no tendrían que importarse. Stonezyme es una celulasa producida por la empresa ENMEX™ empleada en la industria textil en la formulación de detergentes para mejorar la textura y apariencia de las prendas, mientras que Cellulase 50 XL es producida por la empresa ENZIQUM™ y se emplea en procesos alimenticios.

Las enzimas mencionadas anteriormente han sido empleadas en la hidrólisis del bagazo de agave, con la finalidad de aprovechar los hidrolizados en la producción

de hidrógeno, Celluclast 1.5 L (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel-Corona & Razo-Flores, 2018), Stonezyme (Montoya-Rosales et al., 2019) y Cellulase 50 XL (Valencia-Ojeda, 2019), han sido empleadas de manera individual, mientras que Viscozyme se ha empleado como enzima accesoria para realizar hidrólisis binarias con Celluclast 1.5 L (Montoya-Rosales et al., 2019) y Cellulase 50 XL (Valencia-Ojeda, 2019). En la Tabla 1 se muestran las diferentes enzimas y condiciones de hidrólisis que han sido aplicadas en el bagazo de agave, de igual manera se presentan los resultados obtenidos para cada hidrolizado.

Es importante destacar que en los trabajos presentados en la Tabla 1 no se ha realizado una caracterización de los azúcares específicos y ácidos grasos volátiles que componen a los hidrolizados enzimáticos en función. Debido a que la biomasa lignocelulósica está compuesta por diferentes tipos de azúcares, diversos estudios corroboran que tanto la polimerización como el tipo de azúcar tienen una influencia directa sobre productividades de H_2 , para seleccionar el pretratamiento enzimático con el cual se obtengan mejores resultados es importante determinar tanto cualitativa como cuantitativamente la composición de los hidrolizados enzimáticos.

Li et al. (2008) evaluaron la producción de H_2 empleando cultivos mixtos en cuatro monosacáridos que se encuentran presentes en la biomasa lignocelulósica (glucosa, fructosa, arabinosa y galactosa) obteniendo diferentes productividades de H_2 para cada uno de los azúcares evaluados concluyendo que la glucosa es el azúcar con el que se obtienen las mayores velocidades de producción de H_2 . Chatellard et al. (2016) estudiaron diferentes azúcares como la xilosa y el xilano en la producción de H_2 determinando que el grado de polimerización tuvo un efecto negativo en los rendimientos generales de producción de hidrógeno, ya que se observaron menores velocidades de producción de H_2 y una mayor tasa de retardo para el xilano que para la xilosa. Por lo que debido a que la composición de los hidrolizados enzimáticos se encuentra relacionada directamente con los rendimientos de productividad de H_2 , es importante realizar una caracterización más detallada de esta materia prima (Arreola-Vargas et al., 2015a)

Tabla 1. Condiciones de operación y resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática del bagazo de agave.

Condiciones de hidrólisis						Resultados de hidrólisis				
Enzima	pH	Temperatura	[enzima] (mg proteina/mL buffer)	[bagazo] (g/L buffer)	Tiempo de hidrólisis (h)	Sistema/Agitación	DQO (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	Referencia
Celluclast 1.5 L	4.5	45	1.6	40	10	Matraz/ 100 rpm	42	12	N.D.	Conteras-Davila et al., 2017
Celluclast 1.5 L	5.5	40	0.7	35	12	Matraz/ 100 rpm	25	5.3	4.9	Montiel Corona & Razo-Flores, 2018
Celluclast 1.5 L – Viscozyme	5	40	¹ (Celluclast): 0.1 (Viscozyme)	50	7	Tanque agitado/ 100 rpm	39.7	12.6	9	Montoya Rosales et al, 2019
Stonezyme	6.2	50	2.25	79	7	Tanque agitado/ 100 rpm	59	17.5	14	Montoya Rosales et al, 2019
Cellulase 50 XL	6	45	0.53	87	2.5	Tanque agitado/ 100 rpm	30.2	15.8	13.4	Valencia – Ojeda, 2019
Cellulase 50 XL- Viscozyme	6	45	0.53 (Cellulase 50 XL): 0.1 (Viscozyme)	87	2.5	Tanque agitado/ 100 rpm	36.9	20.3	16.8	Valencia-Ojeda, 2019

1.3 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos en reactores continuos

En cuanto al proceso operativo, se han empleado diversas configuraciones de reactores para la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados enzimáticos: tanque agitado continuo (CSTR, por sus siglas en inglés), flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés), filtro anaerobio, filtro percolador (TBR, por sus siglas en inglés) (Arriaga et al., 2011; Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel-Corona & Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019). Sin embargo, destaca el CSTR ya que tiene un mejor desempeño en términos de velocidades volumétricas de producción de hidrógeno (VVPH) y rendimientos específicos de hidrógeno (REH).

Como se puede observar en la Tabla 2 los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenido a partir de las enzimas Celluclast 1.5 L-Viscozyme y Cellulase 50 XL de manera individual han reportado las productividades de H₂ más altas.

La fermentación oscura se realiza principalmente a través de la asimilación de carbohidratos, preferentemente monosacáridos (glucosa, xilosa, entre otros), por lo que conocer la cantidad de estos azúcares en los hidrolizados enzimáticos es fundamental. Normalmente la caracterización de los hidrolizados consiste principalmente en la determinación de la concentración de azúcares totales, pero se ha encontrado que no necesariamente una alta concentración de azúcares se traduce en una alta producción de H₂ por lo que es importante hacer una caracterización detallada de los azúcares presentes en los hidrolizados y sus concentraciones.

Tabla 2. Resultados para la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

Enzima	COV (g DQO/L-d)	Carga orgánica de azúcares totales (g/L-d)	Carga orgánica de azúcares reductores (g/L-d)	VVPH (L H₂/L-d)	REH (L H₂/kg bagazo)	Referencia
Celluclast 1.5 L	52.2	14.9	N.D.	2.53	55.7	Conteras-Davila et al., 2017
Celluclast 1.5 L	44	9.3	8.6	6	105	Montiel Corona & Razo-Flores, 2018
Celluclast 1.5 L – Viscozyme	80	25.4	18.1	13	115	Montoya Rosales et al, 2019
Stonezyme	100	29.7	23.7	2.2	16	Montoya Rosales et al, 2019
Cellulase 50 XL	100	52.3	44.4	9.94	32.5	Valencia – Ojeda, 2019
Cellulase 50 XL- Viscozyme	70	38.5	31.9	4.15	22	Valencia-Ojeda, 2019

De acuerdo con los resultados obtenidos en las hidrolisis enzimáticas mostrados en las Tabla 1 y 2, se esperaría que a mayor concentración de azúcares reductores se tuviera una mayor VVPH. Sin embargo, al hacer una comparación entre los diferentes sistemas estudiados previamente, los hidrolizados enzimáticos obtenidos con Stonezyme y la mezcla binaria de Cellulase 50 XL - Viscozyme obtuvieron las mayores concentraciones de azúcares reductores y ambos sistemas presentan las VVPH más bajas, lo cual indica que no necesariamente al tener una mayor concentración de azúcares totales y azúcares reductores se tiene una mejor producción de H₂.

De igual manera, al analizar los hidrolizados en función de la carga orgánica de azúcares reductores, se mantiene la tendencia observada con la concentración de azúcares reductores, puesto que el sistema con hidrolizado de la mezcla binaria de Celluclast 1.5 L -Viscozyme presenta la mejor VVPH, a pesar de no tener una alta carga volumétrica de azúcares en comparación con los otros hidrolizados estudiados.

Esto se encuentra relacionado con que la determinación tanto de azúcares totales como de azúcares reductores es realizada por métodos espectrofotométricos cuantitativos; en el caso de los azúcares se utiliza el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), que a pesar de ser altamente sensible tiene la desventaja de no especificar qué azúcares fermentables están presentes (Miller, 1959). Por lo tanto, como se mencionó previamente una caracterización más completa y específica de los azúcares presentes en los hidrolizados enzimáticos en la cual se especifique los azúcares que se tienen presentes permitiría explicar los resultados obtenidos de producción de H₂.

Los hidrolizados enzimáticos se encuentran compuestos principalmente de hexosas y pentosas, que son fermentadas a través de diferentes rutas para la producción de H₂, provocando que la relación de los tipos de azúcares que se tienen presentes en los hidrolizados tenga una influencia directa en los rendimientos de H₂ (Chatellard et al., 2016; Li et al., 2008; Prakasham et al., 2009). Tal como se puede observar en la Figura 4, cada tipo de azúcar tiene una ruta de fermentación específica que se

encuentra en función del tipo y concentración de los carbohidratos, condiciones de fermentación y el tipo de inóculo (Marzocchella et al., 2015; Vasconcelos De Sá et al., 2013), por lo que la presencia de diferentes azúcares en los hidrolizados, está relacionada con las diferencias reportadas previamente entre los rendimientos y velocidades de producción de biocombustibles como el bioetanol y el H₂ (Contreras-Dávila et al., 2017; Marzocchella et al., 2015; Montiel-Corona & Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019; Valencia-Ojeda, 2019; Vasconcelos De Sá et al., 2013). Por lo tanto, es imprescindible conocer el tipo de carbohidratos y su concentración en los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave, más allá de la concentración de AT y AR.

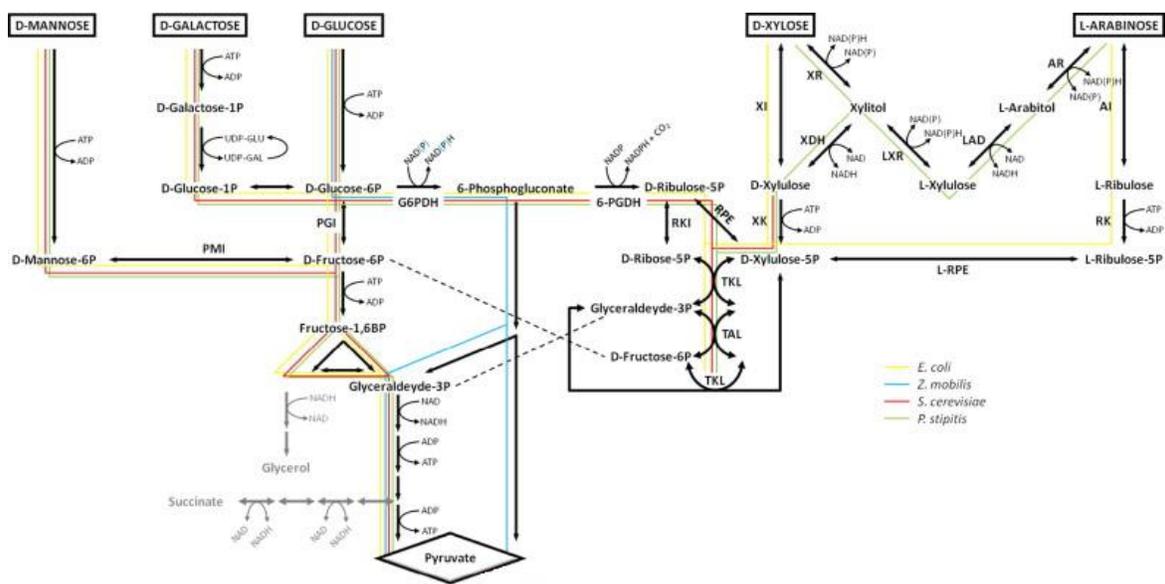


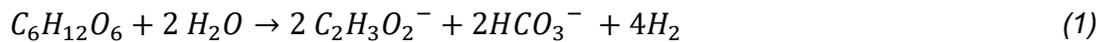
Figura 4. Vías fermentativas de monosacáridos derivados de hemicelulosa en *E. coli*, *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* y *P. stipitis*. Tomado de Gírio et al. (2010).

1.4 Asimilación de diferentes carbohidratos en la fermentación oscura.

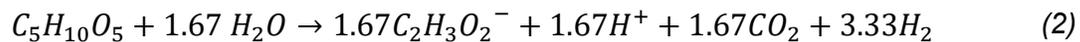
Los monómeros más abundantes que se encuentran presentes en la biomasa lignocelulósica son la glucosa y la xilosa. Mientras que la glucosa es fermentada a través de la glucólisis, la xilosa puede ser fermentada a través de la vía pentosa fosfato (PPP, por sus siglas en inglés) o por la vía fosfatocetolasa (PKP, por sus siglas en inglés). Usando la vía PKP, el 40% del carbono se convierte directamente a acetato, mientras que el carbono restante entra en la glucólisis. Por otro lado, en

la vía PPP todo el carbono se convierte en intermediarios para la glucólisis, llevando todo el carbono a piruvato. Por lo tanto la vía fermentativa por la cual es metabolizada la xilosa influye en los rendimientos y velocidades de producción de H_2 y, a su vez esta depende de los microorganismos presentes durante la fermentación, así como de las condiciones de operación tales como pH, temperatura, potencial redox y concentración de sustrato (Prakasham et al., 2009; Rombouts et al., 2019).

Los dos monómeros principales de la biomasa lignocelulósica tienen diferentes rendimientos molares, reportándose el mayor rendimiento cuando se sigue la vía del acetato (Ecuaciones 1 y 2)



$$\Delta G^\circ = -206.1 \text{ KJ/mol}$$



$$\Delta G^\circ = -195.5 \frac{\text{KJ}}{\text{mol}}$$

Durante la fermentación en general, cuando se emplean medios con más de una fuente de carbono se observa un efecto conocido como crecimiento diaúxico, en donde se presenta un consumo preferencial de un azúcar por parte de los microorganismos (Kim et al., 2015)

El consumo preferencial de sustrato se ha explicado previamente como resultado de la competencia microbiana o la inhibición del consumo de sustrato. Entre varios mecanismos enzimáticos, la represión catabólica es una hipótesis alternativa que ha recibido cierta atención en los sistemas de fermentación complejos (Zhao et al., 2018). La represión catabólica regula el metabolismo de varios sustratos en los microorganismos, ya que continuamente estos afinan los procesos catabólicos y anabólicos para aprovechar de manera óptima la energía y los sustratos para el mantenimiento o el crecimiento celular. La coordinación de estos procesos tiene una explicación termodinámica en la forma en que los niveles de energía libre de Gibbs en la vía catabólica y anabólica se afectan entre sí. Por lo tanto, se presume que la

represión catabólica es el resultado de la adaptación de los microorganismos a ambientes fluctuantes, en donde tienen una preferencia jerárquica por sustratos y la presencia de uno que les proporcione mayor energía, puede reprimir la expresión génica y la actividad enzimática involucrada en el metabolismo de los otros sustratos (la Cecilia et al., 2019).

Es por esto por lo que, dependiendo de la proporción de cada azúcar, el grado de polimerización y otros parámetros bioquímicos, las vías fermentativas y la productividad de H₂ pueden verse afectadas (Chatellard et al., 2016; Li et al., 2008; Prakasham et al., 2009). De esta manera, relacionar la composición de los hidrolizados enzimáticos con las diferentes productividades de H₂ es de vital importancia ya que permitirá generar pautas para hacer la selección de los pretratamientos adecuados para mejorar la productividad de H₂.

2 Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

Entre los residuos lignocelulósicos de mayor relevancia en México debido a su alta disponibilidad se encuentra el bagazo de agave, el cual posee un gran potencial para la producción de H₂ por fermentación oscura dado su alto contenido de azúcares, que pueden ser liberados a través de una hidrólisis enzimática (Palomo-Briones et al., 2018a). La hidrólisis enzimática ha sido estudiada en el grupo de investigación empleando una diversidad de enzimas comerciales entre las que destacan, debido a su alta eficiencia de sacarificación Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL evaluadas de forma individual y en mezcla binaria con Viscozyme (Montiel-Corona and Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019; Valencia-Ojeda, 2019). Sin embargo, se ha observado en estudios previos realizados en reactores continuos que una alta concentración de azúcares no es directamente proporcional a altos rendimientos de producción de H₂. Puesto que el bagazo se encuentra compuesto por diferentes fracciones, que al hidrolizarse liberan diversas cantidades de pentosas y hexosas entre las que se encuentran xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa (Corona-González et al., 2016).

Por esta razón, es primordial llevar a cabo una caracterización cuantitativa y cualitativa de los azúcares presentes en los hidrolizados enzimáticos ya que permitiría determinar si las concentraciones y proporciones de estos azúcares presentes en los hidrolizados enzimáticos lignocelulósicos son determinantes en los rendimientos y productividades de H₂.

2.2 Hipótesis

La composición de los hidrolizados enzimáticos es determinante en la producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura, por lo que caracterizar los hidrolizados enzimáticos permitiría evaluar el efecto que tienen los diferentes carbohidratos presentes en la producción de hidrógeno y de esta manera explicar las diferencias reportadas previamente para cada uno de los hidrolizados.

2.3 *Objetivo General*

Evaluar el efecto de los diferentes carbohidratos presentes en cinco hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir del bagazo de agave en la producción de hidrógeno por fermentación oscura.

2.4 *Objetivos Específicos*

- Caracterizar los carbohidratos presentes en los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave para identificar cuales se encuentran presentes en mayor concentración.
- Realizar las cinéticas de consumo de los principales carbohidratos presentes en los hidrolizados enzimáticos en experimentos de fermentación oscura para determinar cuáles de ellos tienen mayor impacto sobre la producción de hidrógeno.
- Evaluar la producción de hidrógeno exclusiva de los azúcares presentes en los hidrolizados enzimáticos, empleando azúcares grado reactivo para simular las concentraciones de los hidrolizados enzimáticos.
- Determinar el efecto de las diferentes relaciones de glucosa y xilosa que se obtienen en los hidrolizados enzimáticos sobre la producción de hidrógeno.
- Evaluar el potencial de producción de hidrógeno individual de los azúcares identificados en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos.

3 Materiales y métodos

3.1 Obtención y preparación del bagazo de agave

El bagazo de agave se obtuvo de la empresa Casa Herradura™ ubicada en Amatitán, Jalisco, México. El bagazo utilizado en las hidrólisis enzimáticas se dejó secar al sol durante aproximadamente 6 días para posteriormente reducir el tamaño de partícula empleando un molino de cuchillas. Posteriormente se le realizó un triple lavado con agua potable para eliminar residuos y sustancias solubles, así como los azúcares remanentes del proceso de producción de tequila; cada lavado tenía una duración de una hora. El bagazo lavado se secó al sol por 48 horas y posteriormente se tamizó con una malla No. 18 (apertura 2 mm) almacenándose en bolsas de plástico y costales a temperatura ambiente en condiciones secas y sin luz hasta su uso.

3.2 Hidrólisis enzimática

Para efectuar las hidrólisis del bagazo de agave se emplearon las siguientes enzimas comerciales: Celluclast 1.5 L (598 EGU/mL, Novozymes, Dinamarca), Cellulase 50 XL (3,688 EGU/mL, ENZIQUM, México), Stonezyme (560 EGU/mL, Banner Química S.A. de C.V., México) y Viscozyme (154 EGU/mL, Novozymes, Dinamarca). Para más detalles de las actividades enzimáticas ver anexo 1.

Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo en un reactor de vidrio con un volumen de trabajo de 10 L (modelo U1 TPLC/FAM-10000, Prendo, Puebla, México) integrado con un agitador vertical helicoidal y con un control manual de agitación. La temperatura se controló de forma automática empleando un recirculador de agua integrado a dicho reactor (modelo FC-20P, Prendo, Puebla, México). En las hidrólisis enzimáticas se empleó un buffer de citratos 50 mM de acuerdo a lo reportado previamente (Galindo-Hernández et al., 2018). Al terminar la hidrólisis enzimática se separó el hidrolizado del bagazo empleando una tela absorbente 100% algodón y el hidrolizado líquido se almacenó en refrigeración a 4 ° C hasta su uso. Las hidrólisis enzimáticas se realizaron de acuerdo con las metodologías reportadas previamente (Montiel-Corona & Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019; Valencia-Ojeda, 2019), y cuyas condiciones se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de operación para la hidrólisis enzimática del bagazo de agave

Enzima	pH	Temperatura	[enzima] (EGU/g bagazo)	[bagazo] (g/L buffer)	Tiempo de hidrólisis (h)	Agitación (rpm)	Referencia
Celluclast 1.5 L	5.5	40	200	35	3	100	Montiel Corona & Razo-Flores, 2018
Celluclast 1.5 L – Viscozyme	3.5	40	54 (Celluclast 1.5 L) 15 (Viscozyme)	87	3	100	Modificado de Montoya-Rosales et al., 2019
Cellulase 50 XL	6	43	484	87	3	100	Valencia – Ojeda, 2019
Cellulase 50 XL- Viscozyme	6	45	487 (Cellulase 50 XL) 10 (Viscozyme)	87	2.5	100	Valencia – Ojeda, 2019
Stonezyme	6.2	50	589	79	4	100	Montoya-Rosales et al., 2019

Debido a resultados obtenidos recientemente en el grupo de trabajo para la optimización de la hidrólisis de Celluclast 1.5 L-Viscozyme, la concentración de bagazo establecida previamente por Montoya-Rosales et al. (2019) fue modificada. En este estudio en lugar de emplear una concentración de 50 g bagazo/L buffer se utilizaron 87 g bagazo/L buffer.

Se realizó una caracterización de la glucosa, xilosa, celobiosa, galactosa, arabinosa y fructosa presente en los hidrolizados enzimáticos. De igual manera se hizo la determinación de azúcares totales (AT), demanda química soluble de oxígeno (DQOs) y ácidos grasos volátiles (AGV) en cada uno de los hidrolizados.

El principal objetivo de la determinación de azúcares fue tener un panorama más completo acerca de la composición de los hidrolizados enzimáticos, sin embargo, cabe mencionar que dentro de esta composición se encuentran presentes otros azúcares y compuestos distintos a los determinados en este estudio. Es por esto por lo que al hacer el análisis de resultados se realizó un balance de azúcares tomando como 100% la concentración de los azúcares totales y denominando como “otros azúcares” a la fracción de los azúcares totales que no fue determinada.

En la Ecuación (3) se muestra cómo se definió la concentración de “otros azúcares”, siendo la $C_{\text{azúcares identificados}}$ la sumatoria de la concentración de glucosa, celobiosa, xilosa, galactosa, fructosa y arabinosa.

$$\text{Otros azúcares (g/L)} = C_{\text{azúcares totales}} - C_{\text{azúcares identificados}} \quad (3)$$

3.3 Inóculo y medio mineral

Como inóculo para los experimentos se empleó lodo anaerobio obtenido de un reactor UASB a nivel industrial que trata vinazas de tequila de Casa HerraduraTM, en Amatitán, Jalisco, México. Con la finalidad de eliminar la actividad metanogénica el lodo se sometió a un pretratamiento térmico a 105 °C por 24 h. Para su caracterización se determinó el contenido de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) después del pretratamiento.

El medio mineral con nutrientes y MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado- 69892 SIGMA) empleado en los ensayos fue el establecido por la Red Latinoamericana de Biohidrógeno en el protocolo de producción específica de hidrógeno (Carrillo-Reyes et al., 2019) que contiene (g/L): 41.6 g NH₄Cl, 19.52 g de MES, 2 g MgCl₂·6H₂O, 1.6 g FeSO₄·7H₂O, 40 mg CoCl₂·6H₂O, 40 mg MnCl₂·4H₂O, 40 mg KI, 8 mg NiCl₂·6H₂O, 8 mg ZnCl.

3.4 Ensayos de producción de hidrógeno en lote

Los experimentos de producción de H₂ en lote se realizaron en un sistema automático de potencial de biogás AMPTS II (Bioprocess Control, Lund, Suecia) de acuerdo con el protocolo de producción específica de hidrógeno emitido por la Red Latinoamericana de Biohidrógeno (Carrillo-Reyes et al., 2019). Se emplearon reactores de 600 mL, con un volumen de trabajo de 360 mL (240 mL de espacio de cabeza). Todos los ensayos fueron inoculados con una relación sustrato/inóculo de 2.7 g azúcares totales/g SV. Se ajustó el pH a 7.5 con soluciones de HCl 5 N o NaOH 5 N y posteriormente se purgó el espacio de cabeza con una mezcla de gases CO₂/N₂ durante 1 min. Las condiciones de incubación se establecieron a 37 °C y agitación intermitente (1 min de agitación con 3 min de pausa entre agitación) a 120 rpm.

3.5 Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos.

Para evaluar la producción de H₂ a partir de diferentes hidrolizados enzimáticos se realizaron experimentos en lote utilizando el AMPTS II siguiendo el procedimiento descrito previamente en la Sección 3.4. Se utilizaron como sustrato los hidrolizados enzimáticos (tratamiento hidrolizado) así como los siguientes controles; enzimas (control enzimático), glucosa (control positivo) y control endógeno. Los ensayos con hidrolizados enzimáticos y glucosa se ajustaron a una concentración inicial de 5 g azúcares totales/L en un volumen de trabajo de 360 mL. Se consideró la Ecuación (4) para tener una concentración inicial de 5 g/L en los tratamientos con hidrolizado, empleando la concentración de azúcares totales obtenida en la Sección 3.2 para cada uno de los hidrolizados evaluados.

$$Volumen_{hidrolizado} (mL) = \frac{5 \text{ g/L} (360 \text{ mL Volumen}_{total})}{Concentración_{hidrolizado} (g \text{ AT/L})} \quad (4)$$

Para determinar el consumo de los azúcares en la producción de H₂ a partir de los hidrolizados enzimáticos se realizó un muestreo periódico del medio en cada uno de los ensayos hasta que se alcanzó el estado estable en la producción de H₂. El muestreo en las cinéticas de producción de H₂ comenzó en la hora 5, se tomó una muestra cada hora durante las primeras 12 horas. Posteriormente se muestreo cada 2 horas hasta las 24 hrs, para continuar cada 4 horas. Una vez alcanzadas las 36 horas de haber iniciado el experimento se continuó con un muestreo cada 6 horas hasta alcanzar el estado estable en la producción de H₂.

Con el fin de realizar el muestreo se adaptó una extensión de manguera Tygon® en las botellas empleadas en los experimentos en lote, la adaptación se colocó en el puerto adicional ubicado de la tapa hermética que usualmente se utiliza para purgar el espacio de cabeza con CO₂ /N₂. En la Figura 5 se observa en el esquema de la botella empleada en los sistemas en lote la adaptación mencionada previamente.

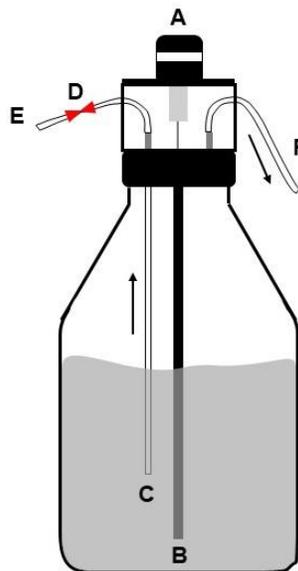


Figura 5. Esquema de la botella empleada en los experimentos en lote. A: Motor, B: Agitador; C: Extensión para toma de muestra, D: Abrazadera de tubo de 4.5 mm, E: Puerto para toma de muestra, F: Salida del gas.

Para realizar el muestreo se colocaba una jeringa en el puerto para toma de muestra con la conexión cerrada empleando la abrazadera de tubo de 4.5 mm para evitar tanto la pérdida de gas como la entrada de aire al sistema. Una vez conectada la jeringa se procedía a abrir la conexión del puerto de muestreo con la abrazadera. Para evitar que la muestra correspondiera al medio que quedaba remanente del muestreo anterior, se recolectaba en la jeringa un volumen de 5 mL y este se volvía a reinyectar al reactor, esto se realizaba tres veces. Posteriormente se recolectaba un volumen de 1.5 mL en la jeringa y se procedía a cerrar la conexión con la abrazadera. La muestra era recolectada en un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se centrifugaba durante 10 min a 3000 rpm para la eliminación de biomasa. Las muestras fueron almacenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Para evitar que la toma de muestra creara una interferencia en los resultados obtenidos en la producción de H_2 , se estableció un volumen de 1.5 mL para cada muestra, de forma que el volumen total retirado de la botella representaba menos del 10% del volumen inicial de 360 mL.

Las muestras recolectadas durante cada uno de los experimentos se analizaron en función de DQOs, AT, AGV y azúcares. En las cinéticas de producción de H_2 , se determinó únicamente la concentración de glucosa, xilosa y celobiosa, por lo que en los denominados “otros azúcares” se incluye la concentración de la galactosa, arabinosa y fructosa.

3.6 Efecto de la composición de los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno a partir de azúcares grado reactivo.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los azúcares determinados en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos en la producción de H_2 eliminando las posibles interferencias que se atribuyen a los compuestos presentes en la preparación enzimática, se realizaron ensayos en donde se replicó la concentración de Celluclast 1.5 L – Viscozyme y Stonezyme. Estos ensayos se denominaron como “hidrolizados sintéticos” y la concentración de cada uno de los azúcares se estableció en función de la caracterización que se mencionó previamente en la Sección 3.2. Para replicar la composición de los dos hidrolizados se emplearon los

siguientes azúcares: D-(+)-glucosa con una pureza $\geq 99.5\%$, D-(+)-xilosa con una pureza $\geq 99\%$, D-(+)-celobiosa $\geq 98\%$, D-(+)-galactosa $\geq 98\%$, D-(-)-fructosa $\geq 99\%$ y D-(-)-arabinosa $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich). Estos ensayos fueron realizados en experimentos lote en el AMPTS II empleando el procedimiento descrito previamente en la Sección 3.4.

En cada uno de los ensayos se realizó un muestreo periódico del medio hasta que se alcanzó el estado estable en la producción de H_2 . El método de muestreo es el que se describe previamente en la Sección 3.6. Estas muestras fueron analizadas en función de DQOs, AT, AGV y azúcares (glucosa, xilosa y celobiosa).

Debido a que para establecer la composición de los hidrolizados sintéticos se agregaron en concentraciones idénticas los azúcares identificados en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos y que en las cinéticas de producción de H_2 se hizo el seguimiento únicamente de la concentración de glucosa, xilosa y celobiosa, para realizar en análisis de resultados se empleó nuevamente la Ecuación (3), en donde la concentración de “otros azúcares” corresponde a la concentración de galactosa, fructosa y arabinosa adicionada en cada uno de los experimentos.

3.7 Efecto de la relación glucosa:xilosa en la producción de hidrógeno.

A partir de la caracterización de los hidrolizados enzimáticos, se determinó que estos presentan diferentes relaciones de concentración glucosa-xilosa (G:X). Por esta razón, se decidió evaluar diferentes relaciones G:X para determinar el efecto que tienen sobre la fermentación oscura y sus diferentes parámetros cinéticos. Las variaciones en la relación de G:X a evaluar se establecieron a partir de un incremento gradual fijando como extremos la relación G:X más baja (2:1) y más alta (9:1) encontradas en los hidrolizados enzimáticos. De esta manera se establecieron 2 valores intermedios entre estas relaciones y se evaluó de forma individual tanto a la glucosa (1:0) como a la xilosa (0:1). En la Tabla 4 se muestran las relaciones G:X que fueron evaluadas en los experimentos.

Tabla 4. Relaciones Glucosa-Xilosa empleadas para la producción de hidrógeno en lote

Relación G:X	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)
0:1	0.00	5.00
2:1	3.33	1.67
3.75:1	3.95	1.05
5.5:1	4.23	0.77
9:1	4.50	0.50
1:0	5.00	0.00

La evaluación de producción de H₂ de las diferentes relaciones de concentración G:X se llevó a cabo en ensayos en lote en el AMPTS II empleando el procedimiento descrito previamente en la sección 3.4. En todos los ensayos se estableció una concentración inicial de 5 g/L siguiendo las concentraciones indicadas en la Tabla 4 de D-(+)-glucosa con una pureza ≥99.5% y D-(+)-xilosa con una pureza ≥99% (Sigma-Aldrich).

Se realizó un seguimiento tanto del consumo de azúcares totales como de la producción de H₂ a partir de un muestreo periódico del medio en cada uno de los ensayos hasta que se alcanzó el estado estable en la producción de H₂. El método de muestreo es el que se describe previamente en la Sección 3.6. Estas muestras fueron analizadas en función de DQOs, AT y AGV.

3.8 Evaluación de los azúcares individuales presentes en los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno.

Con el fin de evaluar la producción de H₂ de cada uno de los azúcares individuales que se identificaron en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos, se llevaron a cabo ensayos en lote empleando el AMPTS II siguiendo el procedimiento descrito previamente en la sección 3.4. Se estableció una concentración inicial de 5 g/L en todos los ensayos empleando de manera individual; D-(+)-glucosa con una pureza ≥99.5%, D-(+)-xilosa con una pureza ≥99%, D-(+)-celobiosa ≥98%, D-(+)-galactosa ≥98%, D-(-)-fructosa ≥99%, D-(-)-arabinosa ≥98% y D-sorbitol ≥98% (Sigma-Aldrich).

Se evaluó el consumo de cada uno de los azúcares individuales mencionados previamente realizando un muestreo periódico en los ensayos hasta alcanzar el estado estable en la producción de H₂. El método de muestreo es el que se describe previamente en la Sección 3.6. Estas muestras se analizaron en función de DQOs, AT y AGV.

3.9 Métodos analíticos.

Las determinaciones de DQOs, SST y SSV se realizaron de acuerdo con los métodos estándar APHA 5220, 2540-B y 2540-E, respectivamente (APHA, 1997). Los azúcares totales se determinaron por el método ácido sulfúrico-fenol (Dubois et al., 1956).

La caracterización de los azúcares presentes en los hidrolizados enzimáticos se realizó por cromatografía de líquidos en modo isocrático empleando un cromatógrafo de LC 1200 series (Agilent Technologies) con detector RID 1260 (Agilent Technologies) y una columna SP0810 8x300mm (Shodex).

El monitoreo de la glucosa, xilosa y celobiosa durante la producción de H₂ se llevó a cabo por cromatografía de líquidos en un cromatógrafo AGILENT 1260 (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) equipado con un detector de matriz de diodos (DAD), con un detector de índice de refracción (RID) y una columna acoplada AMINEX HPX-87 H.

La composición del gas (H₂ y CO₂) se determinó empleando cromatografía de gases con detector de conductividad térmica, siguiendo el procedimiento previamente descrito (Carrillo-Reyes et al., 2012; Contreras Dávila et al., 2016). Los AGV producidos fueron cuantificados mediante electroforesis capilar de acuerdo con lo establecido previamente (Davila-Vazquez et al., 2008).

3.10 Análisis cinético y estadístico.

Los datos experimentales registrados de los experimentos de producción de hidrógeno (normalizados a las condiciones estándar de presión y temperatura) se analizaron utilizando el modelo modificado de Gompertz (Ecuación (5)):

$$H(t) = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.71828 R_{max}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

Donde $H(t)$ representa el volumen de gas acumulado (L) a través del tiempo t (d), H_{max} es el volumen acumulado máximo (L), R_{max} es la tasa de producción máxima (L / d), y λ es la fase de retardo (d).

Los datos experimentales que presentaron una curva diaúxica en la producción de hidrógeno se analizaron utilizando una ecuación de Gompertz modificada (Ecuación (6)) empleada para sustratos que presentan dos fases en la producción de biogás (Buitrón et al., 2019; Kim et al., 2003). Este modelo tiene dos términos, el primero representa la producción de hidrógeno a partir de los sustratos degradables en una etapa temprana, con una tasa de producción particular R_{max1} , mientras que el segundo expresa la producción de H_2 posterior a partir de sustratos más complejos con una diferente tasa de producción R_{max2} .

$$H(t) = H_{max1} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.71828 R_{max1}}{H_{max1}} (\lambda_1 - t) + 1 \right] \right\} + H_{max2} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.71828 R_{max2}}{H_{max2}} (\lambda_2 - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

En la Ecuación (6) se emplean los subíndices 1 y 2 para indicar que los parámetros cinéticos corresponden a la primera y segunda curva diaúxica respectivamente.

A partir de los parámetros obtenidos del modelo, se calculó la tasa de producción volumétrica de hidrógeno (VPPH, L/L-d) dividiendo R_{max} por el volumen de trabajo. Finalmente, el rendimiento específico de hidrógeno (L H_2 /kg de bagazo) se calculó dividiendo H_{max} por la cantidad total de bagazo utilizado en los experimentos correspondientes.

Los valores reportados en la sección de resultados y discusión están en términos de media \pm desviación estándar. Las correlaciones establecidas se realizaron a partir de regresiones lineales y del coeficiente de determinación (R^2). Para

determinar si entre los tratamientos evaluados existían diferencias significativas se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tuckey ($p < 0.05$) Estos análisis fueron realizados mediante el Software R versión 3.5.1.

4 Resultados y discusión

4.1 Caracterización de los hidrolizados enzimáticos

La caracterización de los diferentes hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir del bagazo de agave se presenta en la Tabla 5. Se observa que el hidrolizado que presenta la mayor DQOs corresponde al obtenido a partir de la enzima nacional Stonezyme (58.48 ± 0.35 g/L), sin embargo, también es la que presenta la mayor contribución de DQOs por parte de la preparación enzimática (58 %). El hidrolizado que tiene la mayor concentración de azúcares totales es el correspondiente a la mezcla Cellulase 50 XL – Viscozyme (19.08 ± 0.36 g/L), siendo Stonezyme el segundo hidrolizado con la concentración más alta de azúcares totales; cabe resaltar que ambos hidrolizados cuentan con las mayores contribuciones de azúcares totales por parte de sus respectivas preparaciones enzimáticas. En general, los resultados obtenidos son similares a los reportados en estudios en donde se han empleado las enzimas de estudio (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel-Corona and Razo-Flores, 2018; Montoya-Rosales et al., 2019; Valencia-Ojeda, 2019), lo cual destaca la reproducibilidad de resultados en los hidrolizados enzimáticos estudiados siguiendo los protocolos de hidrólisis establecidos previamente.

Tabla 5. Caracterización de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos a partir de diferentes preparaciones enzimáticas

Hidrolizado	DQOs (g/L)	Contribución DQO _{CE} ^a (%)	Azúcares totales (g/L)	Contribución AT _{CE} ^b (%)	Rendimiento (g AT/g bagazo)
Celluclast 1.5 L	21.48 ± 0.29	57	7.70 ± 0.43	7	0.220
Celluclast 1.5 L - Viscozyme	28.02 ± 1.20	42	16.82 ± 0.04	8	0.193
Cellulase 50 XL	31.76 ± 0.52	36	17.27 ± 0.21	4	0.199
Cellulase 50 XL – Viscozyme	40.84 ± 0.62	46	19.08 ± 0.36	12	0.219
Stonezyme	58.48 ± 0.35	58	17.75 ± 0.36	33	0.225

^aDQO_{CE}: Demanda química de oxígeno del control enzimático (enzima + buffer)

^bAT_{CE}: Azúcares totales del control enzimático (enzima + buffer)

El uso de Viscozyme como enzima accesoria aumenta la concentración de los azúcares totales liberados 2.16 veces en el caso de Celluclast 1.5 L y 1.11 para Cellulase 50 XL; tales incrementos son consistentes con las concentraciones de azúcares totales reportadas en las hidrolisis enzimáticas realizadas previamente por Montiel-Corona & Razo-Flores (2018), Montoya-Rosales et al. (2019) y Valencia-Ojeda (2019).

Los rendimientos obtenidos en función de los azúcares totales no presentan grandes diferencias entre si ya que se encuentran entre 0.193 y 0.225 g azúcares totales/g bagazo, los cuales son comparables con los rendimientos reportados previamente por Contreras-Dávila et al., (2017), en donde se obtuvieron valores entre 0.19 y 0.38 g azúcares totales/g bagazo y son mayores que el rendimiento reportado por Montiel-Corona & Razo-Flores, (2018) de 0.15 g AT/g bagazo.

Sin embargo, puesto que los diferentes azúcares presentes en los hidrolizados son metabolizados a través de diferentes rutas de fermentación, lo cual tiene una repercusión directa en los rendimientos de producción de H₂, es importante conocer tanto cuantitativa como cualitativamente la composición de los compuestos presentes en los hidrolizados enzimáticos. En la Tabla 6 se muestra la composición de los hidrolizados caracterizados por HPLC.

Con base en la caracterización se determinó un aumento en la concentración de xilosa, galactosa y fructosa con la adición de Viscozyme en los hidrolizados de Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL. Este incremento es debido principalmente a que Viscozyme contiene una gama de carbohidrasas que incluyen arabinasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa y xilanasa, estableciéndose principalmente como una enzima con actividad hemicelulolítica (Galindo-Hernández et al., 2018). Por lo tanto, al hidrolizar la fracción de hemicelulosa del bagazo de agave tienden a liberarse pentosas, como xilosa y arabinosa, y hexosas como la galactosa (Paz et al., 2019; Zhao et al., 2012). En el caso de la arabinosa, con el hidrolizado de Cellulase 50 XL y Viscozyme se presenta una reducción en la concentración de esta pentosa, mientras que con Celluclast 1.5 L y Stonezyme no se detectó la presencia de arabinosa en el hidrolizado.

Tabla 6. Composición de los hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de bagazo de agave determinada por HPLC

Hidrolizado	Celluclast 1.5 L	Celluclast 1.5 L + Viscozyme	Cellulase 50 XL	Cellulase 50 XL + Viscozyme	Stonezyme
Azúcares totales (g/L)	7.69	16.82	17.27	19.08	17.75
Glucosa (g/L)	3.42	5.38	6.64	5.87	7.78
Xilosa (g/L)	0.46	2.93	0.75	1.82	3.26
Celobiosa (g/L)	0.46	1.76	---	---	---
Galactosa (g/L)	0.27	2.25	2.34	4.92	3.40
Arabinosa (g/L)	---	0.83	2.42	0.03	---
Fructosa (g/L)	---	0.93	0.15	0.31	0.87
Otros azúcares (g/L)	3.08	2.74	4.97	6.13	2.44
Azúcares identificados (%) *	60	84	71	68	86
Sorbitol (g/L)	6.31	3.72	1.71	1.73	1.41
Relación G:X	≈ 7:1	≈ 2:1	≈ 9:1	≈ 3:1	≈ 2:1
Acetato (g/L)	0.55	3.56	0.92	2.05	1.07
Butirato (g/L)	0.50	2.55	---	0.95	2.55
Propionato (g/L)	0.11	0.23	0.19	0.04	0.29
Isovalerato (g/L)	0.13	0.38	0.22	0.53	0.33
Succinato(g/L)	0.22	0.48	2.14	---	---
Caproato (g/L)	---	---	---	0.53	---

*Considerando como 100% la concentración de azúcares totales.

En cuanto a la concentración de AGV, existe un aumento de concentración del acetato y butirato con la adición de Viscozyme en los hidrolizados obtenidos a partir de Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 X. Esto se atribuye a la actividad hemicelulolítica que se reporta para Viscozyme, ya que, entre las diferentes enzimas hemicelulolíticas que existen, se encuentran las acetil-xilano esterasas que tienen la función de hidrolizar los enlaces acetil-éster en la estructura de la hemicelulosa. Por lo tanto, la presencia de esta enzima da como resultado la formación de ácido acético y un xilano menos acetilado, que proporciona una mayor accesibilidad para las otras enzimas hemicelulolíticas, mejorando de esta manera la eficiencia de la hidrólisis enzimática (Beg et al., 2001; Polizeli et al., 2005). Este hecho se corrobora con el aumento en la concentración de xilosa y galactosa mencionado previamente para los hidrolizados en los que se emplea Viscozyme como enzima accesoria.

A partir de los resultados se determinó, que la concentración obtenida de xilosa se correlaciona de forma lineal con la concentración de ácido acético ($R^2=0.99$), obteniendo un promedio de 2.98 ± 0.11 mol de ácido acético por cada mol de xilosa en los hidrolizados realizados con Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL de manera individual y usando a Viscozyme como enzima accesoria (más detalles en Anexo 2).

La concentración de ácido acético liberado por la hidrólisis enzimática se encuentra en función del porcentaje de hemicelulosa y el grado de acetilación de la biomasa empleada. De acuerdo con la caracterización realizada previamente por Aguirre-Fierro et al. (2020), el bagazo de agave presenta un 23.71% de hemicelulosa ($16.37 \pm 0.11\%$ de xilano, $3.49 \pm 0.58\%$ de grupos arabinosilo y $3.84 \pm 0.14\%$ de grupos acetilo).

Khan (2010) realizó una comparación entre los hidrolizados ácidos y enzimáticos de astillas de madera, y determinó que la hidrólisis enzimática produce una menor concentración de ácido acético que la hidrólisis ácida (11.37 g/L vs 22.48 g/L), que a su vez relacionan con una menor recuperación de xilosa en el hidrolizado enzimático (21.5 g/L vs 59.68 g/L). Para el caso específico del bagazo de agave, en el estudio realizado por Valdez-Vazquez et al. (2020) se comparan diferentes métodos de hidrólisis para el bagazo de agave y el hidrolizado enzimático empleando Cellulase 50 XL no presenta concentraciones de ácido acético. Esto podría deberse a que el hidrolizado es obtenido en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con una agitación orbital, mientras que en este estudio se emplea un reactor equipado con un agitador helicoidal que favorece la transferencia de masa y modifica la interacción de las enzimas con la biomasa, y por lo tanto altera la composición del hidrolizado. En el caso de los estudios que utilizan la configuración de reactor empleada en este estudio (Montoya-Rosales et al., 2019; Valencia-Ojeda, 2019), no se realizó una caracterización de los hidrolizados en función de AGV ni de azúcares específicos.

Con la adición de Viscozyme también se modificó la relación de glucosa:xilosa en los hidrolizados obtenidos con Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL debido al aumento

de la concentración de xilosa en ambos hidrolizados binarios. Esta relación pasa de 7:1 a 2:1 en el caso de Celluclast 1.5 L y de 9:1 a 3:1 para Cellulase 50 XL (Tabla 6). En estudios previos se ha demostrado la importancia de la relación glucosa-xilosa ya que tales sustratos definen los procesos metabólicos de los microorganismos empleados (rendimiento microbiano, asimilación del sustrato, distribución de electrones entre síntesis celular y producción de energía) y por lo tanto, regulan la producción de H₂ (Kim et al., 2015; Prakasham et al., 2009; Rombouts et al., 2019; Zhao et al., 2018). Sin embargo, tales estudios evalúan la producción de hidrógeno a partir de diferentes relaciones glucosa:xilosa empleando cepas puras como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Zhao et al., 2018) y *Escherichia coli* modificada (Kim et al., 2015). Por esta razón se decidió evaluar el efecto de las diferentes relaciones glucosa-xilosa que se encuentran en los diferentes hidrolizados enzimáticos sobre la producción de H₂, empleando cultivos mixtos como inóculo.

4.2 *Cinética de producción de hidrógeno con los hidrolizados enzimáticos: consumo de azúcares específicos*

En la Figura 6 se presenta la producción de H₂ en lote y el consumo de los azúcares identificados para los hidrolizados de Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL de manera individual y en mezcla binaria usando Viscozyme como enzima accesoria y Stonezyme de manera individual. En el caso de los hidrolizados con mezclas binarias (Figura 6 b y d) se presenta una curva diaúxica para la producción de H₂. Este efecto es típico en los sustratos que contienen más de una fuente de carbono, ya que existe una preferencia por los sustratos que proporcionan una mayor tasa de crecimiento y por lo tanto se consumen en una primera fase y posteriormente, una vez que estos presentan concentraciones limitantes en el medio, comienza el consumo de las otras fuentes de carbono (Kim et al., 2015). Lo anterior se corrobora al observar que en ambos casos la primera fase de crecimiento exponencial se presenta entre las horas 7 – 14, periodo en el que se observa un consumo de glucosa y celobiosa, mientras que la xilosa es consumida posteriormente durante la segunda fase de crecimiento exponencial a partir de la hora 28.

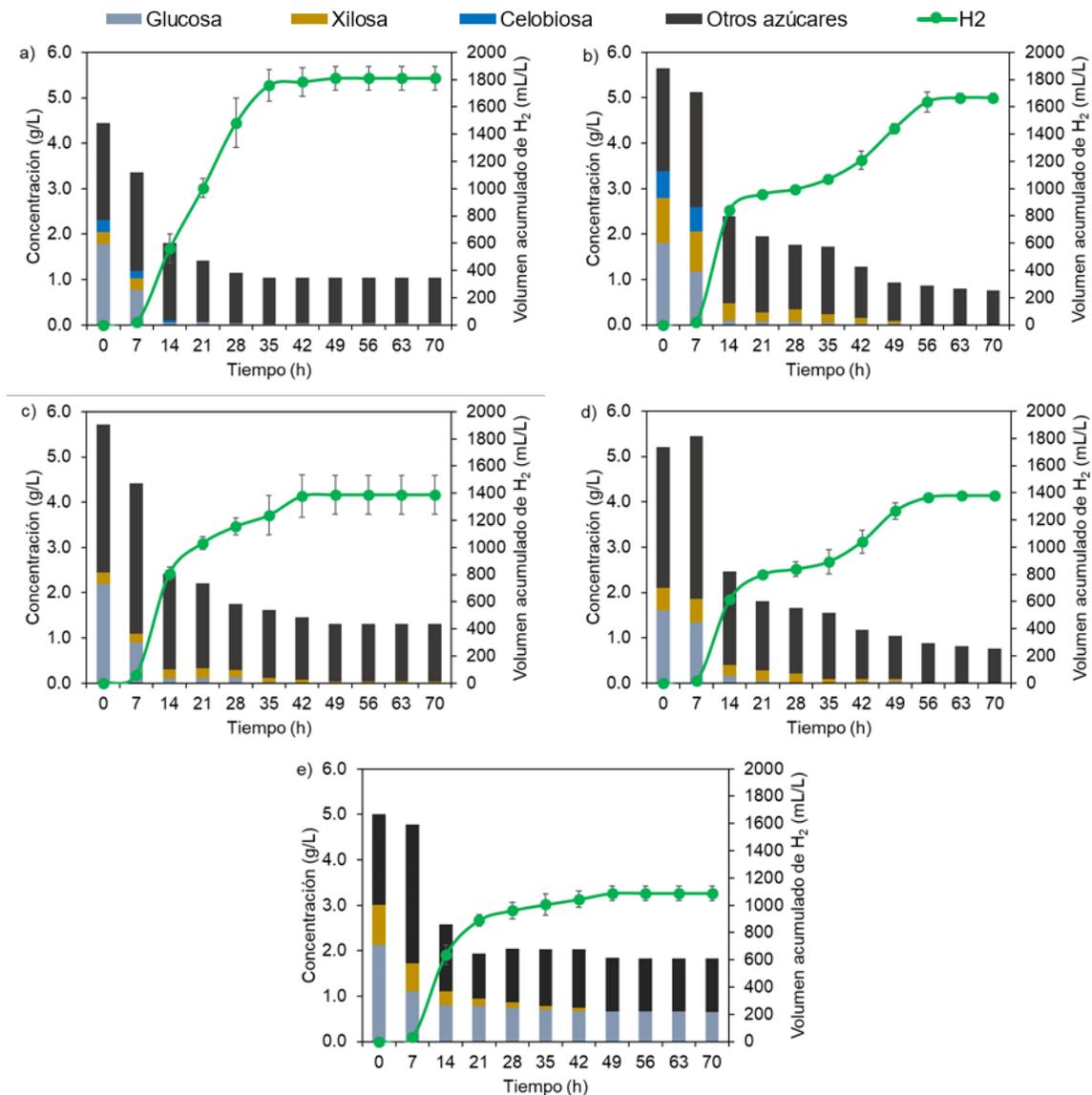


Figura 6. Producción de hidrógeno y consumo de azúcares en lote con diferentes hidrolizados. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L -Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL – Viscozyme (d), Stonezyme (e). La línea continua corresponde al modelo de Gompertz para la producción de H₂ de cada tratamiento.

La fase de retardo entre la primera y segunda fase de crecimiento se debe al uso secuencial de carbohidratos que se observa para sustratos compuestos cuando la glucosa está presente en mayor concentración respecto a otros azúcares. De esta manera se promueve una represión catabólica en donde la actividad de enzimas inducibles involucradas en el catabolismo de las otras fuentes de carbono son atenuadas cuando hay una alta concentración de glucosa (Kim et al., 2015; Kremling et al., 2015). Esta fase de retardo también podría explicarse por una modificación

en la comunidad microbiana, ya que existe un periodo de adaptación en el que se establecen otros microorganismos que cuentan con las enzimas necesarias para metabolizar el nuevo sustrato (Rombouts et al., 2019).

El efecto diaúxico probablemente no se presenta en los hidrolizados individuales puesto que, a pesar de tener en su composición diferentes tipos de hexosas y pentosas (Tabla 6), la glucosa es el azúcar que se encuentra presente en mayor proporción ya que representa el 74.19% de la composición de azúcares totales en los hidrolizados con Celluclast 1.5 L y 53.98% en los hidrolizados con Cellulase 50 XL; aunque con la adición de Viscozyme los porcentajes de glucosa disminuyen al 38.21% y 45.33% respectivamente. A su vez en los hidrolizados binarios, aumenta la proporción de otros azúcares diferentes a la glucosa: la xilosa presenta un aumento de 9.98% a 20.81% con Celluclast 1.5 L y de 6.10% a 14.05% para Cellulase 50 XL. Mientras que para la galactosa el aumento va de 5.86% a 15.98% empleando Celluclast 1.5 L y de 19.02% a 37.99% con Cellulase 50 XL. La caracterización de los azúcares individuales en los hidrolizados enzimáticos permite explicar la diauxia, la cual es debida a la presencia de pentosas y otros azúcares no identificados, principalmente.

En el caso de Stonezyme (Figura 6 e) se observa que es el hidrolizado con el que se obtiene el menor volumen acumulado de H₂ y alcanza su estado estable aproximadamente en la hora 49 ya que, posteriormente, tanto la producción de H₂ como el consumo de azúcares es mínimo. Se observa de igual manera que se tiene una alta concentración de azúcares sin consumir (1.83 g/L), con 0.64 g/L de glucosa remanente.

En el Anexo 3 se presenta la producción de H₂ y el consumo de carbohidratos para los controles enzimáticos. En el caso de Stonezyme se observa que el control enzimático (buffer + preparación enzimática) contribuye en un 69% a la actividad hidrogenogénica, este valor se encuentra dentro del rango de 53-80% reportado previamente por Tapia-Rodríguez et al. (2019) para la contribución de los controles enzimáticos en la producción de H₂ en sistemas en lote. En el caso de Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL, la contribución por parte de la preparación enzimática es

menor ya que los valores se encuentran entre 9% y 34% (más detalles en Anexo 3). Esta diferencia se debe principalmente a la concentración de enzima empleada en cada una de las hidrolisis, ya para el caso específico de Celluclast 1.5 L, Tapia-Rodríguez et al., (2019) emplean una concentración de 40.26 mL Celluclast 1.5 L/L buffer teniendo una contribución en la producción de H₂ del 64%, mientras que en este estudio se empleó 11.72 mL Celluclast 1.5 L /L buffer y el control enzimático presenta una contribución del 34%.

En la Tabla 7 se presentan los parámetros cinéticos de producción de H₂ obtenidos para los hidrolizados enzimáticos a partir del modelo modificado de Gompertz. En los casos que se presentó un crecimiento diaúxico, se determinó la velocidad de producción para ambas fases. Sin embargo, con el objetivo de realizar una comparación entre los sistemas evaluados, se reportan los parámetros de VVPH, R_{max} y λ obtenidos para la primera fase de la diauxia.

En los ensayos con hidrolizados enzimáticos se tiene un consumo de azúcares totales que se encuentra en el rango de 62-85%, siendo el hidrolizado obtenido a partir de Stonezyme el que presenta el menor consumo de carbohidratos (62 %), mientras que con Cellulase 50 XL – Viscozyme se obtiene el mayor consumo de azúcares totales (85%). Estos valores se encuentran dentro del rango reportado previamente por Tapia-Rodríguez et al., (2019) para ensayos en lote con hidrolizados enzimáticos (61-75%).

Tabla 7. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz con los diferentes hidrolizados enzimáticos

Hidrolizado	Consumo AT (%)	H _{max} (L H ₂ /L)	λ (d)	R _{max} (L H ₂ /d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	Rendimiento específico (L H ₂ /kg bagazo)
Celluclast 1.5L	77	1.87 ± 0.10	0.34 ± 0.12	0.75 ± 0.15	2.09 ± 0.42	82.08 ± 4.42
Celluclast 1.5L - Viscozyme	69	1.69 ± 0.09	0.32 ± 0.01*	1.59 ± 0.44*	4.42 ± 0.44*	65.07 ± 3.47
Cellulase 50XL	77	1.31 ± 0.13	0.20 ± 0.04	0.70 ± 0.05	1.94 ± 0.14	51.91 ± 5.06
Cellulase 50XL - Viscozyme	85	1.42 ± 0.06	0.41 ± 0.00*	1.42 ± 0.06*	3.94 ± 0.17*	62.16 ± 2.60
Stonezyme	62	1.02 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.83 ± 0.10	2.32 ± 0.26	45.73 ± 3.64

*Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la primera fase de la producción de H₂ en los hidrolizados que presentaron una curva diauxica

Al analizar la productividad de H₂ se observó que la VVPH presenta un aumento de hasta 2 veces con la adición de Viscozyme ya que los valores obtenidos van de 2.09 ± 0.42 L H₂/L-d a 4.42 ± 0.44 L H₂/L-d en los hidrolizados con Celluclast 1.5 L y para el caso de Cellulase 50 XL van de 1.94 ± 0.14 L H₂/L-d a 3.94 ± 0.17 L H₂/L-d.

En el caso del hidrolizado obtenido a partir de Stonezyme, debido a que la composición de azúcares es muy similar a la obtenida con el hidrolizado de Celluclast 1.5 L – Viscozyme (Tabla 6), era de esperar un perfil parecido tanto en el consumo de carbohidratos como en la producción de H₂. Sin embargo, el volumen de H₂ máximo acumulado es menor en un 40% con Stonezyme, mientras que su VVPH (2.32 ± 0.26 L H₂/L-d) es aproximadamente la mitad de la reportada para el hidrolizado de Celluclast 1.5 L – Viscozyme.

Debido a que la mezcla binaria Celluclast 1.5 L -Viscozyme presentó los mejores resultados en VVPH (Tabla 7) y que a pesar de su alto índice de sacarificación y composición de azúcares Stonezyme alcanza únicamente la mitad de la VVPH obtenida con la mezcla binaria, se tomó la decisión de estudiar en mayor detalle estos hidrolizados. De esta manera, se evaluaron los denominados hidrolizados sintéticos en donde se replicaron las concentraciones de los azúcares identificados en los hidrolizados enzimáticos (**Tabla 6**. Composición de los hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de bagazo de agave determinada por HPLC Tabla 6) a partir de azúcares grado reactivo. Esto con la finalidad de determinar el efecto de cada uno de los azúcares presentes y, en caso dado, determinar también el posible efecto de las preparaciones enzimáticas en la producción de H₂. Tales resultados se presentan posteriormente.

En la Figura 7 se muestra la caracterización de los azúcares presentes en los hidrolizados enzimáticos al inicio y final de la producción de H₂. En el caso del consumo de la xilosa se presentan valores mayores a 90% (92.5-99.99%) en todos los ensayos, mientras que para la glucosa y la galactosa su consumo fue de hasta 80% en los hidrolizados con Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL evaluados de manera individual y en mezcla binaria con Viscozyme.

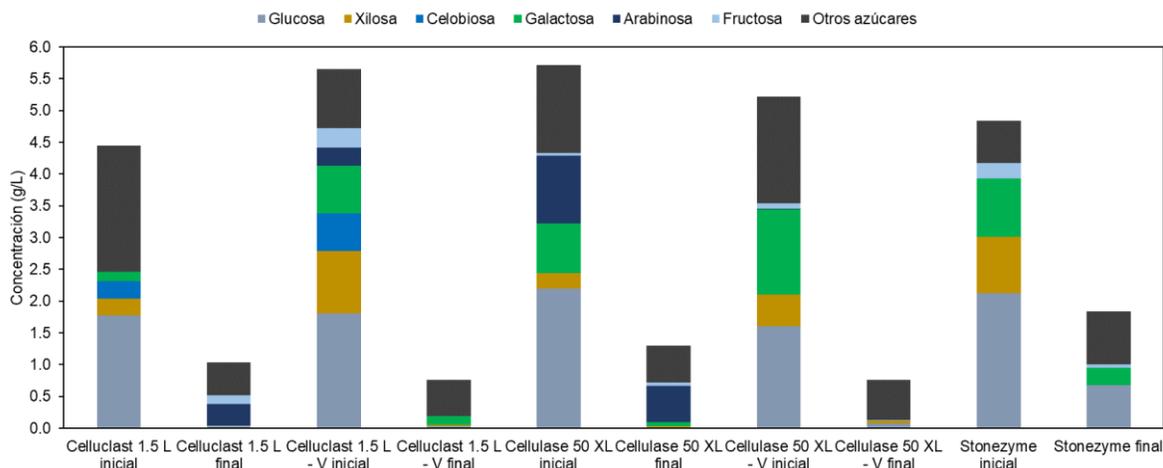


Figura 7. Consumo de azúcares específicos durante la producción de hidrógeno en lote a partir de diferentes hidrolizados enzimáticos.

Como se mencionó previamente, los hidrolizados obtenidos con la mezcla binaria Celluclast 1.5 L – Viscozyme y Stonezyme presentan concentraciones similares de glucosa, xilosa, galactosa y fructosa, además de que su relación G:X es prácticamente la misma; la principal diferencia radica en que el hidrolizado Celluclast 1.5 L – Viscozyme contiene celobiosa y arabinosa mientras que el de Stonezyme no. Sin embargo, mientras que en los hidrolizados a partir de Celluclast 1,5 L y Cellulase 50 XL se reporta un consumo de glucosa en el rango de 85.6%-99.8%, con Stonezyme se tiene un bajo consumo de glucosa, galactosa y azúcares totales; 68.2%, 70.6% y 62.0%, respectivamente (más detalles en Anexo 3).

De esta forma, a pesar de que la actividad celulolítica y hemicelulolítica de Stonezyme es buena ya que presenta una alta liberación de azúcares totales (Tabla 6), se observa un bajo rendimiento en el consumo de glucosa, galactosa y azúcares totales.

En cuanto al consumo de fructuosa, en los hidrolizados en los que se usó Viscozyme como enzima accesoria, se presenta un consumo de hasta un 80%. En el caso de los hidrolizados individuales se difiere de estos resultados, ya que con el hidrolizado individual de Celluclast 1.5 L en lugar de existir un consumo se presentó un aumento, y en el caso de Cellulase 50 XL, parece no existir un consumo de esta hexosa. Esto probablemente se encuentre asociado a que dentro de los azúcares no identificados por HPLC (Tabla 6) se encuentran polisacáridos y oligosacáridos,

como los celuoligosacáridos, xilooligosacáridos y fructooligosacáridos (López-Gutiérrez, 2015; Lopez et al., 2003), puesto que el método ácido sulfúrico-fenol para azúcares totales, tiene la capacidad de determinar oligosacáridos (Saha and Brewer, 1994). Por lo tanto, se puede inferir que estos azúcares son hidrolizados posteriormente durante la fermentación oscura, ya que para emplear el hidrolizado en la producción de H₂ no se realiza una eliminación de la preparación enzimática empleada en el pretratamiento, de tal manera que es factible que en el fermentador continúe la hidrólisis de azúcares presentes en la fracción líquida.

En la Figura 8 se presenta la producción de AGV durante la cinética de H₂, en donde la presencia mayoritaria corresponde al acetato y butirato para los cuatro hidrolizados analizados (entre 40% y 50% de la concentración de AGV total), lo cual es consistente con las rutas metabólicas conocidas para la producción de H₂.

En los hidrolizados individuales de Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL se presenta una mayor concentración de AGV acumulados en los sistemas en lote durante la producción de H₂ con respecto a los hidrolizados obtenidos con las mezclas binarias con Viscozyme, lo cual puede estar asociado a lo discutido previamente sobre la presencia de oligosacáridos en estos hidrolizados enzimáticos individuales. A pesar de que en la determinación de los azúcares totales no es perceptible este proceso de liberación de azúcares simples como la glucosa o xilosa a partir de la hidrólisis de los oligosacáridos, es factible que la fermentación e hidrólisis de carbohidratos se lleven a cabo de manera simultánea. Este aprovechamiento de los oligosacáridos se aprecia en una mayor concentración de metabolitos en los hidrolizados individuales.

De igual manera, es conveniente destacar que los hidrolizados individuales, son los únicos que presentan producción de lactato durante la fermentación, lo cual también se ha asociado previamente al metabolismo de los oligosacáridos como los xilooligosacáridos (Cao et al., 2019; Fritsch et al., 2015; Zhang et al., 2015).

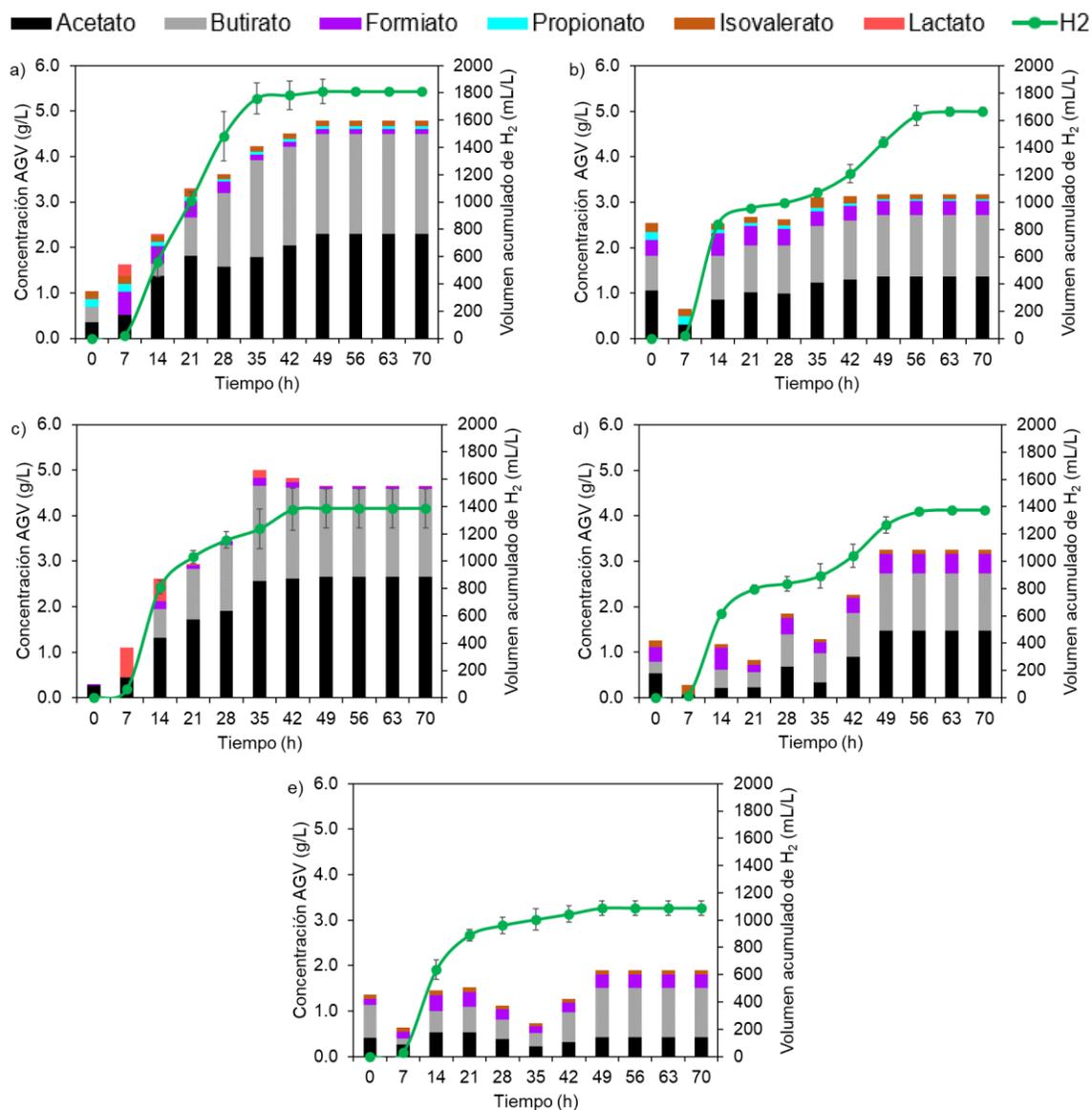


Figura 8. Cinética de producción de AGV en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL – Viscozyme (d), Stonezyme (e).

Como se discutió previamente en la sección 4.1, los hidrolizados que utilizan a Viscozyme como enzima accesoria presentan mayores concentraciones iniciales de acetato y butirato que los hidrolizados evaluados de manera individual, tendencia que se mantiene en cada uno de los ensayos.

Stonezyme es el hidrolizado con el que se obtiene la menor concentración de AGV, esto se encuentra asociado a que es el hidrolizado que tiene la mayor concentración

de azúcares no fermentables (en la Figura 6 se observa que 1.8 g/L de azúcares totales no se consumieron).

En la Figura 9 se muestra el balance de DQO para cada uno de los ensayos de producción de H₂.

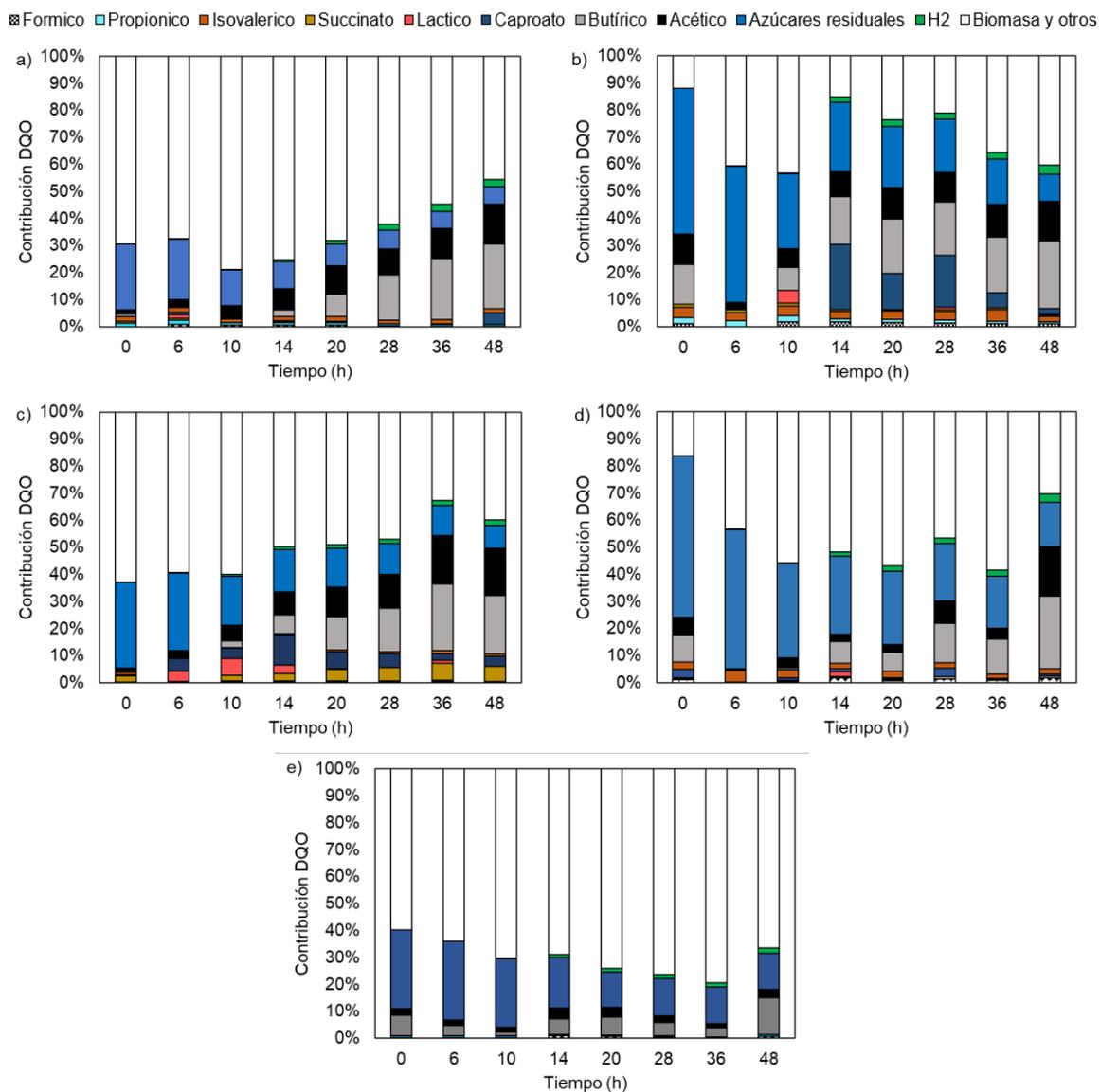


Figura 9. Perfil de contribución de DQO en la producción de H₂ en lote empleando los hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL – Viscozyme (d), Stonezyme (e).

Se observa que la contribución inicial de acetato y butirato disminuye en las primeras horas. Sin embargo, en este periodo la producción de H₂ es casi nula, y no existe acumulación de otro metabolito, por lo que se podría especular que los e⁻

tanto del acetato como del butirato son utilizados en el sistema para la síntesis de biomasa.

El uso de los electrones del acetato y butirato en la síntesis y enriquecimiento de biomasa dentro de la fermentación oscura ha sido descrito previamente por Wu et al. (2012) y Liu et al. (2020). Se ha observado que las concentraciones iniciales de estos ácidos permiten aumentar la velocidad volumétrica de producción de H₂ tal como demostró Liu et al., (2020) al evaluar diferentes hidrolizados de biomasa lignocelulósica, mostrando que para favorecer la fermentación oscura debe existir una relación entre la concentración inicial de acetato y glucosa, por lo que los autores proponen una concentración óptima de acetato por debajo de 1.3 g/L para mejorar el rendimiento de H₂.

Por otro lado, Arreola-Vargas et al. (2016) demostraron previamente la inhibición por acetato en la fermentación oscura empleando hidrolizados ácidos de bagazo de agave, indicando que el ácido acético altera la fuerza iónica y llega a modificar la estructura celular de los microorganismos fermentadores. La concentración de ácido acético presente en esos hidrolizados ácidos fue de 7.7 ± 2.6 g/L y contenía otros compuestos inhibidores como furanos y fenoles. Sin embargo, en los ensayos realizados en el presente estudio parece no existir una inhibición por acetato, ya que el hidrolizado obtenido con Celluclast 1.5 L – Viscozyme es el que tiene la mayor concentración inicial de acetato en los ensayos en lote (1.1 ± 0.1 g/L) y a su vez presenta la mayor VVPH (4.43 ± 0.44 L H₂/L-d). Esta concentración inicial de acetato parece estar correlacionada con la VVPH ($R^2=0.79$), en estos ensayos en lote (ver más detalles Anexo 5). probablemente por el hecho de que la presencia de estos ácidos favorece en el sistema la síntesis de biomasa y esto se ve reflejado en una mayor VVPH.

Esta síntesis de biomasa para la producción de H₂ se observa en el estudio realizado por Matsumoto & Nishimura (2007), ya que en presencia de ácido láctico se favorece la vía acetato-lactato para la producción de H₂ y butirato, sin embargo, cuando se encuentra únicamente el acetato este es empleado para la síntesis de

biomasa. De igual manera, Wu et al. (2012) plantean que al emplear el acetato para enriquecer la producción de biomasa, se obtiene una mejor producción de H₂ y AGV.

4.3 Efecto de la composición de los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno a partir de azúcares grado reactivo

Con la finalidad de observar el efecto de cada uno de los azúcares presentes y, en caso dado, determinar también la posible contribución por parte de las preparaciones enzimáticas en la producción de hidrógeno, se realizaron ensayos replicando las concentraciones de azúcares identificados en los hidrolizados enzimáticos a partir de Celluclast 1.5 L -Viscozyme y Stonezyme, utilizando azúcares grado reactivo, estos ensayos se denominaron como hidrolizados sintéticos. Con el propósito de comparar los resultados obtenidos tanto con el hidrolizado enzimático como con el sintético, en la Figura 10 se presenta la producción de H₂ y el consumo de azúcares.

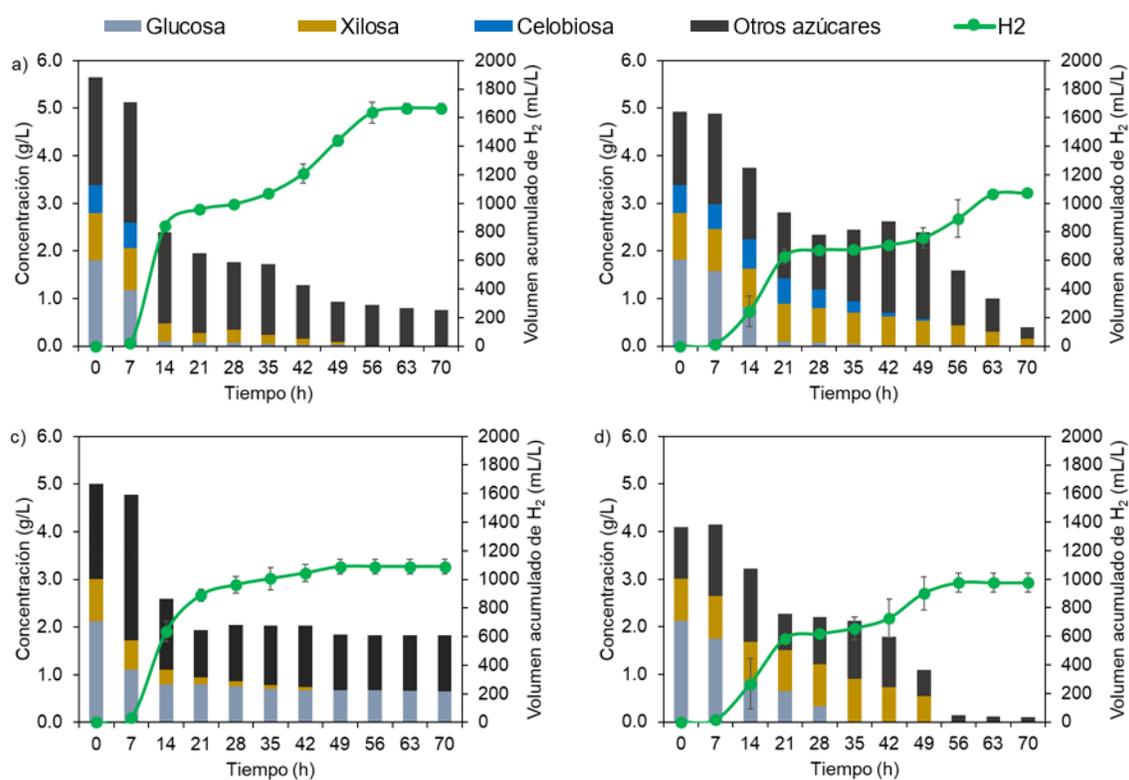


Figura 10. Comparación de la producción de hidrógeno y el consumo de azúcares entre los hidrolizados enzimáticos y sintéticos. Celluclast 1.5 L – Viscozyme (a), Celluclast – Viscozyme^{Sintético} (b), Stonezyme (c) y Stonezyme^{Sintético} (d)

Contrario a lo que se esperaba, se observa que en el caso de Stonezyme el hidrolizado sintético (Figura 10 d) alcanza un volumen acumulado de H₂ del 97% del hidrolizado enzimático (Figura 10 c), mientras que el hidrolizado sintético de Celluclast 1.5 L – Viscozyme (Figura 10 b) produce sólo un 65% del volumen logrado con el hidrolizado real (Figura 10 a).

En el caso del hidrolizado enzimático de Celluclast 1.5 L – Viscozyme (Figura 10 a) se observa que la celobiosa se consume en las primeras 14 horas mientras que en el caso del hidrolizado sintético (Figura 10 b) se consume después de las 49 horas. En el hidrolizado sintético se puede apreciar un consumo secuencial en donde se consume mayoritariamente en las primeras 14 horas la glucosa, posteriormente se continua con el consumo de celobiosa de la hora 21 a la hora 48 para finalizar consumiendo la xilosa presente en el medio en las últimas horas.

En el caso de Stonezyme, en el hidrolizado enzimático se observa una curva típica de producción de H₂ (Figura 10 c) mientras que en el hidrolizado sintético se presenta un efecto diaúxico (Figura 10 d). Esta diferencia se debe principalmente a que en el hidrolizado enzimático se da un consumo prioritario de la xilosa, mientras que la glucosa presenta un bajo consumo (68%).

En la Tabla 8 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos a partir del modelo modificado de Gompertz tanto de los hidrolizados enzimáticos como los sintéticos. Para los ensayos en los que se presentó el efecto diaúxico, se determinó la velocidad de producción para ambas fases. Sin embargo, con el objetivo de comparar entre los sistemas evaluados, se muestran los parámetros de VVPH, R_{max} y λ obtenidos para la primera fase de la diauxia.

Tabla 8. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz de los diferentes ensayos en los que se replica la composición de Celluclast 1.5 L – Viscozyme y Stonezyme

Hidrolizado	Consumo AT (%)	Hmax (L H ₂ /L)	λ (d)	Rmax (L H ₂ / d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	Rendimiento específico (L H ₂ /g AT consumido)
Celluclast 1.5L – Viscozyme	69	1.69 ± 0.09	0.32 ± 0.01*	1.59 ± 0.44*	4.42 ± 0.44*	0.34 ± 0.02
Celluclast 1.5L – Viscozyme ^{Sintético}	92	1.10 ± 0.08	0.49 ± 0.02*	0.93 ± 0.17*	2.60 ± 0.47*	0.20 ± 0.04
Stonezyme	62	1.02 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.83 ± 0.10	2.32 ± 0.26	0.34 ± 0.03
Stonezyme ^{Sintético}	98	0.99 ± 0.03	0.47 ± 0.07*	0.92 ± 0.14*	2.56 ± 0.38*	0.24 ± 0.03

^{Sintético}Ensayos en los que se replica la composición de los hidrolizados enzimáticos a partir de azúcares grado reactivo.

* Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la primera fase de la producción de H₂ en los ensayos que presentaron una curva diaúxica

Al comparar los hidrolizados sintéticos de Celluclast 1.5 – Viscozyme y Stonezyme se observa que los valores de VVPH son prácticamente iguales; 2.60 ± 0.47 L H₂/L–d y 2.56 ± 0.38 L H₂/L–d respectivamente. A su vez, la VVPH del hidrolizado enzimático de Stonezyme es muy similar a la de los hidrolizados sintéticos (2.32 ± 0.26 L H₂/L–d). Sin embargo, estos valores son menores que la VVPH del hidrolizado enzimático de Celluclast 1.5 L – Viscozyme (4.43 ± 0.44 L H₂/L–d).

Esta comparación entre el hidrolizado enzimático y sintético de Stonezyme permite suponer que no existe algún compuesto inhibitorio en la preparación enzimática de Stonezyme, por el contrario, este hidrolizado alcanza su máximo potencial de producción, empleando únicamente los azúcares determinados en la caracterización por HPLC (glucosa, xilosa, celobiosa, galactosa y fructosa). Por otro lado, existe una diferencia considerable en el consumo de azúcares totales entre el hidrolizado enzimático y sintético (62% y 98% respectivamente), pero como ya se mencionó, tanto el volumen acumulado de H₂ y la VVPH son prácticamente iguales.

Esto se encuentra asociado con la caracterización de los hidrolizados enzimáticos ya que el método ácido sulfúrico-fenol empleado para determinar la concentración de azúcares totales, tiene la capacidad de determinar compuestos como los

oligosacáridos y glicoproteínas (Saha and Brewer, 1994) y enzimas como las celulasas y xilanasas utilizadas para la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica, se han identificado previamente como glicoproteínas (Larumbe, 1992; Polizeli et al., 2005; Silva et al., 2015). De esta manera, la cantidad de azúcares fermentables se está sobre-estimando en el hidrolizado de Stonezyme y lograr productividades similares de H₂ con ambos hidrolizados a pesar de que el hidrolizado enzimático presenta un bajo consumo de azúcares totales (62%), permite suponer que del 14% de la concentración de los azúcares totales no identificados en la caracterización por HPLC (Tabla 6), una parte corresponde a las enzimas que contiene la preparación enzimática de Stonezyme.

A pesar de que todos los hidrolizados tienen cierto porcentaje de glicoproteínas en su composición, ya que no se realiza una separación enzima-hidrolizados al finalizar la hidrólisis enzimática, este efecto es más evidente en el caso de Stonezyme ya que la concentración de proteína empleada es aproximadamente de 3.03 g/L, mientras que con Celluclast 1.5 L y Celluclast 50 XL evaluados de manera individual y empleando a Viscozyme como enzima accesoria, la concentración de proteína empleada se encuentra entre los 0.38 y 0.80 mg/L (más detalles en Anexo 1).

Esta concentración de proteína se corrobora a partir de la caracterización realizada en el punto inicial y final de la cinética de H₂ a partir de los hidrolizados enzimáticos (Figura 7), en donde en el caso de Stonezyme se tiene una concentración de otros azúcares de 0.83 g/L en el punto final de la cinética (más en detalles Anexo 4), y al considerar que para realizar la cinética de producción de H₂ se realizó una dilución del hidrolizado 5/17.74, se tiene una concentración de 2.94 g/L de otros azúcares. Este valor corresponde a la concentración de proteína empleada en la hidrólisis enzimática de Stonezyme. Por lo tanto, se concluye que la determinación de los azúcares totales en Stonezyme por el método ácido fenol-sulfúrico sobreestima la concentración de los azúcares presentes en el hidrolizado y su composición se comprende principalmente de los monosacáridos identificados en este estudio (glucosa, xilosa, galactosa y fructosa).

En cuanto a las diferencias obtenidas entre el hidrolizado enzimático y sintético de Celluclast 1.5 L – Viscozyme, probablemente se encuentran relacionadas con que durante la hidrólisis enzimática se presenta una acumulación de celobiosa lo cual favorece una inhibición por sustrato. Previamente se ha reportado que este disacárido inhibe la actividad enzimática de las celulasas durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Andrić et al., 2010; Van Dyk & Pletschke, 2012). Razón por la cual, en las preparaciones enzimáticas comerciales se incluye la β -glucosidasa, encargada de hidrolizar las moléculas de celobiosa. Sin embargo, la actividad de las β -glucosidasas es inhibida a su vez por la presencia de glucosa, por lo que para evitar disminuir su actividad enzimática, se recomienda tener una relación 2:1 de celulasa y β -glucosidasa (Samayam & Schall, 2010; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Sin embargo, en las preparaciones enzimáticas de Celluclast 1.5 y Viscozyme se tiene una mayor actividad de celulasas que de β -glucosidasa: 54 FPU/mL y 0.72 U/mL en Celluclast 1.5 L y 6.24 FPU/mL y 4.60 U/mL para Viscozyme, respectivamente. En la Figura 10 a y b se observa que en el hidrolizado enzimático de Celluclast 1.5 L – Viscozyme la celobiosa se consume más rápidamente que en el hidrolizado sintético a pesar de tener la misma concentración de celobiosa y utilizar el mismo inóculo en ambos ensayos.

Por este consumo de celobiosa en las primeras horas de la cinética empleando el hidrolizado enzimático de Celluclast 1.5 L – Viscozyme se especula que en una primera instancia la actividad de las β -glucosidasas es inhibida por la glucosa liberada durante la hidrólisis enzimática y posteriormente, al no continuar con la hidrólisis de la celobiosa se presenta una acumulación en el medio, disminuyendo de esta manera la actividad de las celulasas. Por consiguiente, durante la producción de H_2 una vez que se presenta un consumo inicial de glucosa, las β -glucosidasas continúan con la hidrólisis de la celobiosa y de esta manera se elimina la inhibición por sustrato de las celulasas y lo cual permite la hidrólisis de la celulosa soluble que se encuentra suspendida en la fracción líquida.

Cabe mencionar que esta hidrólisis no es apreciable de manera directa en el seguimiento de los azúcares debido a que se supone que la hidrólisis y fermentación

se lleva a cabo de manera simultánea y la biomasa ya se ha establecido en las primeras horas del proceso, por lo que la celobiosa y glucosa liberadas por la hidrólisis de la celulosa son consumidas inmediatamente.

En la Figura 11 se presenta la producción de AGV tanto de los hidrolizados enzimáticos de Celluclast 1.5 L – Viscozyme y Stonezyme como de los sintéticos.

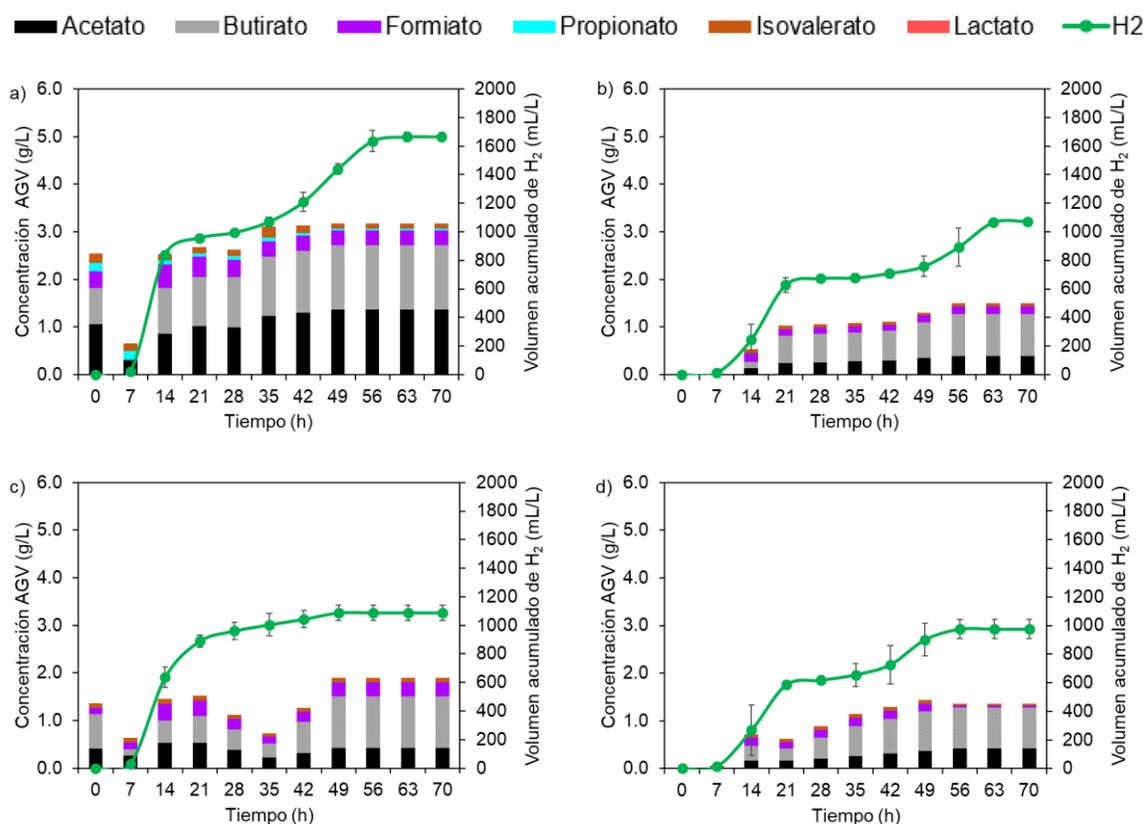


Figura 11. Comparación de la cinética de producción de AGV a partir de los hidrolizados enzimáticos y los ensayos en los que se simula su composición a partir de azúcares grado reactivo. Celluclast 1.5 L – Viscozyme (a), Celluclast 1.5 L-Viscozyme^{Sintético} (b), Stonezyme (c), Stonezyme^{Sintético} (d)

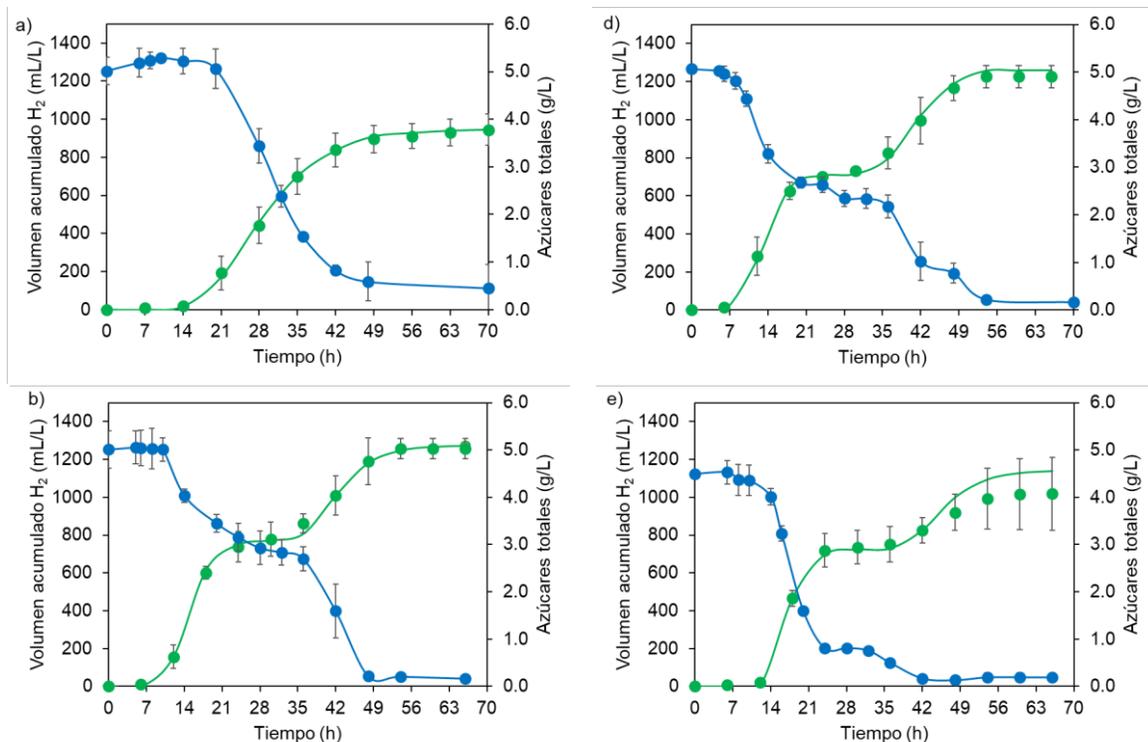
En el caso del hidrolizado sintético de Celluclast 1.5 L – Viscozyme la concentración de AGV representa el 47.08% de la obtenida con el hidrolizado enzimático, esto contribuye en la hipótesis de que durante la fermentación oscura se está llevando a cabo de manera simultánea la hidrólisis de celulosa que se mencionó previamente, ya que si la liberación de glucosa y celobiosa no se aprecia en el seguimiento de los azúcares específicos, se observa en la diferencia que se presenta entre el

hidrolizado enzimático y sintético de Celluclast 1.5 L – Viscozyme en la concentración de AGV, en la VVPH y el volumen acumulado de H₂.

En el caso del hidrolizado enzimático de Stonezyme se tiene una concentración de 1.50 g AGV/L mientras que en el sintético es de 1.28 g AGV/L. Por lo que la concentración de AGV del hidrolizado sintético corresponde al 84.8% del hidrolizado enzimático. Esta similitud entre las concentraciones obtenidas de AGV es consistente con los resultados obtenidos tanto en el consumo de azúcares como en los parámetros cinéticos de la producción de H₂.

4.4 Efecto de la relación glucosa:xilosa en la producción de hidrógeno

Debido a que se presentaron diferentes relaciones glucosa:xilosa en los hidrolizados enzimáticos evaluados, se planteó la posibilidad de que dicha relación podría tener algún efecto en la VVPH. En la Figura 12 se presenta tanto la producción de H₂ como el consumo de azúcares totales para cada una de las relaciones G:X evaluadas, así como para la xilosa y glucosa evaluados de manera individual.



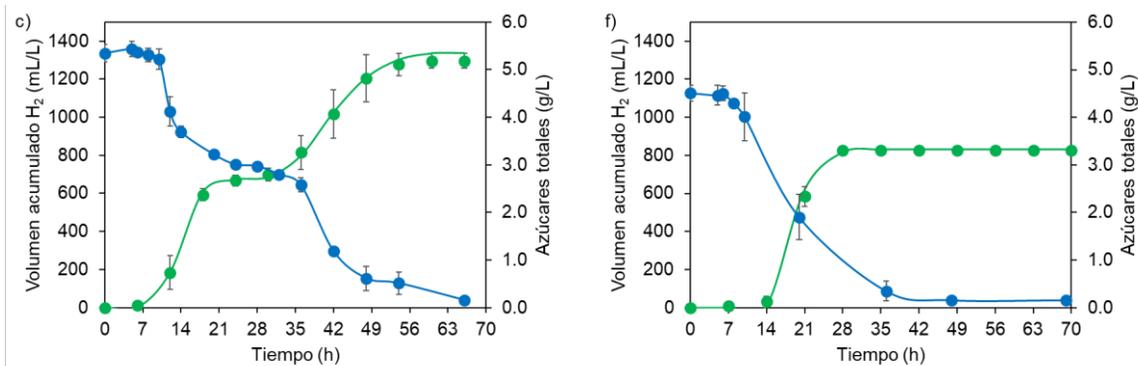


Figura 12. Efecto de la relación glucosa-xilosa en la producción de hidrógeno. (a) 0:1, (b) 2:1 (c) 3.75:1, (d) 5.5:1, (e) 9:1, (f) 1:0. Producción de hidrógeno (●). Consumo de azúcares totales (●).

El efecto diaúxico se presentó en todos los ensayos en los que se utilizó de manera conjunta glucosa y xilosa, independientemente de la relación empleada, mientras que, en los ensayos en los que se evaluó de manera individual glucosa y xilosa se observa la curva típica de producción de H₂.

En cuanto al aprovechamiento de la fuente de carbono presente en el medio, la glucosa permite que el consumo de azúcares totales comience en etapas más tempranas, ya que en el ensayo que contiene exclusivamente xilosa (relación glucosa:xilosa de 0:1) se inicia el consumo de azúcares a partir de la hora 21 aproximadamente, mientras que cuando se tiene glucosa presente en el medio, independientemente de la relación G:X utilizada, el consumo de azúcares totales comienza entre las 8 y 10 horas. Esto se explicaría por qué el consorcio microbiano presente en el inóculo inicial no emplea a la xilosa de manera habitual por lo que requiere un periodo de adaptación más largo para poder usar esta pentosa. Para corroborar esta hipótesis es necesario realizar un estudio de la dinámica de población en los ensayos con xilosa y glucosa, con el propósito de determinar que microorganismos se encuentran en mayor abundancia para el aprovechamiento de cada uno de estos azúcares.

En la Tabla 9 se presentan los parámetros cinéticos de producción de H₂ para cada una de las relaciones glucosa:xilosa evaluadas. Se establecieron dos fases para los parámetros de λ , R_{max} y VVPH, debido a que en todas las relaciones se presentó el efecto diaúxico característico de los medios que contienen más de una fuente de

carbono y para obtener los parámetros cinéticos se empleó la Ecuación 4, en donde se tienen dos términos de producción de H₂.

Se observa que efectivamente existe un aumento de la VVPH en los ensayos en los que la glucosa se encuentra presente, ya que en el caso que se emplea la xilosa de forma individual se presenta la menor VVPH (1.04 ± 0.15 L H₂/L-d). Sin embargo, entre las diferentes relaciones G:X evaluadas, no existe alguna diferencia significativa en términos de VVPH ($p > 0.05$).

Esta consistencia en los resultados obtenidos para la producción de hidrógeno empleando diferentes relaciones glucosa-xilosa se debe a que, en este estudio se empleó un consorcio microbiano, mientras que, en los estudios en los que se observa el efecto que tal relación tiene sobre los rendimientos de H₂ se han empleado cepas puras (Kim et al., 2015; Zhao et al., 2018).

Por esta razón, un consorcio microbiano resulta ser más efectivo que una cepa pura cuando se trata de mezclas de sustratos como lo son los hidrolizados a partir de residuos lignocelulósicos. Como se pudo determinar la composición de estos hidrolizados dependerá del tipo de enzimas empleadas en el proceso de hidrólisis y de la estructura del bagazo de agave.

Las fracciones de celulosa y hemicelulosa del bagazo de agave son variables ya que se encuentran en función de la temporada de cultivo y las condiciones ambientales que tuvo durante su cosecha; entre las condiciones que destacan para determinar la composición del bagazo de agave se encuentran el tipo de suelo, precipitación, variabilidad del clima, sequías, inundaciones y temperatura. Estos parámetros ambientales tienen un efecto directo en el desarrollo y maduración de estas plantas tipo CAM (Kestur G. et al., 2013; Perez-Pimienta et al., 2015).

Tabla 9. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz para las diferentes relaciones glucosa-xilosa

Relación Glucosa:Xilosa	Fase	Consumo AT (%)	H_{max} (L H ₂ /L)	λ (d)	R_{max} (L H ₂ / d)	VVPH (L H ₂ /L-d)
0:1	I	91.04	0.95 ± 0.08	0.72 ± 0.05	0.37 ± 0.06	1.04 ± 0.16
	I			0.43 ± 0.03	0.79 ± 0.02	2.20 ± 0.07
2:1	II	97.70	1.27 ± 0.16	1.50 ± 0.22	0.34 ± 0.06	0.95 ± 0.16
	I			0.43 ± 0.04	0.88 ± 0.11	2.45 ± 0.29
3.75:1	II	97.05	1.38 ± 0.06	1.38 ± 0.08	0.34 ± 0.06	0.96 ± 0.17
	I			0.39 ± 0.03	0.85 ± 0.10	2.36 ± 0.27
5.5:1	II	96.81	1.30 ± 0.09	1.43 ± 0.16	0.35 ± 0.04	0.96 ± 0.12
	I			0.56 ± 0.04	0.92 ± 0.17	2.55 ± 0.48
9:1	II	95.67	1.14 ± 0.17	1.62 ± 0.98	0.74 ± 0.44	0.74 ± 0.44
	I			0.64 ± 0.05	1.04 ± 0.26	2.88 ± 0.32
1:0	I	96.55	0.83 ± 0.01	0.64 ± 0.05	1.04 ± 0.26	2.88 ± 0.32

Sin embargo, como se pudo observar en la evaluación de las diferentes relaciones G:X, el consorcio microbiano empleado tiene la capacidad de adaptarse a las diferentes concentraciones de glucosa y xilosa que se encuentren presentes en los hidrolizados enzimáticos.

4.5 Evaluación de los azúcares individuales presentes en los hidrolizados enzimáticos en la producción de hidrógeno

Con la finalidad de determinar el potencial de VVPH de cada uno de los constituyentes determinados en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos se realizaron cinéticas de manera individual y los resultados se presentan en la Figura 13 se muestran la cinética de producción de H₂ para los azúcares determinados previamente en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos. Se observa que la celobiososa, galactosa y fructosa muestran un perfil diaúxico en la producción de H₂. Este perfil diaúxico corresponde con el reportado previamente por Valdez-Guzmán et al. (2019) para el caso de la galactosa.

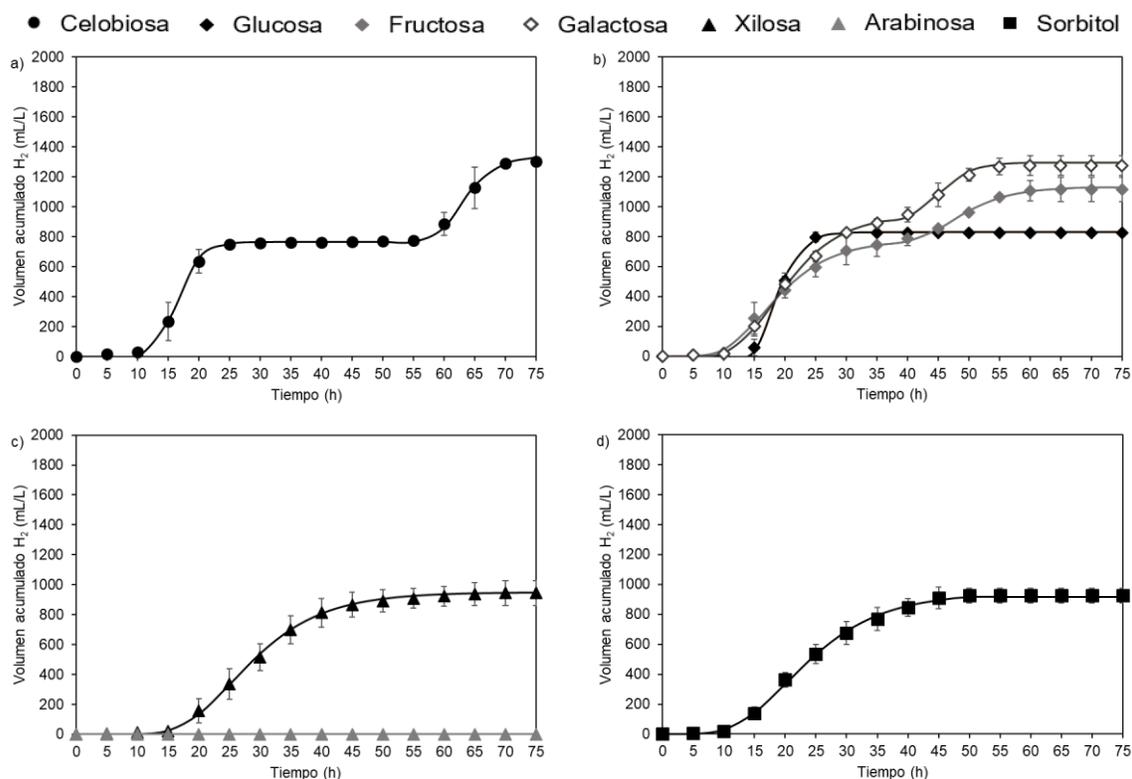


Figura 13. Producción de hidrógeno a partir de los azúcares individuales (grado reactivo) presentes en los hidrolizados enzimáticos. (a) celobiososa; (b) glucosa (◆), fructosa (◇) y galactosa (◇); (c) xilosa (▲) y arabinosa (▲); (d) sorbitol.

En la Tabla 10 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos a partir del modelo de Gompertz para cada uno de los azúcares evaluados. Se establecieron dos fases para los parámetros de λ , R_{\max} y VVPH para los azúcares que presentaron un efecto diaúxico y para obtener los parámetros cinéticos se empleó la Ecuación 4, en donde se tienen dos términos de producción de H_2 .

Se observa que, al emplear glucosa y celobiosa como fuentes de carbono, se obtienen los mayores valores de VVPH, 2.88 ± 0.73 y 2.77 ± 0.47 L H_2 /L-d respectivamente. Estos resultados corresponden con los reportados previamente por Arreola-Vargas et al. (2015b), en donde al comparar los diferentes componentes de los hidrolizados de paja de avena, se obtiene que el azúcar que presenta la mayor VVPH es la celobiosa. En cuanto al H_{\max} no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes azúcares analizados ($p > 0.05$).

Tabla 10. Parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz para los diferentes azúcares evaluados.

Azúcar	Fase	Consumo AT (%)	H _{max} (L H ₂ /L)	λ (d)	R _{max} (L H ₂ /d)	V _{PH} (L H ₂ /L·d)
Glucosa	I	96.55	0.83 ± 0.01	0.64 ± 0.05	1.04 ± 0.26	2.88 ± 0.73
	I			0.54 ± 0.13	1.00 ± 0.17	2.77 ± 0.47
Celobiosa	II	49.32	1.27 ± 0.16	2.44 ± 0.08	0.52 ± 0.09	1.45 ± 0.24
Xilosa	I	91.03	0.95 ± 0.08	0.72 ± 0.05	0.37 ± 0.06	1.04 ± 0.16
	I			0.49 ± 0.04	0.49 ± 0.01	1.37 ± 0.03
Galactosa	II	96.33	1.30 ± 0.13	1.72 ± 0.07	0.34 ± 0.03	0.96 ± 0.09
	I			0.42 ± 0.08	0.40 ± 0.00	1.12 ± 0.01
Fructosa	II	74.82	1.13 ± 0.01	1.74 ± 0.18	0.21 ± 0.01	0.58 ± 0.01
Arabinosa	I	4.07	---	---	---	---
Sorbitol	II	---	0.94 ± 0.05	0.49 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.99 ± 0.11

En la Figura 14 se muestra el balance de DQO para cada uno de los azúcares individuales en la producción de H₂. Se puede observar que para todos los casos los metabolitos mayoritarios son tanto el ácido butírico como el ácido acético, presentándose cierto porcentaje de ácido láctico en la cinética con fructosa y sorbitol.

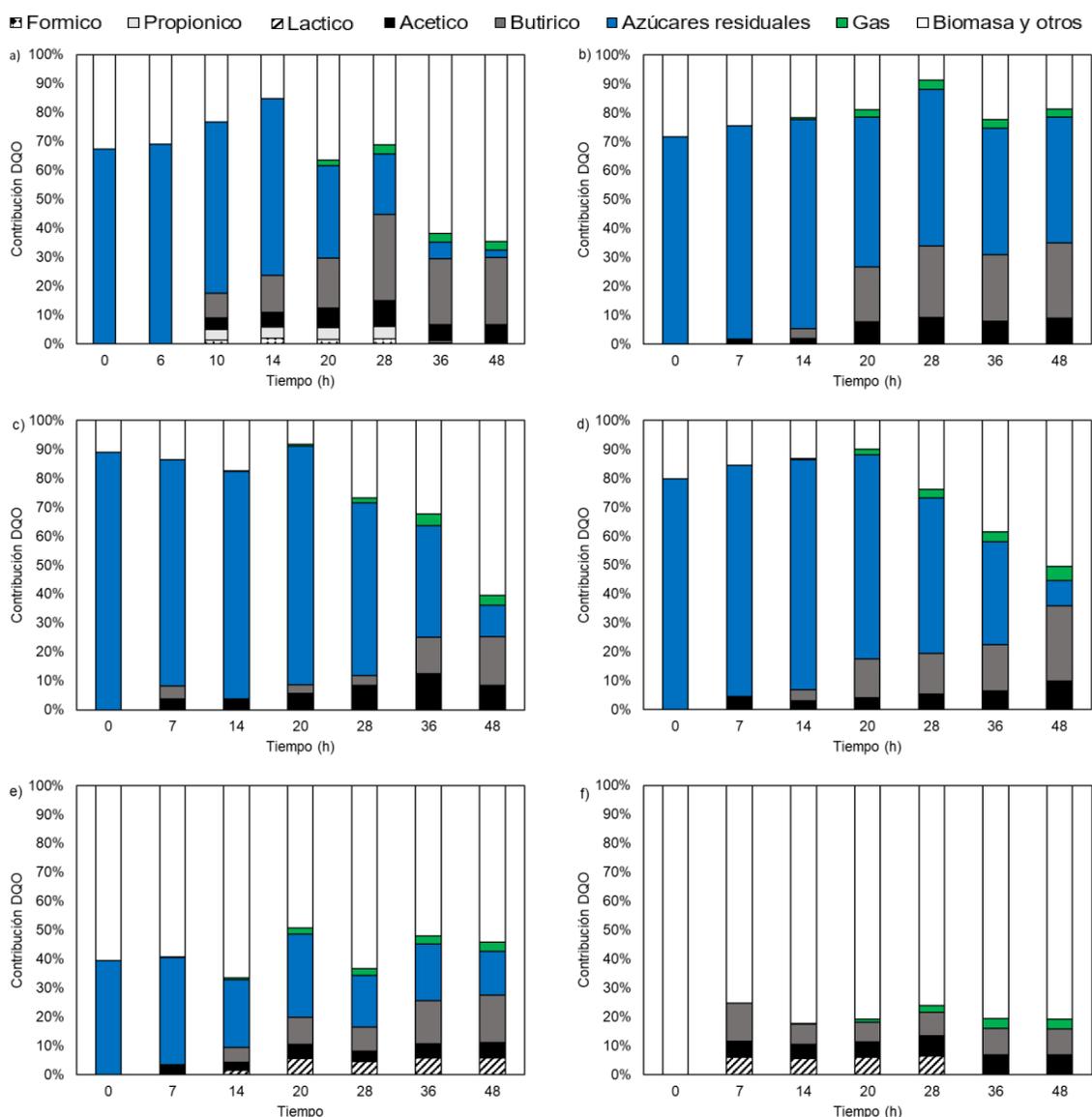


Figura 14. Balance de electrones en la producción de hidrógeno de los diferentes componentes de los hidrolizados enzimáticos. Glucosa (a), Celobiosa (b), Xilosa (c), Galactosa (d), Fructosa (e), Sorbitol (f)

En el caso en el que se empleó a la arabinosa como fuente de carbono no se presentó una producción de H₂ (Figura 13 c) ni de metabolitos y el consumo de

azúcares fue mínimo (Tabla 10). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Valdez-Guzmán et al., (2019), en donde para la producción de H₂ a partir de arabinosa se presenta un volumen acumulado muy bajo.

En la Figura 15 se muestra una recopilación de las diferentes VVPH obtenidas con los hidrolizados enzimáticos y azúcares individuales. Se observa que, si bien los hidrolizados individuales presentan una menor VVPH que la glucosa y celobiosa, tienen una mayor VVPH que los otros azúcares evaluados. Se infiere que la presencia de glucosa en los hidrolizados como azúcar mayoritario incrementa la VVPH en los sistemas de producción de H₂ en sistemas que tienen diferentes fuentes de carbono. Este fenómeno se observó los resultados presentados en la Sección 4.4, en donde se comparó la producción de H₂ de la xilosa de manera individual y en diferentes relaciones con la glucosa. Se determinó que con la presencia de glucosa se obtienen mayores VVPH que cuando se evalúa a la xilosa de manera individual.

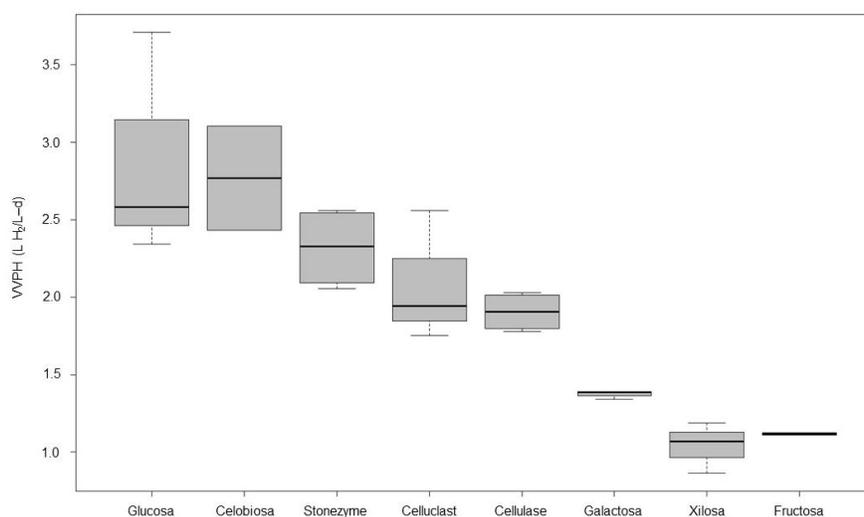


Figura 15. Comparación de las diferentes velocidades volumétricas de producción de hidrógeno obtenidas con los sustratos evaluados (hidrolizados y azúcares puros).

Por lo tanto, para aprovechar los residuos agroindustriales en la fermentación oscura como método de producción de H₂ se debe de considerar que este recurso se encuentra compuesto por diferentes fracciones como la hemicelulosa y la celulosa, y que los pretratamientos empleados para la liberación de estos azúcares

serán un factor determinante para aumentar la producción de H₂. De esta manera, se debe de elegir un pretratamiento que favorezca la presencia de monosacáridos como la glucosa y celobiosa, que han sido identificados como los azúcares con los que se obtienen mayores VVPH.

Una vez que los azúcares se encuentran disponibles en los hidrolizados enzimáticos, en función de su concentración y distribución favorecen el enriquecimiento de ciertos microorganismos que puedan aprovechar en mayor medida las diferentes fuentes de carbono presentes en el medio (Chatellard et al., 2016). Probablemente debido a que el desarrollo de microorganismos se encuentra en función de las diferentes fuentes de carbono presentes en el sistema, ya que se favorece el crecimiento de aquellos que puedan aprovechar en mayor medida estos azúcares (Palomo-Briones et al., 2018b), se explique que no se encuentran diferencias significativas entre las VVPH reportadas para los hidrolizados individuales en los sistemas en lote.

En la Figura 16 se muestra la composición de los hidrolizados enzimáticos y la VVPH alcanzada en cada uno de los ensayos en lote. El hidrolizado con la menor VVPH es el de Cellulase 50 XL (1.94 ± 0.14 L H₂ L⁻¹ d⁻¹) que corresponde al hidrolizado con la mayor concentración de arabinosa; la presencia de este azúcar puede estar influyendo negativamente en la productividad de H₂ ya que el 12.02% de la concentración de azúcares totales de este hidrolizado corresponde a la concentración de arabinosa (2.42 g/L) y como se observó previamente en la evaluación individual de esta pentosa en particular, tiene una nula producción de H₂ (Tabla 10).

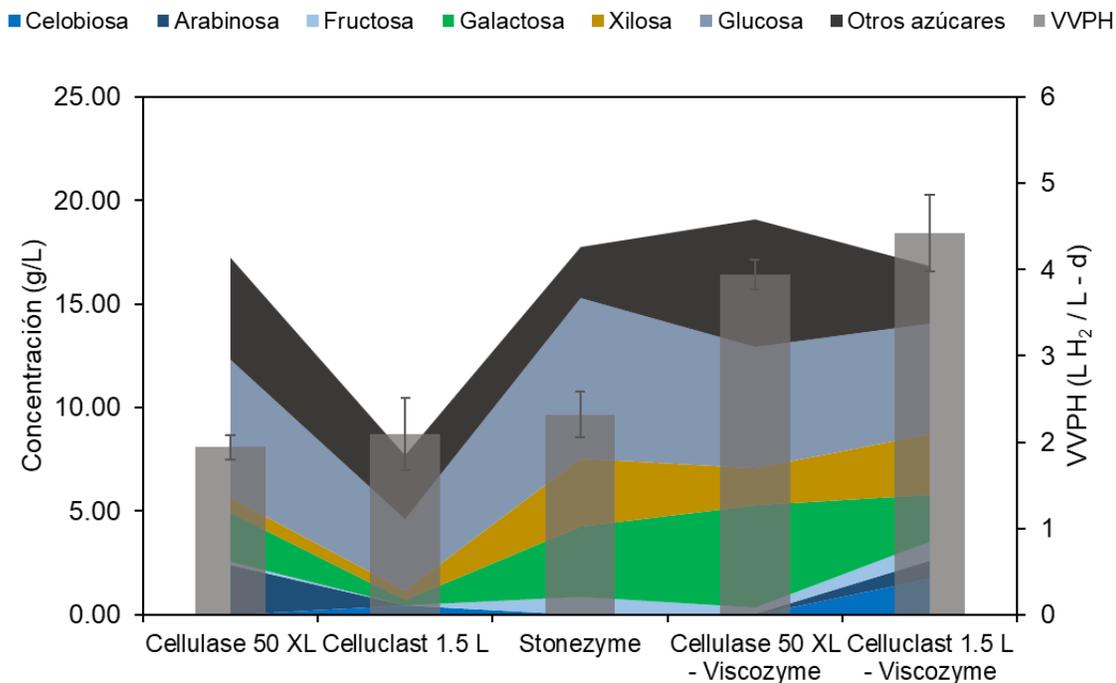


Figura 16. Relación entre la composición de los hidrolizados enzimáticos y su VVPH.

En el caso de Celluclast 1.5 L evaluado de manera individual, se alcanza aproximadamente la misma VVPH que con Cellulase 50 XL (2.09 ± 0.42 L H₂ L-d) a pesar de tener aproximadamente 50% menos concentración de glucosa que el hidrolizado de Cellulase 50 XL. Esta diferencia radica principalmente en el hecho discutido previamente, ya que debido a la relación que existe entre β -glucosidasas y celulasas en la preparación enzimática de Celluclast 1.5 L (0.72 U/L y 54.20 FPU/L, respectivamente), se presenta una acumulación de celobiosas en el hidrolizado lo que inhibe a las celulasas; una vez que esta celobiosa es consumida en la fermentación oscura, las celulasas continúan con hidrólisis de la celulosa soluble presente en el medio.

De igual manera en la Sección 4.1 se discute la posible presencia de otros oligómeros como celooligosacáridos, xilooligosacáridos y fructooligosacáridos (López-Gutiérrez, 2015; Lopez et al., 2003) ya que al analizar la concentración de AGV obtenida en el sistema Celluclast 1.5 L se observa que es 1.51 veces mayor a la reportada para Celluclast 1.5 L – Viscozyme a pesar de que en este hidrolizado se supone que también ocurre la hidrólisis-fermentación simultánea y la

concentración tanto de azúcares totales como de los diferentes azúcares determinados como la glucosa y galactosa es menor en el hidrolizado individual.

En el caso de Stonezyme, con base a la composición de este hidrolizado y los resultados obtenidos en el hidrolizado sintético, se supone que de la concentración de azúcares totales determinada por el método ácido fenol-sulfúrico, la fracción identificada como otros azúcares son prácticamente en su totalidad las glicoproteínas presentes en las celulasas y xilanasas que contiene la preparación enzimática. De esta manera, la fracción fermentable del hidrolizado enzimático de Stonezyme se compone principalmente de los monosacáridos y disacáridos determinados en la caracterización por HPLC.

A pesar de que el volumen acumulado de H₂ entre el hidrolizado enzimático y sintético de Stonezyme es prácticamente el mismo (1.02 ± 0.08 y 0.99 ± 0.03 L H₂/L), se puede observar que la VVPH es ligeramente mayor en el caso del hidrolizado sintético que en el enzimático (2.56 ± 0.38 y 2.32 ± 0.26 L H₂/L-d, respectivamente), esto se atribuye a que en el hidrolizado enzimático se tiene un consumo de 68% para la glucosa, mientras que en el sintético prácticamente se tiene un consumo total. Anteriormente se observó que evaluar diferentes concentraciones de glucosa en la evaluación de diferentes relaciones G:X, la utilización de la glucosa por parte de los microorganismos aumenta la VVPH (Tabla 9).

En los hidrolizados de Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL que emplean a Viscozyme como enzima accesoria, se atribuye una mayor VVPH principalmente a la concentración inicial de acetato y butirato (Tabla 5) los cuales son aprovechados para la síntesis de biomasa. Esto permite disminuir el tiempo de latencia en los sistemas en lote y aumentar la VVPH.

Cabe mencionar que aún debe llevarse a cabo el estudio de ecología microbiana de los ensayos realizados para determinar la abundancia y distribución de las especies, de tal manera que se relacione la composición de cada uno de los hidrolizados enzimáticos con los microorganismos presentes en el sistema.

4.6 Comparación de la producción de H_2 a partir de los hidrolizados enzimáticos en procesos continuos

Los hidrolizados evaluados en este estudio, han sido evaluados previamente en la producción de hidrógeno en procesos continuos en tanque agitado (CSTR). En la Figura 17 se muestra una recopilación de las VVPH obtenidas previamente por Montiel-Corona & Razo-Flores (2018), Montoya-Rosales et al. (2019) y Valencia-Ojeda (2019) empleando los hidrolizados enzimáticos a diferentes COV (g AT/L-d) en sistemas continuos de tanque agitado.

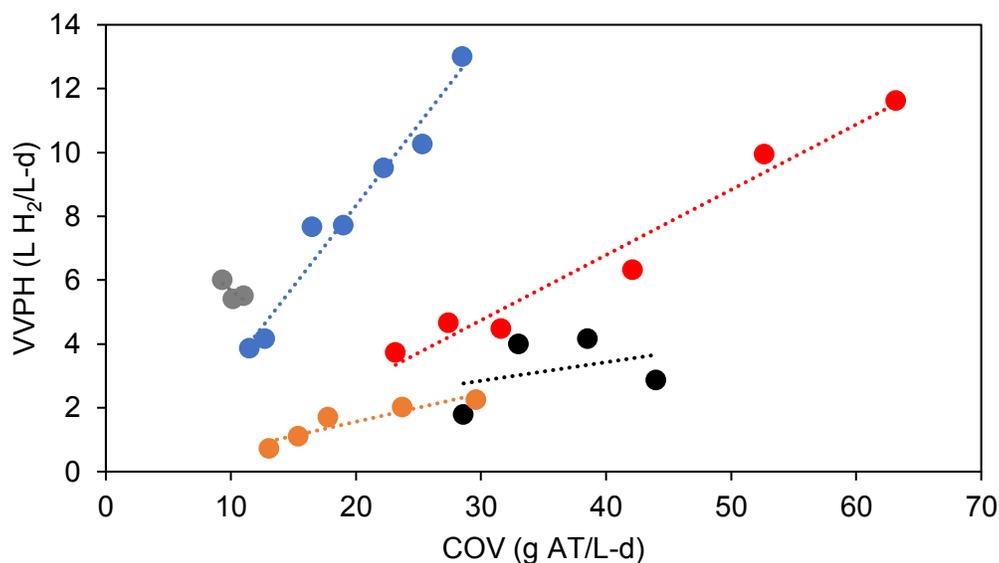


Figura 17. Velocidad volumétrica de producción de H_2 obtenida empleando diferentes cargas orgánicas volumétricas de azúcares totales en sistemas continuos de tanque agitado a partir de los hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (●), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (●), Cellulase 50 XL (●), Cellulase 50 XL – Viscozyme (●) y Stonezyme (●)

Al realizar un ajuste a un modelo lineal de los resultados obtenidos con los diferentes hidrolizados enzimáticos se puede determinar el aumento que se presenta en la VVPH por cada incremento de 1 g azúcares/L-d en la COV. En el caso de Celluclast 1.5 – Viscozyme, se observa el mayor efecto de la COV, sobre la VVPH, ya que se obtiene un aumento de aproximadamente 0.507 L H_2 /g azúcar total ($R^2=0.966$). Con Cellulase 50 XL, se tiene un menor efecto de la COV sobre el sistema ya que el aumento aproximado es de 0.204 L H_2 /g azúcar total ($R^2=0.964$). En el caso de Cellulase 50 XL – Viscozyme ($R^2=0.871$) y Stonezyme ($R^2=0.1247$) el efecto de la

COV sobre la VVPH es mínimo, ya que los aumentos son de 0.058 L H₂/g azúcar total y 0.088 L H₂/g azúcar total respectivamente.

Esta divergencia de resultados no permite ver un efecto directo entre la COV de azúcares totales y la VVPH obtenida en los sistemas en continuo, por lo que a continuación, se relacionan los resultados obtenidos previamente por Montiel-Corona & Razo-Flores, (2018), Montoya-Rosales et al., (2019) y Valencia-Ojeda (2019) en los sistemas continuos de producción de H₂ con la caracterización y resultados obtenidos en este estudio.

El sistema evaluado por Montoya-Rosales et al., (2019) utilizando hidrolizados a partir de Celluclast 1.5 L – Viscozyme logra la mayor VVPH empleando altas y bajas COV. Esto se encuentra asociado principalmente al hecho que se discutió previamente en la sección 4.3, en donde se especula que la acumulación de celobiosa consecuencia de una baja actividad de β-glucosidasas en la preparación enzimática de Celluclast 1.5 L - Viscozyme, podría estar promoviendo un efecto inhibitorio en la actividad enzimática de las celulasas. Por consiguiente, el consumo de celobiosa durante la fermentación oscura permite que la celulosa soluble presente en la fracción líquida siga siendo hidrolizada por las celulasas ya que como se mencionó anteriormente, al emplear los hidrolizados en la producción de H₂ no se realiza una separación enzima-hidrolizado. Estas suposiciones pueden ser comprobadas posteriormente determinando la cantidad de celulosa presente en la fracción líquida de los hidrolizados enzimáticos.

En el caso de Cellulase 50 XL evaluado por Valencia-Ojeda (2019), a pesar de emplear una carga orgánica 2.21 veces mayor que la obtenida con Celluclast 1.5 L -Viscozyme (63.18 y 28.5 g azúcares totales/L-d, respectivamente) se alcanza una menor VVPH (11.62 vs 12.99 L H₂/L-d). Sin embargo, esta diferencia se relaciona con la composición de azúcares identificados en la caracterización realizada por HPLC, ya que a pesar de que ambos hidrolizados tienen una concentración similar de azúcares totales; 16.82 g azúcares totales/L con Celluclast 1.5 L – Viscozyme y 17.27 g azúcares totales/L con Cellulase 50 XL, si no se considera a la arabinosa como un azúcar fermentable ya que, como se observó en la sección 4.5, este

monosacárido tiene una nula producción de hidrógeno, se tiene una concentración de azúcares fermentables – identificados ($\text{concentración}_{\text{azúcares_identificados}} - \text{concentración}_{\text{arabinosa}}$) de 9.87 g/L (57.2% de los azúcares totales), mientras que con Celluclast 1.5 L – Viscozyme se tienen 13.23 g/L (78.65% de los azúcares totales). Esta diferencia se refleja en una mayor VVPH en el hidrolizado obtenido con Celluclast 1.5 L-Viscozyme considerando que se tiene una mayor concentración de azúcares fermentables-identificados (concentraciones de glucosa, xilosa, celobiosa, galactosa y fructosa mostradas previamente en la Tabla 6).

Al comparar los resultados obtenidos con los sistemas continuos y en lote usando Cellulase 50 XL de manera individual y con Viscozyme, en el sistema en lote al utilizar el hidrolizado binario se obtiene una mayor VVPH que con el hidrolizado individual; 3.94 ± 0.17 y 1.94 ± 0.14 L H₂/L-d respectivamente (Tabla 7). Sin embargo, en el sistema continuo ocurre lo contrario ya que como se observa en la Figura 17, los valores obtenidos de VVPH para el hidrolizado individual son mayores que las del hidrolizado binario, independientemente de la COV evaluada. Esta diferencia es principalmente por el hecho de que, en el sistema en lote, el ácido acético presente en el hidrolizado binario permite una mayor VVPH, ya que como se discutió previamente en la sección 4.1, este compuesto contribuye como donador de e⁻ en el desarrollo y síntesis de biomasa lo que se traduce en una mayor VVPH en el sistema en lote. Sin embargo, en el sistema en continuo, la biomasa se establece durante el periodo de arranque del CSTR (Montoya-Rosales et al., 2019), por lo que la concentración de ácido acético presente en los hidrolizados tiene un menor efecto en los sistemas en continuo.

En la producción de H₂ a partir de los hidrolizados con Cellulase 50 XL en sistemas en lote, se encontró presencia de lactato en las primeras horas de la producción de H₂ (Figura 8), y como se estableció previamente en la sección 4.2, el ácido láctico en ocasiones se establece como producto en la fermentación de los oligosacáridos, por lo que su presencia durante la producción de H₂ en lote indica que dentro de la concentración de azúcares totales existe cierto porcentaje de oligosacáridos (Saha and Brewer, 1994).

Tanto la presencia de estos polisacáridos como el lactato, permite que las VVPH obtenidas con Cellulase 50 XL en los sistemas continuos sean mayores que los hidrolizados de Cellulase 50 XL - Viscozyme y Stonezyme; los oligosacáridos por ser un sustrato fermentable, mientras que el lactato, en presencia de acetato, favorece la producción de H₂ y butirato por la vía acetato-lactato (García-Depraect et al., 2019; Wu et al., 2012). Por esta razón, Valencia-Ojeda, (2019) sólo reporta concentraciones de lactato en el periodo con COV de 48 g azúcares totales/L-d, ya que en los periodos en los que se administraba una menor concentración de azúcares en el sistema, el lactato producido en la fermentación de los oligómeros es consumido en su totalidad para contribuir en la producción de H₂. Este efecto se observa previamente en el estudio realizado por Baghchehsaraee et al. (2009), ya que a pesar de emplear diferentes concentraciones iniciales de lactato en el sistema, este compuesto aparece en los puntos finales de la fermentación oscura hasta que se utiliza una concentración mayor a 3 g lactato/L. Sin embargo, la presencia de lactato en el hidrolizado a partir de Cellulase 50 XL, se puede corroborar a partir de la cinética de producción de metabolitos en el sistema en lote (Figura 8 c) puesto que, si bien durante las primeras horas de la fermentación existe producción de lactato, al finalizar el ensayo este metabolito ya no es detectable.

Finalmente, en el caso de Stonezyme evaluado previamente por Montoya-Rosales et al. (2019), como se mencionó previamente en la sección 4.3, al no contener otros azúcares como los oligómeros, ni realizar una hidrólisis de manera simultánea con la fermentación oscura, el aumento de la VVPH con cada incremento en la COV empleada en los reactores es mínimo.

Para complementar los resultados obtenidos en este estudio se propone un análisis de la comunidad microbiana tanto de los sistemas en lote como de los sistemas en continuo. De esta manera, se podrían explicar en mayor medida los resultados obtenidos previamente a partir de los hidrolizados enzimáticos.

5 Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Los componentes mayoritarios presentes en los hidrolizados enzimáticos evaluados son glucosa y xilosa. Se observó que el uso de Viscozyme como enzima accesoria con Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL presenta un aumento en la concentración de azúcares contenidos en la fracción de hemicelulosa del bagazo de agave (xilosa, arabinosa y galactosa). Se determinó que la xilosa se encuentra correlacionada linealmente con la concentración inicial de ácido acético en los hidrolizados enzimáticos ($R^2=0.99$). Con base en el balance de DQO se especula que este ácido carboxílico actúa como donador de electrones contribuyendo de esta manera en la síntesis y enriquecimiento de la biomasa en los sistemas en lote de producción de H_2 .

Se supone una relación lineal entre la concentración inicial de ácido acético en los hidrolizados enzimáticos y la VVPH ($R^2=0.79$), puesto que, en los experimentos en lote, los hidrolizados binarios presentaron mayores concentraciones de ácido acético y al compararlos con los hidrolizados individuales se presenta un incremento de aproximadamente 2 L H_2 /L-d en la VVPH.

Una mayor acumulación de metabolitos en los sistemas en lote durante la producción de H_2 con los hidrolizados obtenidos con Celluclast 1.5 L y Cellulase 50 XL, así como la presencia de ácido láctico en las primeras horas de la producción de H_2 en estos hidrolizados individuales, permite suponer que se tiene la presencia de oligosacáridos. La hidrólisis de los oligosacáridos durante la fermentación oscura, así como la producción de hidrógeno a partir del ácido láctico por la vía acetato-lactato, permite explicar los resultados obtenidos previamente en donde se obtienen mayores VVPH empleando a Cellulase 50 XL en los sistemas continuos.

Al replicar la composición de Celluclast 1.5 L – Viscozyme a partir de azúcares grado reactivo, el hidrolizado sintético alcanzó un 65% del volumen acumulado de H_2 del hidrolizado enzimático y aproximadamente la mitad de su VVPH (4.42 L H_2 /L-d vs 2.60 L H_2 /L-d). Esta diferencia entre los resultados obtenidos se asocia principalmente a que en el hidrolizado enzimático la celobiosa se encuentra

inhibiendo la actividad de las celulasas durante la hidrólisis enzimática. Sin embargo, al consumir este disacárido durante la fermentación oscura se continúa con la hidrólisis de la celulosa soluble por parte de las celulasas. De esta manera se supone que al ocurrir de manera simultánea la hidrólisis y la fermentación oscura, se obtienen mejores VVPH al utilizar el hidrolizado de Celluclast 1.5 L – Viscozyme.

Con la evaluación de la composición de Stonezyme empleando azúcares grado reactivo, a pesar de las diferencias en el consumo de azúcares totales (62% en el hidrolizado enzimático y 98% en el sintético), se observó que el hidrolizado sintético de Stonezyme alcanzó el 97% del volumen del hidrolizado enzimático y una VVPH más alta (2.56 L H₂/L-d y 2.32 L H₂/L-d, respectivamente). Por esta razón se determinó que los azúcares totales que no se consumen en el hidrolizado enzimático, en realidad son las celulasas y xilanasas presentes en la preparación enzimática de Stonezyme. Por lo tanto, se establece que en los ensayos con Stonezyme la producción de H₂ se da únicamente con los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática los cuales son los identificados por HPLC.

Al evaluar las diferentes relaciones glucosa-xilosa que se presentan en los hidrolizados enzimáticos, se determinó que al emplear un cultivo mixto esta relación no presenta un efecto significativo sobre la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno ($p > 0.05$). Esto probablemente debido a que el inóculo inicial se adapta a los diferentes tipos y concentraciones de sustrato, de tal manera que la microbiota que se establece en el sistema tiene la capacidad de aprovechar las diferentes fuentes de carbono que se encuentran en el medio.

La presencia de la glucosa en los hidrolizados enzimáticos permite obtener valores de VVPH mayores a las obtenidas con los azúcares grado reactivo empleados de manera individual.

5.2 *Perspectivas*

A pesar de que con los resultados obtenidos se especula que el ácido acético actúa como donador de electrones y contribuye en la síntesis y enriquecimiento de la biomasa durante la fermentación oscura en los procesos en lote, se debe determinar la dinámica microbiana en los ensayos realizados con hidrolizados enzimáticos, esto permitiría relacionar los microorganismos presentes en cada uno de los ensayos con la composición inicial de los hidrolizados.

Con el fin de corroborar la hipótesis que se formuló sobre la fermentación e hidrólisis simultáneas, se propone determinar tanto la concentración de la celulosa soluble, así como corroborar la presencia de oligosacáridos en cada uno de los hidrolizados.

Para corroborar que existe la presencia de polisacáridos como los celulooligosacáridos, xilooligosacáridos y fructooligosacáridos, se sugiere realizar una determinación de estos oligómeros.

Con base en los resultados obtenidos y los ensayos realizados previamente en sistemas continuos, se especula que los mejores resultados se obtienen a partir de los hidrolizados en los que aparentemente se presenta una hidrólisis de los polisacáridos presentes en la fracción líquida durante la fermentación. Es por esta razón por la que se propone evaluar un sistema en el que ocurra de forma simultánea la sacarificación del bagazo de agave y la fermentación oscura, de esta manera se disminuiría la inhibición por sustrato que ocurre en las enzimas empleadas en la hidrólisis.

REFERENCIAS

Aguirre-Fierro, A., Ruiz, H.A., Cerqueira, M.A., Ramos-González, R., Rodríguez-Jasso, R.M., Marques, S., Lukasik, R.M., 2020. Sustainable approach of high-pressure agave bagasse pretreatment for ethanol production. *Renew. Energy* 155, 1347–1354. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.055>

Andrić, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K., 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol. Adv.* 28, 308–324. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.003>

APHA, 1997. Standar Methods for examination of water & wastewater [WWW Document]. URL www.standardmethods.org.%0D

Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., 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. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>

Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R.I., Alatríste-Mondragón, F., Méndez-Acosta, H.O., 2015a. Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresour. Technol.* 181, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>

Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., 2015b. Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: Role of hydrolysates constituents. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 10756–10765. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.200>

Arriaga, S., Rosas, I., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2011. Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 3442–3449. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.019>

Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., 2009. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>

Baksi, S., Ball, A.K., Sarkar, U., Banerjee, D., Wentzel, A., Preisig, H.A., Chandra, J., Birgen, C., Saha, S., Wittgens, B., Markussen, S., 2019. Efficacy of a novel sequential enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass and inhibition characteristics of monosugars. *Int. J. Biol. Macromol.* 129, 634–644. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.188>

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 326–338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>

Breton-Deval, L., Méndez-Acosta, H.O., González-Álvarez, V., Snell-Castro, R., Gutiérrez-Sánchez, D., Arreola-Vargas, J., 2018. Agave tequilana bagasse for methane production in batch and sequencing batch reactors: Acid catalyst effect, batch optimization and stability of the semi-continuous process. *J. Environ. Manage.* 224, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.053>

Buitrón, G., Hernández-juárez, A., Hernández-ramírez, M.D., Sánchez, A., 2019. Industrial

Crops & Products Biochemical methane potential from lignocellulosic wastes hydrothermally pretreated. *Ind. Crop. Prod.* 139, 111555. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111555>

Cao, P., Wu, L., Wu, Z., Pan, D., Zeng, X., Guo, Y., Lian, L., 2019. Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 102, 2863–2872. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15410>

Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H.O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., Trably, E., Wenzel, J., Zaiat, M., 2019. A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 26237–26247. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.124>

Chatellard, L., Trably, E., Carrère, H., 2016. The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresour. Technol.* 221, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.084>

Choi, J., Han, S., Kim, H., 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* 33, 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>

Contreras-Dávila, C.A., Méndez-Acosta, H.O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2017. Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chem. Eng. J.* 313, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>

Corona-González, R.I., Varela-Almanza, K.M., Arriola-Guevara, E., Martínez-Gómez, Á.D.J., Pelayo-Ortiz, C., Toriz, G., 2016. Bagasse hydrolyzates from Agave tequilana as substrates for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* in batch and repeated batch reactor. *Bioresour. Technol.* 205, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.081>

CRT, 2019. Consumo de Agave para tequila y tequila 100% de Agave [WWW Document]. URL <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Fisher, A.B., Fong, S.S., 2014. Lignin biodegradation and industrial implications 1, 92–112. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2014.2.92>

Fritsch, C., Vogel, R.F., Toelstede, S., 2015. Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates-influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1075–1088. <https://doi.org/10.1111/jam.12908>

Fúnez Guerra, C., Almanza Rodríguez, E., Fuentes Ferrera, D., 2010. El hidrógeno: Vector energético del futuro. *Energía Minas Rev. Prof. Técnica y Cult. los Ing. Técnicos Minas* 20–27.

Galindo-Hernández, K.L., Tapia-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, 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. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 22116–22125. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.071>

García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E.R., Gómez-Romero, J., López-López, A., León-Becerril, E., 2019. Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 282, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>

Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>

Hydrogen Council, 2017. How Hydrogen empower the energy transition [WWW Document]. URL <http://hydrogencouncil.com/>

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. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 45, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.09.001>

Khan, M.A., 2010. Hydrolysis of hemicellulose by commercial enzyme mixtures. *Lulea Univ. Technol. Dep. Chem. Eng. Geosci.* <https://doi.org/1402-1552> - ISRN: LTU-DUPP--10/040--SE

Kim, H., Han, S., Shin, H., 2003. The optimisation of food waste addition as a co-substrate in anaerobic digestion of sewage sludge. *Waste Manag. Res.* 21, 515–526. <https://doi.org/10.1177/0734242X0302100604>

Kim, S.M., Choi, B.Y., Ryu, Y.S., Jung, S.H., Park, J.M., Kim, G.H., Lee, S.K., 2015. Simultaneous utilization of glucose and xylose via novel mechanisms in engineered *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 30, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.05.002>

Kremling, A., Geiselmann, J., Ropers, D., de Jong, H., 2015. Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models. *Trends Microbiol.* 23, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.11.002>

Kumar, R., Chatterjee, S., Behari, P., 2019. Bioethanol production from waste lignocelluloses : A review on microbial degradation potential. *Chemosphere* 231, 588–606. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.142>

la Cecilia, D., Riley, W.J., Maggi, F., 2019. Biochemical modeling of microbial memory effects and catabolite repression on soil organic carbon compounds. *Soil Biol. Biochem.* 128, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.10.003>

Larumbe, R.M., 1992. Purificación y Caracterización de Endoglucanasa III de *Trichoderma resei* QM9414. Universidad Complutense de Madrid.

Li, J., Ren, N., Li, B., Qin, Z., He, J., 2008. Anaerobic biohydrogen production from monosaccharides by a mixed microbial community culture. *Bioresour. Technol.* 99, 6528–6537. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.072>

Linares-Hurtado, J.I., Moratilla-Soria, B.Y., 2007. El hidrógeno, in: Asociación Nacional de Ingenieros del ICAI (Ed.), *El Hidrógeno y La Energía*. España, pp. 25–27.

Liu, Y., Min, J., Feng, X., He, Y., Liu, J., Wang, Y., He, J., Do, H., Sage, V., Yang, G., Sun,

- Y., 2020. A review of biohydrogen productions from lignocellulosic precursor via dark fermentation: Perspective on hydrolysate composition and electron-equivalent balance. *Energies* 13, 2451. <https://doi.org/10.3390/en13102451>
- López-Gutiérrez, I., 2015. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de Agave tequilana Weber var. azul: Efecto del procesamiento de la piña y de la sacarificación del bagazo. M.Sc. Thesis. Inst. Potos. Investig. Científica y Tecnológica, A.C. 98 pages. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle>.
- Lopez, M.G., Mancilla-Margalli, N.A., Mendoza-Diaz, G., 2003. Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- Madadi, M., Tu, Y., Abbas, A., 2017. Recent Status on Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Electron. J. Biol.* 12, 135–143. <https://doi.org/10.1002/9781119117322.ch4>
- Marzocchella, A., Raganati, F., Olivieri, G., Peter, G., 2015. Butanol production from hexoses and pentoses by fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe* 34, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.008>
- Matsumoto, M., Nishimura, Y., 2007. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 236–241. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.236>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J., Carrère, H., 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolysate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 32, 934–951. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>
- 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. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Montoya-Rosales, J. de J., Olmos-Hernández, D.K., Palomo-Briones, R., Montiel-Corona, V., Mari, A.G., Razo-Flores, E., 2019. Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. *Bioresour. Technol.* 283, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.072>
- Nong, G., Chen, Y., Zhou, Z., 2015. Generation of hydrogen free radicals from water for fuels by electric field induction. *Energy Convers. Manag.* 545–551.
- Novozymes, 2019. Novozymes [WWW Document]. URL <https://www.novozymes.com/es>
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K.L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J.A., Cortés-Carmona, M.Á., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2018a. Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technol. Environ. Policy* 20, 1423–1441. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>
- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N.E., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Razo-Flores, E., 2018b. Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium*-*Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl. Microbiol.*

Biotechnol. 102, 2465–2475. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8737-7>

Paz, A., Outeiriño, D., Guerra, N.P., Domínguez, J.M., 2019. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. *Bioresour. Technol.* 275, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.082>

Perez-Pimienta, J.A., Flores-Gómez, C.A., Ruiz, H.A., Sathitsuksanoh, N., Balan, V., Sousa, C., Dale, B.E., Singh, S., Simmons, B.A., 2016. Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEX™, autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments. *Bioresour. Technol.* 211, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.103>

Perez-Pimienta, J.A., Lopez-Ortega, M.G., Chavez-Carvayar, J.A., Varanasi, P., Stavila, V., Cheng, G., Singh, S., Simmons, B.A., 2015. Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *Biomass and Bioenergy* 75, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.026>

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>

Prakasham, R.S., Brahmaiah, P., Sathish, T., Rao, K.R.S.S., 2009. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 9354–9361. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.104>

Raud, M., Kikas, T., Sippula, O., Shurpali, N.J., 2019. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 111, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.020>

Rombouts, J.L., Mos, G., Weissbrodt, D.G., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M.C.M., 2019. Diversity and metabolism of xylose and glucose fermenting microbial communities in sequencing batch or continuous culturing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy233>

Saha, A.K., Brewer, C.F., 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.* 254, 157–167. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84249-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84249-3)

Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., Benjamin, S., 2016. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective 6, 1–13. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>

Samayam, I.P., Schall, C.A., 2010. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. *Bioresour. Technol.* 101, 3561–3566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.066>

Silva, L.A. de O., Terrasan, C.R.F., Carmona, E.C., 2015. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electron. J. Biotechnol.* 18, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.06.001>

Tapia-Rodríguez, A., Ibarra-Faz, E., Razo-Flores, E., 2019. Hydrogen and methane production potential of agave bagasse enzymatic hydrolysates and comparative techno-economic feasibility implications. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.087>

Valdez-Guzmán, B.E., Rios-Del Toro, E.E., Cardenas-López, R.L., Méndez-Acosta, H.O., González-Álvarez, V., Arreola-Vargas, J., 2019. Enhancing biohydrogen production from Agave tequilana bagasse: Detoxified vs. Undetoxified acid hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 276, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.101>

Valdez-Vazquez, I., Alatríste-Mondragón, F., Arreola-Vargas, J., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H.O., Ortíz, I., Weber, B., 2020. A comparison of biological, enzymatic, chemical and hydrothermal pretreatments for producing biomethane from Agave bagasse. *Ind. Crops Prod.* 145, 112160. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112160>

Valencia-Ojeda, C., 2019. Producción de hidrógeno en continuo a partir de hidrolizado enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la enzima comercial Cellulase 50 XL individual y con una mezcla binaria. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>

Vasconcelos De Sá, L.R., Cammarota, M.C., Corrêa de Oliveira, T., Morais Oliveira, E.M., Matos, A., Ferreira-Leitao, V.S., 2013. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 2986–2997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.103>

Wang, S., Dai, G., Yang, H., Luo, Z., 2017. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Prog. Energy Combust. Sci.* 62, 33–86. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.05.004>

Wu, C.W., Whang, L.M., Cheng, H.H., Chan, K.C., 2012. Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresour. Technol.* 113, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.130>

Zhang, L., Li, X., Yong, Q., Yang, S.T., Ouyang, J., Yu, S., 2015. Simultaneous saccharification and fermentation of xylo-oligosaccharides manufacturing waste residue for l-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* 94, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.020>

Zhao, L., Guo, W.Q., Guo, X.C., Ren, H.Y., Wu, J.T., Cao, G.L., Wang, A.J., Ren, N.Q., 2018. Continuous hydrogen production from glucose/xylose by an anaerobic sequential batch reactor to maximize the energy recovery efficiency. *RSC Adv.* 8, 20712–20718. <https://doi.org/10.1039/c8ra02991a>

Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012. Biomass recalcitrance . Part I : the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 465–482. <https://doi.org/10.1002/bbb>

ANEXOS

Anexo 1

Se presenta la caracterización de las enzimas empleadas para la sacarificación del bagazo de agave en este estudio en función de las actividades celulíticas y hemicelulolíticas de las enzimas

Enzima	Proteína (mg/mL)	Celulasa (FPU/mL)	1,4- β -endoglucanasa (EGU/mL)	β -glucosidasa (U/mL) ^a	Xilanasa (U/mL) ^b
Celluclast 1.5 L	32.45	54.08	598.02	0.72	740
Viscozyme	18.90	6.24	153.82	4.60	233.86
Cellulase 50 XL	60.31	32.49	3687.84	1170.41	117725.08
Stonezyme	36.52	44.53	560.61	6.19	195

^aU: Cantidad de enzima requerida para remover un micromol de p-nitrofenol por minuto.

^bU: Cantidad de enzima requerida para remover un micromol de xilosa por minuto.

Anexo 2

El anexo dos muestra la relación encontrada en los hidrolizados enzimáticos entre la concentración de xilosa y ácido acético.

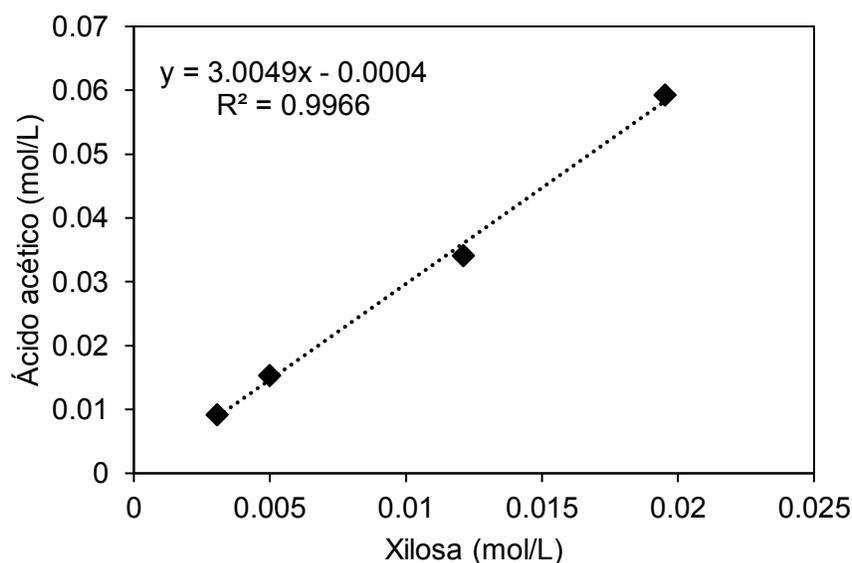


Figura A1. Regresión lineal entre la concentración de xilosa y ácido acético en los hidrolizados enzimáticos.

Anexo 3

El anexo 3 muestra los ensayos en los que se evaluaron los hidrolizados enzimáticos y sus respectivos controles enzimáticos en la producción de hidrógeno.

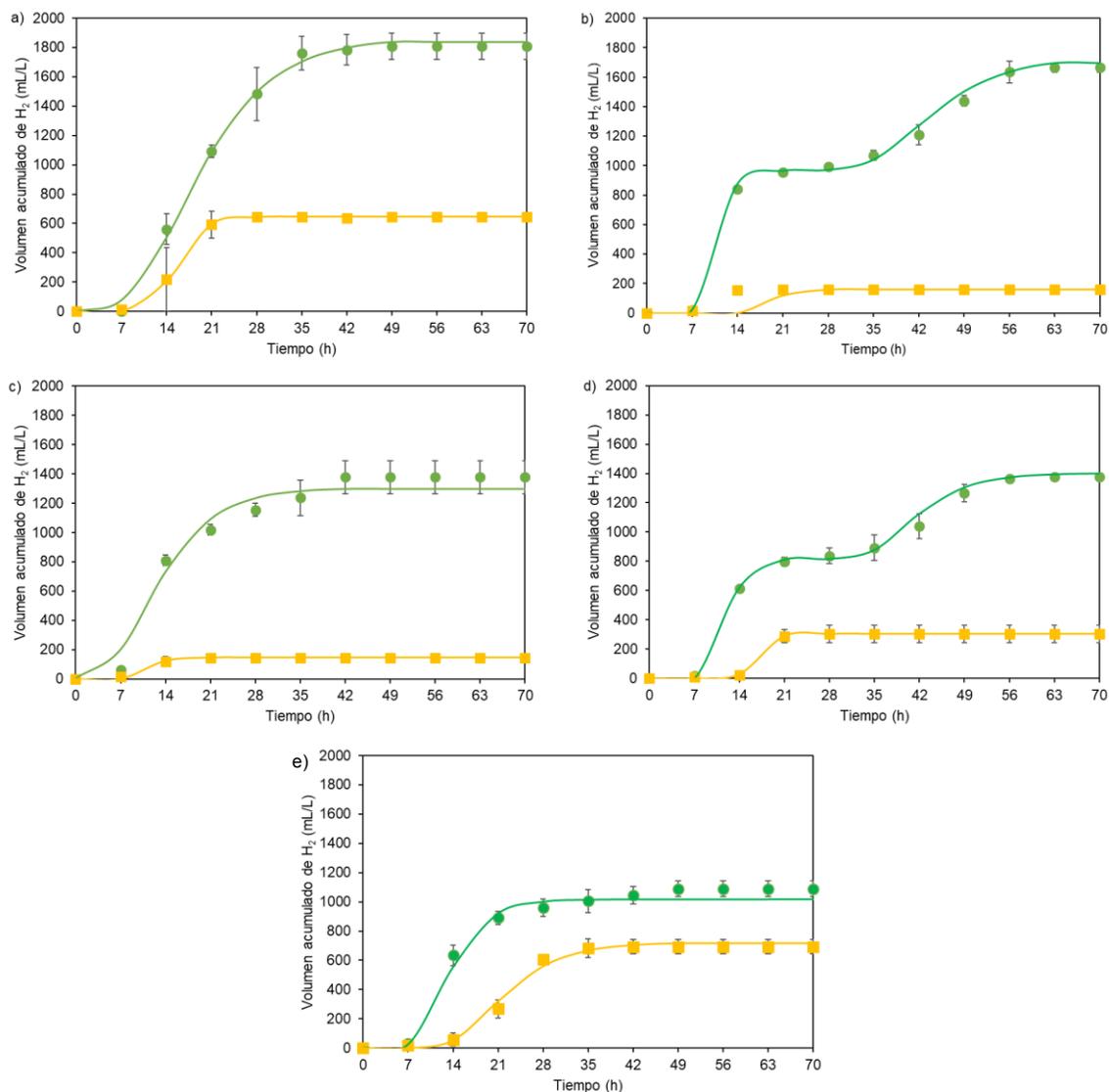


Figura A2. Producción de hidrógeno en lote empleando diferentes hidrolizados enzimáticos. Celluclast 1.5 L (a), Celluclast 1.5 L – Viscozyme (b), Cellulase 50 XL (c), Cellulase 50 XL- Viscozyme (d), Stonezyme (e). Hidrolizado (●), Control enzimático (■). La línea continua corresponde al modelo de Gompertz para la producción de H₂ de cada tratamiento.

Anexo 4

En el anexo 4 se muestra el consumo de los azúcares identificados en la caracterización por HPLC en hidrolizados enzimáticos durante la fermentación oscura en los experimentos en lote.

Hidrolizado	Celobiosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Galactosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Sorbitol (g/L)	AT (g/L)	Otros azúcares (g/L)
Celluclast 1.5 L inicial	0.268	1.776	0.267	0.155	0.000	0.000	3.644	4.444	1.978
Celluclast 1.5 L final	0.000	0.040	0.000	0.000	0.338	0.136	0.078	1.037	0.523
Consumo (%)	100.0%	97.7%	100.0%	100.0%	---	----	97.9%	76.7%	73.6%
Celluclast 1.5 L - V inicial	0.590	1.810	0.980	0.754	0.279	0.312	1.248	5.650	0.925
Celluclast 1.5 L - V final	0.000	0.037	0.013	0.139	0.000	0.000	0.050	0.760	0.572
Consumo (%)	100.0%	98.0%	98.7%	81.6%	100.0%	100.0%	96.0%	86.5%	38.2%
Cellulase 50 XL inicial	0.000	2.198	0.248	0.775	1.065	0.050	0.568	5.717	1.381
Cellulase 50 XL final	0.000	0.000	0.037	0.059	0.573	0.051	0.021	1.304	0.585
Consumo (%)	---	100.0%	85.0%	92.4%	46.2%	----	96.3%	77.2%	57.6%
Cellulase 50 XL - V inicial	0.000	1.604	0.497	1.344	0.007	0.086	0.472	5.220	1.682
Cellulase 50 XL - V final	0.000	0.077	0.039	0.000	0.000	0.017	0.137	0.760	0.627
Consumo (%)	---	95.2%	92.1%	100.0%	100.0%	80.2%	71.0%	85.4%	62.7%
Stonezyme inicial	0.000	2.120	0.888	0.926	0.000	0.236	0.383	4.836	0.666
Stonezyme final	0.000	0.675	0.000	0.272	0.000	0.059	0.066	1.839	0.833
Consumo (%)	---	68.2%	---	70.6%	---	75.0%	82.8%	62.0%	---

Anexo 5

En la 5 se muestra la correlación lineal entre la concentración inicial de ácido acético y la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno en los ensayos en lote.

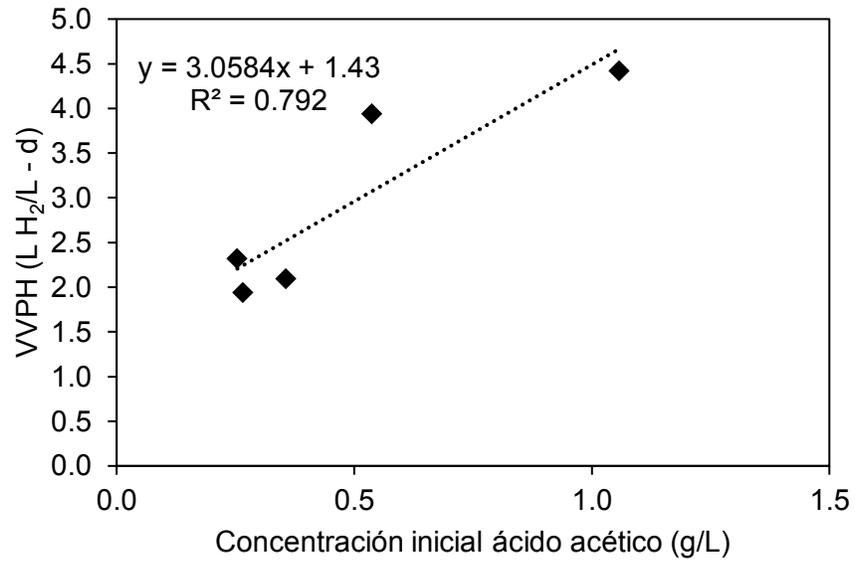


Figura A3. Modelo lineal de la concentración inicial de ácido acético y la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno en los hidrolizados enzimáticos.