

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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Deslignificación de la penca de *Agave tequilana*
F.A.C. Weber empleando peróxido de hidrógeno
alcalino como pretratamiento para la producción
de biohidrógeno.**

Tesis que presenta

Dendera Munguía Aguilar

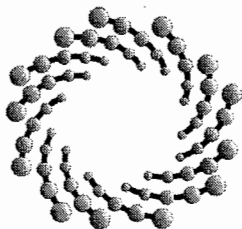
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre del 2016



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Deslignificación de la penca de Agave tequilana F.A.C. Weber empleando peróxido de hidrógeno alcalino como pretratamiento para la producción de biohidrógeno***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Dendera Munguía Aguilar** y aprobada el **diecisiete de octubre del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Felipe Alariste Mondragón
Director de la tesis

Dra. Laura Yáñez Espinosa
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Elías Razo Flores
Miembro del Comité Tutorial

Dr. José René Rangel Méndez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Omar González Ortega
Miembro del Comité Tutorial



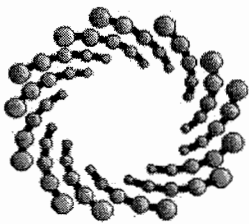
Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-140722) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El autor de esta tesis recibió recursos por parte del comité de becas del Instituto Potosino de Investigación de Científica y Tecnológica, A. C. para la divulgación de los resultados parciales de la investigación en el VII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste.

El análisis de cenizas se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología, Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). La obtención de micrografías y el análisis de Difracción de Rayos X se llevó cabo en el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).



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 037 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 17 días del mes de octubre del año 2016, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Elías Razo Flores	Presidente	IPICYT
Dr. José René Rangel Méndez	Secretario	IPICYT
Dra. Laura Yáñez Espinosa	Sinodal externo	UASLP
Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Sinodal	IPICYT
Dr. Omar González Ortega	Sinodal externo	UASLP

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

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Dendera Munguía Aguilar

sobre la Tesis intitulada:

Deslignificación de la penca de Agave tequilana F.A.C. Weber empleando peróxido de hidrógeno alcalino como pretratamiento para la producción de biohidrógeno

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:20 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 17 días del mes de octubre de 2016.

Mtra. Yvonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento del Posgrado

Manoal Bonilla Marin
Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios, por permitirme llegar hasta este punto y guiarme siempre con su luz.

A mi madre, que es la mujer que más admiro y es mi ejemplo a seguir por su gran valentía, amor y fuerza que siempre tiene ante la vida. Por su apoyo siempre en las buenas y en las malas, por tener las palabras y el abrazo indicado justo en el momento que más lo he necesitado. Gracias por tu infinito amor que me brindas.
Es un honor ser tu hija.

A mi padre, que a pesar de no estar físicamente conmigo, siempre ha sido un modelo a seguir. Gracias por aquellos consejos, amor y valores que me diste durante el tiempo que compartimos.

A mi hermana Anabel, por su gran apoyo incondicional en esta etapa, así como en momentos buenos y no tan buenos. Gracias por ser esa gran mujer y ser pilar importante en la familia.

A mis hermanos Aarón, Felipe y Ramses, que sin duda alguna siempre estuvieron ahí brindándome su apoyo a pesar de la distancia. Gracias por su apoyo y comprensión.

A mis peques Daila y Carlitos, por llenar de alegría mi vida con su amor incondicional.

A Charly, por todo el apoyo y amor que me brindo durante esta etapa, sin duda alguna has sido parte importante de mi vida.

A mis amigos Tania, Irvin, Arnoldo, Sandy, Malle, Abraham, mi madrina Lara y Esme por su invaluable apoyo, cariño y valiosos momentos compartidos.

A mi familia, en especial a mi tío Javi por su incondicional apoyo y comprensión.

Agradecimientos

Al Dr. Felipe Alatraste por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación bajo su asesoría. Gracias por todos los consejos, su paciencia y apoyo durante el transcurso del proyecto. que me permitieron culminar esta etapa. Sin duda alguna, ha sido pilar importante para mi formación tanto profesional como personal durante la maestría.

Al Dr. Elías Razo Flores por todo su apoyo y consejos que contribuyeron a que este trabajo de investigación fuera lo más productivo posible. Gracias también por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo de hidrógeno.

Al Dr. José René Rangel Méndez, la Dra. Laura Yáñez Espinosa y el Dr. Omar González Ortega por aceptar formar parte de mi comité. Gracias por sus valiosas aportaciones, por su apoyo y su gran disposición para compartir sus conocimientos que contribuyeron en la mejora de este proyecto de investigación.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales: M. en C. Dulce Partida Gutiérrez, a la I.Q. Ma del Carmen Rocha Medina, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, a la QFB Elizabeth Cortes Cedillo y al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, por su valioso apoyo.

A los técnicos M. en C. Ana Iris Peña Maldonado, M. en C. Beatriz Adriana Rivera Escoto y M. Juan Manuel Martínez Andrade del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

Al Dr. Miguel Ávalos Borja, al Dr. Cesar Nieto Delgado y a la Dra. Angélica Montoya Contreras por sus valiosas aportaciones en la interpretación de los resultados.

Al grupo de trabajo Irma López, José Cruz, Karen Galindo, Virginia Montiel, Christian Cisneros, Rodolfo Palomo y Paola Portillo.

A mis compañeros de generación y amigos que conocí durante esta etapa de mi vida: Ale, Emilia, Gerardo, Iván, Erika, Edgardo, Noemí, Tona, etc.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos Institucionales	ii
Acta de examen de grado	ii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Anexos.....	xiv
Abreviaturas	xv
Resumen	xvi
Abstract	xviii
Introducción	1
Capítulo 1.- Marco teórico.....	3
1.1. Importancia del biohidrógeno.....	3
1.2. Biomasa lignocelulósica.....	3
1.2.1. Importancia de la biomasa lignocelulósica	3
1.2.1.1. Residuos lignocelulósicos	4
1.2.1.2. Cultivos bioenergéticos.....	4
1.2.2. Anatomía, estructura y composición química de la biomasa lignocelulósica	5
1.2.2.1. Composición química	5
1.2.2.2. Estructura de la pared celular.....	7
1.2.2.3. Anatomía vegetal.....	9
1.3. Anatomía del <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber.....	11
1.4. Pretratamientos	13
1.4.1. Tipos de pretratamientos.....	13
1.4.1.1. Físicos.....	13
1.4.1.1.1. Fragmentación mecánica.....	13
1.4.1.2. Químicos.....	14
1.4.1.2.1 Hidrólisis ácida	14
1.4.1.2.2. Hidrólisis alcalina	14
1.4.1.2.3. Oxidativos.....	14

1.4.1.2.3.1. Peróxido de hidrógeno alcalino	15
1.4.1.3. Físico-químicos.....	17
1.4.1.3.1. Explosión con vapor.....	17
1.4.1.3.2. Explosión de fibra con amoniaco (AFEX)	17
1.4.1.4. Hidrólisis enzimática	18
1.5. Fermentación oscura por producción de biohidrógeno	18
1.6. Justificación.....	21
1.7. Hipótesis.....	22
1.8. Objetivos	22
1.8.1. Objetivo general	22
1.8.2. Objetivos específicos.....	22
Capítulo 2.- Materiales y métodos	23
2.1. Estrategia metodológica.....	23
2.2. Penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber	25
2.3. Fraccionamiento de la penca.....	25
2.4. Caracterización morfológica	26
2.4.1. SEM	26
2.4.2. Microscopía óptica.....	26
2.5. Caracterización físico-química de la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber	26
2.5.1. Análisis de fibras	26
2.5.2. Determinación de humedad	27
2.5.3. Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y sólidos fijos	27
2.5.4. XRD	27
2.5.5. ATR-FTIR	28
2.5.6. TGA	28
2.6. Pretratamiento de la penca con PHA	28
2.6.1. Metodología del pretratamiento con PHA	28
2.6.2. Condiciones a evaluar en el pretratamiento con PHA	30
2.6.3. Caracterización de los sólidos recuperados del pretratamiento con PHA	31
2.7. Tratamiento enzimático.....	32
2.7.1. Condiciones de la hidrólisis enzimática	32
2.7.1.1 Caracterización de la mezcla de enzima Celluclast 1.5L	32

2.7.2. Determinación de azúcares totales, azúcares reductores y la demanda química de oxígeno	32
2.8. Cinéticas de producción de biohidrógeno.....	32
2.8.1. Inóculo	32
2.8.2. Producción de biohidrógeno en lote.....	33
Capítulo 3.- Resultados y discusión.....	34
3.1. Caracterización morfológica y química de los estándares de Avicel de celulosa microcristalina y lignina	34
3.1.1. Avicel de celulosa microcristalina	34
3.1.2. Estándar de lignina.....	36
3.2. Caracterización de la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber	38
3.2.1. Morfología de la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber.....	38
3.2.1.1. Microscopia óptica	38
3.2.1.2. SEM	39
3.2.1.3. Índice de cristalinidad de la celulosa	42
3.2.2. Caracterización físico-química de la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber	43
3.2.2.1. Composición química	43
3.2.2.2. Determinación de humedad y sólidos totales de distintas partes de la penca	45
3.2.2.3. Determinación de ST, SV y SF de las fracciones de la penca	46
3.2.2.4. ATR-FTIR.....	46
3.3. Deslignificación de la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber durante el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino: efecto del pH, concentración de peróxido de hidrógeno, pre-hinchamiento y tiempo de contacto.....	49
3.3.1. Evaluación del pH y la concentración de peróxido de hidrógeno alcalino durante el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino	49
3.3.2. Efecto del tiempo de hinchamiento con peróxido de hidrógeno sobre la penca liofilizada	50
3.3.2.1. Caracterización morfológica	51
3.3.2.2. Caracterización química	54
3.3.3. Efecto del tiempo de contacto del peróxido de hidrógeno alcalino con la penca entera liofilizada	56
3.3.3.1. Recuperación de celulosa, hemicelulosa y lignina.....	56
3.3.3.2. Caracterización de la fracción 1	58
3.3.3.2.1. Análisis morfológico	58

3.3.3.2.2. Caracterización química	61
3.3.3.3. Caracterización de la fracción 2	63
3.3.3.3.1. Análisis morfológico	63
3.3.3.3.2. Análisis químico	64
3.3.3.4. Caracterización de la fracción 3	66
3.3.3.4.1. Análisis morfológico	66
3.3.3.4.2. Análisis químico mediante ATR-FTIR.....	68
3.4. Producción de biohidrógeno en lote	70
3.4.1. Producción de biohidrógeno en lote de la penca entera y sus fracciones sin ningún pretratamiento.....	70
3.4.2. Producción de biohidrógeno en lote de los hidrolizados enzimáticos de la penca entera liofilizada y de las fracciones 1 y 2 recuperadas del pretratamiento con PHA.....	72
3.4.2.1. Sacarificación enzimática de la penca liofilizada y de las fracciones 1 y 2	72
3.4.2.2. Producción de biohidrógeno de los hidrolizados.....	75
Capítulo 4.- Conclusiones y perspectivas.....	79
4.1. Conclusiones.....	79
4.2. Perspectivas.....	80
Fuentes de información.....	81
Anexos.....	86

Lista de tablas

Tabla 1.1.	Composición y estructura química de la lignina, celulosa y hemicelulosa (Chen, 2014).....	7
Tabla 1.2.	Estudios de deslignificación a partir de peróxido de hidrógeno bajo condiciones alcalinas.	15
Tabla 2.1.	Concentraciones del peróxido de hidrógeno y valores de los pH evaluados en el pretratamiento de deslignificación con PHA.....	31
Tabla 3.1.	Composición química de las cenizas del estándar de lignina.....	37
Tabla 3.2.	Índice de Cristalinidad (IC) de cada una de las fracciones de la penca, así como de la penca entera y liofilizada.....	42
Tabla 3.3.	Composición química de la penca entera y sus fracciones.....	44
Tabla 3.4.	Bandas características encontradas en los espectros de FT-IR de los estándares de lignina, Avicel de celulosa microcristalina y la penca entera liofilizada mostradas en la Fig. 3.10.....	48
Tabla 3.5.	Recuperación de las fracciones de la penca obtenidas del pretratamiento con PHA en la fracción 1 obtenida después del pretratamiento de la penca con PHA.....	49
Tabla 3.6.	Porcentajes de recuperación de las fibras presentes en la fracción 1 obtenida después del pretratamiento con PHA y previamente hinchada con peróxido de hidrógeno.....	54
Tabla 3.7.	Recuperación de las tres fracciones recuperadas del pretratamiento con PHA a 1.5 y 6h de contacto con la penca, con base en al análisis termogravimétrico.	57
Tabla 3.8.	Resultados de la producción en lote de biohidrógeno de las fracciones de la penca, de la penca entera secada a 60°C y de la penca entera liofilizada sin pretratamiento, obtenidos del ajuste de los datos al modelo de Gompertz.....	71
Tabla 3.9.	Resultados de la producción en lote de biohidrógeno de las fracciones hidrolizadas obtenidas del pretratamiento con PHA de la penca, obtenidos del ajuste de los datos al modelo de Gompertz.....	77

Lista de figuras

Fig. 1.1.	Estructura química de la celulosa, hemicelulosa y lignina (Deng <i>et al.</i> 2015).....	6
Fig. 1.2.	Estructura y composición química de la pared celular vegetal (adaptado de Phitsuwan, <i>et al.</i> 2013 y Achyuthan <i>et al.</i> 2010).....	8
Fig. 1.3.	Anatomía vegetal de las hojas (Adaptado de Streffer, 2014).....	10
Fig. 1.4.	Morfología del <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber.....	12
Fig. 1.5.	Mecanismo de oxidación de la lignina presente en la biomasa lignocelulósica (Wilkinson <i>et al.</i> 2014).....	16
Fig. 1.6.	Ruta bioquímica para la conversión de monosacáridos en biohidrógeno por medio de la fermentación oscura (López-Gutiérrez, 2015; Prescott <i>et al.</i> 2002; Xi-Chen <i>et al.</i> 2006).....	20
Fig. 2.1.	Estrategia metodológica.....	24
Fig. 2.2.	Fracciones en la que fue separada la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber.....	25
Fig. 2.3.	Diagrama de la estrategia experimental para la caracterización de las fracciones de la penca y su producción de biohidrógeno...	25
Fig. 2.4.	Diagrama del método de Van Soest para el análisis de fibras.....	27
Fig. 2.5.	Diagrama de flujo del pretratamiento de la penca con PHA y su fraccionamiento (Su <i>et al.</i> 2015).....	29
Fig. 2.6.	Caracterización química y morfológica de los sólidos recuperados después del pretratamiento con PHA y de los hidrolizados.....	31
Fig. 3.1.	Caracterización morfológica del avicel de celulosa microcristalina. a) Micrografía del avicel de celulosa microcristalina a 100×. b) Micrografía del avicel de celulosa microcristalina a 500×. c) Difractograma de DRX.....	34
Fig. 3.2.	Termograma del Avicel de celulosa microcristalina. Los termogramas se realizaron con una rampa de temperatura de 10°C/min de 25 a 800 °C, en una atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min.....	35
Fig. 3.3.	Caracterización morfológica del estándar de lignina. a) Micrografía del estándar de lignina a 100×. a) Micrografía del estándar de lignina a 500×. c) Difractograma de DRX.....	36
Fig. 3.4.	Termograma del estándar de lignina. Los termogramas se realizaron con una rampa de temperatura de 10°C/min de 25 a 800 °C, en una atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min.....	37
Fig. 3.5.	Fracciones de penca observadas con microscopio óptico. a) Corte transversal de la penca. b) Corte longitudinal de la penca. c) Haz vascular de una fracción de la penca con corte transversal. d) Xilema.....	38

Fig. 3.6.	Micrografías de las fracciones de la penca de <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber. a) Complejo estomático en la superficie de la cutícula. b) Estructura morfológica de la epidermis y fibra. c) Corte longitudinal de la fibra de la penca. d) Haz vascular.....	40
Fig. 3.7.	a) Oxalatos de calcio monohidratados en forma de rafidios. b) Oxalato de calcio monohidratado en forma de estiloide. c) Silicato.....	41
Fig. 3.8.	Determinación de humedad y sólidos totales en la penca.....	45
Fig. 3.9.	Sólidos totales, sólidos volátiles y sólidos fijos de la penca y sus fracciones.....	46
Fig. 3.10.	Espectros del estándar de lignina (EL). Avicel de celulosa microcristalina (ACM) y de la penca entera liofilizada ^{1b} (PL). Las bandas principales se indican con una línea vertical.....	48
Fig. 3.11.	Diagrama de especiación del peróxido de hidrógeno.....	50
Fig. 3.12.	Micrografías de SEM que muestran el efecto del tiempo de hinchamiento con peróxido de hidrógeno en la penca entera liofilizada. a) 0 horas de hinchado, b) 1.5 horas de hinchado, c) 3 horas de hinchado, d) 6 horas de hinchado.....	51
Fig. 3.13.	Micrografías SEM de la fracción 1 del pretratamiento con PHA previamente hinchadas con peróxido de hidrógeno. a) 0 horas de hinchamiento. b) 1.5 horas de hinchamiento. c) 3 horas de hinchamiento. d) 6 horas de hinchamiento.....	52
Fig. 3.14.	Índice de cristalinidad del Avicel de celulosa microcristalina (ACM), de la penca liofilizada sin ningún pretratamiento (PL), de la fracción 1 a partir de la penca previamente hinchada con peróxido de hidrógeno: con 0 horas de hinchamiento (H-0 h); 1.5 horas de hinchamiento (H-1.5 h); 3 horas de hinchamiento (H-3 h); 6 horas de hinchamiento (H-6 h).....	53
Fig. 3.15.	Espectros de la penca entera liofilizada (PL), de la fracción 1 con: 0 h de hinchamiento (H-0h); 1.5 h de hinchamiento (H-1.5h); 3 h de hinchamiento (H-3h); 6 h de hinchado (H-6h). Las bandas principales se indican con una línea vertical.....	55
Fig. 3.16.	Micrografías de la penca entera liofilizada sin pretratamiento con PHA y de la fracción 1 obtenidas después del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F1E1) y 6 h (F1E2). a) Penca entera liofilizada sin PHA a 250×. b) F1E1 a 250×. c) F1E1 a 1000×. d) F1E1 a 1500×. e) F1E2 a 250×. f) F1E2 a 1000×. g) F1E2 a 1500×.....	59
Fig. 3.17.	Índice de cristalinidad de la celulosa de: estándar de celulosa microcristalina (ACM); penca liofilizada (PL) sin pretratamiento; fracción 1 con PHA a 1.5 h (F1E2); la fracción 1 con PHA a 6 h (F1E2).....	60
Fig. 3.18.	Espectros del estándar de lignina (EL), del Avicel de celulosa microcristalina (ACM); la penca liofilizada (PL); las fracciones 1	

	con PHA a 1.5 h (F1E1) y 6 h (F1E2). Las bandas principales se indican con una línea vertical.....	62
Fig. 3.19.	Micrograffías de SEM que muestran la morfología de la fracción 2 recuperada del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F2E1) y 6h (F2E2). a) F2E1 a 200×. b) F2E1 a 250×. c) F2E1 a 1500×.d) F2E2 a 200×. e) F2E2 a 500×. f) F2E2. a 800×.....	63
Fig. 3.20.	a) Difractogramas de la fracción 2 del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F2E1) y a 6 h (F2E2).....	64
Fig. 3.21.	Espectros de la peca liofilizada sin pretratamiento (PL), de la fracción 2 del experimento con PHA a 1.5 h (F2E1) y a 6 h (F2E2). Las bandas principales se indican con una línea vertical..	65
Fig. 3.22.	Micrograffías de SEM que muestran la morfología de la fracción 3 recuperada del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F3E1) y a 6h (F3E2), así como el estándar de lignina. a) F3E1 a 500×. b) F3E2 a 300×. c) Estándar de lignina a 100×. d) Estándar de lignina a 500×. Flechas blancas: xilema. Flechas amarillas: vainas.....	66
Fig. 3.23.	Difractogramas de: estándar de lignina (EL), de la fracción 3 del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F3E1) y de la fracción 3 recuperada del pretratamiento con PHA a 6 h (F3E2).....	67
Fig. 3.24.	Espectros de la peca entera liofilizada sin ningún pretratamiento (PL), estándar de lignina (EL), de la fracción 3 de los experimentos con PHA a 1.5 h (F3E1) y a 6 h (F3E2). Las bandas principales se indican con una línea vertical.....	68
Fig. 3.25.	Producción acumulada de biohidrógeno de la peca y sus fracciones sin ningún pretratamiento. Todos los ensayos se realizaron con un contenido de sólidos volátiles de 3.5 g SV/L a 35°C.....	70
Fig. 3.26.	Caracterización química de los hidrolizados enzimáticos.....	73
Fig. 3.27.	Micrograffías de la peca liofilizada sin ningún pretratamiento (a), peca liofilizada sometida a hidrólisis enzimática (a'), fracción 1 con PHA a 1.5 h sin hidrólisis enzimática (b) y con hidrólisis enzimática (b'), fracción 1 con PHA a 6 h sin hidrólisis (c) y con hidrólisis enzimática (c'), fracción 2 con PHA a 1.5 h sin hidrólisis enzimática (d) y con hidrólisis enzimática (d') y la fracción 2 con PHA a 6h sin hidrólisis enzimática (e) y con hidrólisis enzimática (e').....	74
Fig. 3.28.	Producción acumulada de biohidrógeno en lote de los hidrolizados de peca entera y fracciones 1 y 2 obtenidas del pretratamiento de la peca con PHA a 1.5 h y 6h.....	76

Anexos

Anexo A	EDS correspondientes a las micrografías de la Fig. 3.7.....	86
Anexo B	Difractogramas de la penca entera y sus fracciones.....	87
Anexo C	Balance de masa para el pretratamiento de penca con PHA a 1.5 h (a) y PHA a 6h (b) en base al método de Van Soest...	88
Anexo D	Balance de masa para el pretratamiento de penca con PHA a 1.5 h (a) y a 6h (b) en base al análisis termogravimétrico...	89

Abreviaturas

AFEX	Explosión de fibra con amoniaco
AGVs	Ácidos grasos volátiles
AR	Azúcares Reductores
AT	Azúcares totales
ATR-FTIR	Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (por sus siglas en inglés)
BAT	Bagazo de <i>Agave tequilana</i>
DNS	Ácido dinitrosalicílico (por sus siglas en inglés)
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EDS	Espectroscopía de dispersión de energía
F.A.C.	Frédéric Albert Constantin
F1E1	Fracción 1, experimento 1 (PHA a 1.5 h)
F1E2	Fracción 1, experimento 2 (PHA a 6 h)
F2E1	Fracción 2, experimento 1 (PHA a 1.5 h)
F2E2	Fracción 2, experimento 2 (PHA a 6 h)
F3E1	Fracción 3, experimento 1 (PHA a 1.5 h)
F3E2	Fracción 3, experimento 2 (PHA a 6 h)
Hmax	Producción acumulada de biohidrógeno
HMF	Hidroximetil furfural
IC	Índice de cristalinidad
PH	Peróxido de hidrógeno
PHA	Peróxido de hidrógeno alcalino
PL	Penca liofilizada
PEL	Penca entera liofilizada
RMH	rendimientos molares de biohidrógeno
S1	Capa externa
S2	Capa intermedia
S3	Capa interna
SEM	Microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en inglés)
SF	Sólidos fijos
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TCD	Detector de conductividad térmica
TGA	Análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés)
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de biohidrógeno

Resumen

Deslignificación de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber empleando peróxido de hidrógeno alcalino como pretratamiento para la producción de biohidrógeno

Palabras clave: biomasa lignocelulósica, peróxido de hidrógeno alcalino, biocombustibles gaseosos, fermentación oscura, biohidrógeno.

La penca de *Agave tequilana* Frédéric Albert Constantin (F.A.C.) Weber es un residuo agroindustrial que podría representar una fuente importante de biomasa para la producción de biohidrógeno por su contenido de celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, la presencia de lignina en este material impide que exista una adecuada disponibilidad de dichos polisacáridos, por lo que es necesario aplicar un pretratamiento que nos ayude a deslignificar. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la deslignificación de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber empleando un pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) seguido de una hidrólisis enzimática para la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa. Para ello, se estudiaron los cambios morfológicos y químicos de las fibras de la penca liofilizada antes y después del pretratamiento con PHA y se caracterizaron químicamente los hidrolizados enzimáticos. Para esto se realizaron análisis químicos (análisis de fibras, TGA y ART-FTIR), morfológicos (SEM, XRD) y análisis de azúcares y DQO. De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayor remoción de lignina y el enriquecimiento más alto de celulosa, así como la mayor sacarificación se obtuvieron cuando se utilizó peróxido de hidrógeno al 2%, con pH de 11.5 y a un tiempo de contacto de 1.5 h. Se encontró que los hidrolizados enzimáticos de la penca sin pretratamiento alcanzaron concentraciones de 6.44 g AT/L. En comparación con estas concentraciones, el hidrolizado enzimático de la primera fibra remanente después del pretratamiento con PHA (fracción 1) alcanzó concentraciones 2.5 más altas. En cuanto a la producción de biohidrógeno, la penca entera liofilizada sin ningún tratamiento tuvo un rendimiento de producción de biohidrógeno de 0.0574 mmol H₂/g de penca, en tanto que la fracción 1 obtenida después del pretratamiento con PHA a 1.5 h y seguida de hidrólisis enzimática, tuvo un mayor rendimiento de producción de biohidrógeno (5.62 mmol H₂/g de fibra). Esto indica que la producción de biohidrógeno incrementó casi 98 veces. Por lo tanto, la deslignificación de la penca incrementó la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa generando que, durante la hidrólisis enzimática, se obtuvieran

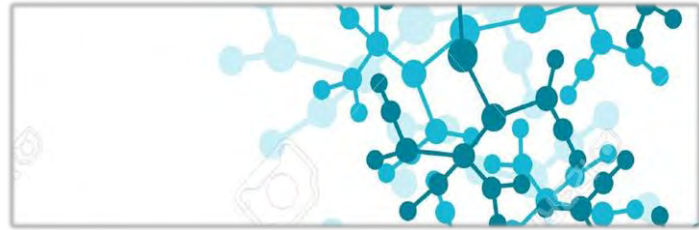
mayores rendimientos de sacarificación y de esta forma se mejoraron los rendimientos de producción de biohidrógeno.

Abstract

Delignification of leaf of *Agave tequilana* F.A.C. Weber using alkaline hydrogen peroxide as a pretreatment to biohydrogen production.

Keywords: lignocellulosic biomass, alkaline hydrogen peroxide, gaseous biofuels, dark fermentation, biohydrogen.

The leaf of *Agave tequilana* Frédéric Albert Constantin (F.A.C.) Weber is an agro-industrial waste that could represent an important source of biomass for the production of biohydrogen by its content of cellulose and hemicellulose. However, the presence of lignin in this material generates low availability of such polysaccharides, therefore it is necessary to apply a pretreatment to help to remove lignin. For that reason, the objective of this study was to evaluate the delignification of leaf of *Agave tequilana* F.A.C. Weber using alkaline hydrogen peroxide (AHP) followed by an enzymatic hydrolysis for cellulose and hemicellulose saccharification. For that, was studied chemical and morphological changes of fibers of the lyophilized whole leaf before and after of the pretreatment with AHP and chemically characterized of enzymatic hydrolysates. For this was performed chemical analysis (fiber analysis, TGA and ART-FTIR), morphological (SEM, XRD) and sugar analysis and COD. According to the results, the higher removal of lignin and cellulose enrichment, as well as major saccharification was obtained when hydrogen peroxide was used 2%, pH 11.5 and a contact time of 1.5 h. It was found that in the enzymatic hydrolysates of leaf without pretreatment reached concentration of 6.44 g TS/L. Compared to these concentrations, the enzymatic hydrolysate of the first fiber remaining after pretreatment with PHA (fraction 1) had concentrations 2.5 higher. Biohydrogen production of the lyophilized whole leaf without any treatment had a biohydrogen yield was 0.0574 mmol H₂/g of leaf, whereas fraction 1 pretreated with PHA 1.5 h under an enzymatic hydrolysis, was also the highest biohydrogen yield (5.62 mmol H₂/g fiber). This indicates that biohydrogen production increased almost 98 times. Therefore, the delignification in the leaf increased availability of cellulose and hemicellulose generating, during the enzymatic hydrolysis, higher yields saccharification and biohydrogen production yields were improved.



Introducción

En la actualidad, la demanda exponencial de combustibles fósiles ha generado una disminución en su disponibilidad, así como impactos negativos en el medio ambiente y la salud humana debido a los contaminantes emitidos durante su combustión. De acuerdo con la compañía British Petroleum (BP), el consumo mundial de petróleo aumentó en 1.4 millones de barriles al día en el 2013 (Sieminski, 2014). Como consecuencia de esta alta demanda del combustible, las reservas del petróleo se van agotando rápidamente al igual que su disponibilidad (Bedoya *et al.* 2007). Aunado a esto, de acuerdo con el IPCC en el 2013, la quema de combustibles fósiles (y en menor porcentaje, la fabricación del cemento) es causante de más del 75% de las emisiones antropogénicas de CO₂ (Stocker *et al.* 2013).

Por tales motivos, se están buscando fuentes alternas de energía que sean sostenibles y amigables con el ambiente. Ante esta problemática, las energías renovables representan una alternativa potencial debido a sus altos rendimientos energéticos y su bajo o nulo impacto negativo en el ambiente. Algunos ejemplos de este tipo de energías son: la energía solar, eólica, geotérmica, hidroeléctrica y la energía generada a partir de biomasa. Todas estas fuentes alternas de energía han mostrados resultados positivos. Sin embargo, en la actualidad, diversas investigaciones se están enfocando en la producción de energía generada a partir de biomasa lignocelulósica. Este material presenta un gran potencial por su contenido en polisacáridos (hemicelulosa y celulosa) los cuales son susceptibles de fermentarse por vía microbiana para obtener biohidrógeno (fermentación oscura). Además, existen estudios donde se ha demostrado que la biomasa puede ser una fuente para la producción de biocombustibles como biohidrógeno y metano (Abreu, 2013; Arreola-Vargas *et al.* 2013).

De acuerdo con Marín *et al.* (2014) hay 4 clasificaciones de biocombustibles de acuerdo con la fuente empleada para su producción: los de primera generación que son producidos a partir de cultivos energéticos. Los de segunda generación son materiales lignocelulósicos. Dentro de esta clasificación, se encuentran los residuos

lignocelulósicos, pastos, etc. Sin embargo, el uso de los residuos lignocelulósicos como sustrato para la generación de energía, tienen la gran ventaja de que se contribuyen a disminuir la contaminación generada por estos residuos, ya que actualmente se generan 2×10^{11} ton/año de residuos de esta índole (Tuck *et al.* 2012). Aunado a esto, se revalorizarán este tipo de biomasa que tiene la particularidad de ser renovable.

Los biocombustibles de tercera generación tienen la característica de llevar a cabo el uso de algas, mientras que en los biocombustibles de cuarta generación se emplean organismos genéticamente modificados. Cabe mencionar que esta última clasificación de biocombustible, aún se encuentra en desarrollo. Existen diversos estudios que han demostrado que la producción de biocombustibles como el biohidrógeno o metano a partir de residuos lignocelulósicos presenta buenos rendimientos de producción de estos biogases. Sin embargo, el biohidrógeno tiene la particularidad de ser una fuente de energía renovable y limpia, debido a que durante su combustión únicamente se genera agua y energía.

La penca de *Agave tequilana* Frédéric Albert Constantin (F.A.C.) Weber, puede ser una fuente viable de producción de biocombustibles como es el biohidrógeno debido a que contienen un alto contenido de material lignocelulósico: celulosa 28.79%, hemicelulosa 10.71% y lignina 5.05% (Salas, 2013). Sin embargo, para utilizar la celulosa y hemicelulosa es necesario llevar a cabo una deslignificación. Existen diversos pretratamientos para la deslignificación, siendo uno de ellos el uso del peróxido de hidrógeno alcalino (PHA), con el cual se han reportado rendimientos altos tanto de deslignificación como de recuperación de hemicelulosa y celulosa en sustratos que tienen características similares a la penca. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la deslignificación de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber empleando PHA. Por otro lado, se evaluaron los rendimientos y velocidades de producción de biohidrógeno en lote por fermentación oscura, a partir de las fracciones de celulosa y hemicelulosa recuperadas del pretratamiento de deslignificación.

Capítulo 1.- Marco teórico.



1.1. Importancia del biohidrógeno

El biohidrógeno como combustible presenta la particularidad de tener alta capacidad de generación de energía por unidad de peso (122-142 kJ/g). Comparándolo con otros tipos de combustibles energéticos, es de los más eficientes en la producción de energía (Argun y Kargi, 2011; Shina y Pandey, 2011). Sin embargo, el biohidrógeno no se encuentra disponible de forma natural, a diferencia de los combustibles fósiles. Debido a esto, se han realizado diversas investigaciones donde se busca obtener mayor eficiencia y mejores rendimientos de producción de este gas (Blanco y Rodríguez, 2012).

Existen diversas fuentes de producción de biohidrógeno, entre ellas se encuentra la oxidación catalítica de gas natural, por medio de metales pesados y nafta, a partir de carbón, por electrólisis y bioquímica (Shina y Pandey, 2011). Sin embargo, la producción bioquímica representa mayor interés por ser potencialmente una forma de producción de energía inagotable y no requiere alto consumo energético (Blanco y Rodríguez, 2012).

1.2. Biomasa lignocelulósica

1.2.1. Importancia de la biomasa lignocelulósica

La cantidad de materiales lignocelulósicos producidos anualmente es de alrededor de 220 mil millones de toneladas en todo el mundo y su conversión a biocombustibles equivaldría aproximadamente a 80 mil millones de toneladas de petróleo crudo (Ren *et al.* 2009). Esta biomasa se encuentra constituida principalmente por tres componentes: celulosa (40-60%), hemicelulosa (20-30%) y lignina (15-30%) (Saha y Cotta, 2008). De estos tres, la celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (Klemm *et al.* 2002). Durante los últimos años, se han desarrollado proyectos basados en la química verde, lo que ha conducido a la generación de materiales celulósicos novedosos, así como la generación de energía (como el bioetanol y biohidrógeno) y bioaceites.

1.2.1.1. Residuos lignocelulósicos

Todos los días, se desechan grandes cantidades de residuos celulósicos tanto agrícolas como industriales y municipales, los cuales son acumulados o utilizados de manera ineficiente debido a su costo involucrado en los procesos de reutilización (Sukumaran *et al.* 2009). La conversión de la celulosa en azúcares fermentables es un área en la cual se están enfocando diversas investigaciones, ya que es un requisito previo para la posterior producción de bioenergía (Kumar *et al.* 2008). Esta conversión de los residuos lignocelulósicos es de considerable importancia económica para poder desarrollar procesos para el tratamiento y la utilización eficaz de celulosa y hemicelulosa como fuentes de carbono de bajo costo para su posterior utilización para la generación de biocombustibles como es el biohidrógeno y biometano (Ballesteros *et al.* 2004).

1.2.1.2. Cultivos bioenergéticos

Otra alternativa es el cultivo de biomasa para la producción de biocombustibles. Existen diversas definiciones de cultivos energéticos (Castro y Sánchez, 1997; Crespo, 1999; De Juana y Fernández, 2002; Nava *et al.* 2014) o también conocidos como cultivos agroenergéticos (Domínguez, 1991). Nava *et al.* (2014) los define como aquellos cultivos agrícolas, forestales o acuáticos, cuya producción parcial o total se utiliza como materia prima para generar energía aprovechable. También, se pueden definir a los cultivos energéticos como aquellas siembras agrícolas donde se hace uso de la biomasa para la producción de energía (Lewandowski *et al.* 2003). De acuerdo con Kaltschmitt, *et al.* (2001), una de las principales características que se desea tener en este tipo de biomasa, es un alto contenido de lignina y celulosa, principalmente cuando se emplean como biocombustibles sólidos, por dos razones principales. La primera causa es porque tienen un alto valor de calentamiento debido al alto contenido de carbono en lignina (aproximadamente 64%). El segundo motivo es porque pueden reproducirse en suelos con bajo contenido de agua.

La biomasa producida por medio de cultivos energéticos se divide principalmente en dos: herbáceas y leñosas. La energía generada a partir de esta biomasa, puede ser por combustión directa o gasificación de los cultivos para

producir electricidad y calor, o mediante la conversión a combustibles líquidos como el etanol para su uso en vehículos. Otra alternativa es la producción de biocombustibles gaseosos para la producción de calor y electricidad.

Una de las problemáticas que se ha generado por este tipo de cultivos es la utilización de fertilizantes para la obtención de mejores rendimientos de producción de biomasa. Sin embargo, se siguen buscando plantas que no requieran de la aplicación de estas sustancias y con poco requerimiento de agua para su desarrollo.

1.2.2. Anatomía, estructura y composición química de la biomasa lignocelulósica

1.2.2.1. Composición química

De acuerdo con Esau (1985), la celulosa es el principal constituyente del material lignocelulósico, seguido por la lignina y la hemicelulosa (Fig. 1.1). En menor porción, se encuentran las pectinas, proteínas, compuestos grasos, cutina, suberina y ceras. También tienen presencia algunos compuestos orgánicos y sustancias minerales como el silicato y los oxalatos de calcio, pero raramente constituyen una parte esencial en la composición y estructura del material lignocelulósico (Ragauskas *et al.* 2006). Sin embargo, la composición y porcentajes de los polímeros que la conforman varían entre los diferentes tipos de plantas, su edad y la etapa de crecimiento, entre otros (Jeffries, 1994).

La celulosa (Fig. 1.1-a) es el biopolímero más abundante en la naturaleza, ya que se trata del principal componente estructural de las células vegetales. Este biopolímero está conformado por microfibrillas cristalinas insolubles, y por subunidades de glucosa que se unen mediante enlaces glucosídicos en la configuración β -1-4 dando lugar a la unidad central celobiosa que se repite exactamente en la cadena polimérica (Esau, 1985). Este tipo de estructuras forman a las microfibrillas que, a su vez, al acoplarse una con otra, crean arreglos cristalinos y algunos arreglos amorfos. Estas microfibrillas se unen formando múltiples capas que están embebidas en una matriz de hemicelulosa y/o lignina (González-García *et al.* 2005).

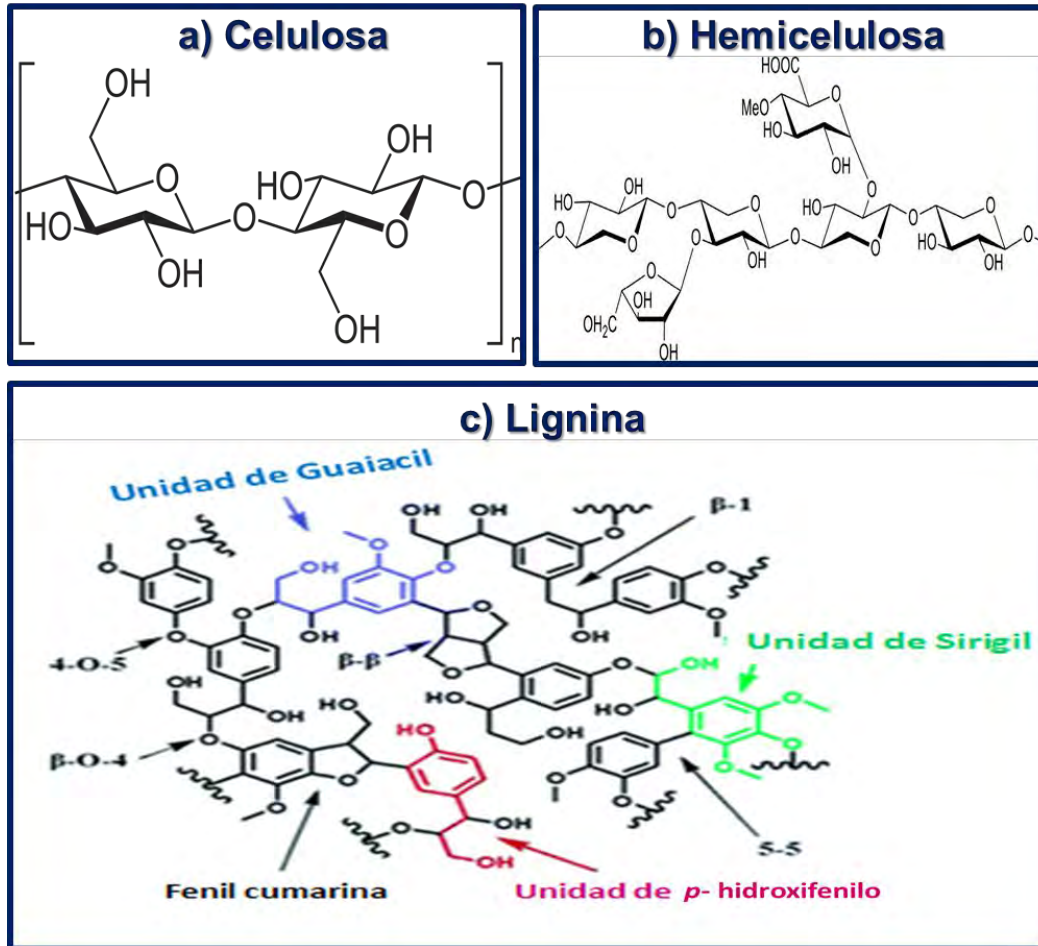


Fig. 1.1. Estructura química de la celulosa, hemicelulosa y lignina (Deng *et al.* 2015).

La hemicelulosa (Fig. 1.1-b) es un polisacárido que está constituido por pentosas y hexosas. En la hemicelulosa, encontramos diversas subunidades, como las pentosas (xilosa, ramnosa y arabinosa) y las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). En menor proporción, también hay ácidos urónicos (4-O-Metilglucurónico, D-Glucurónico, y D-Galacturónico). Este último grupo de monosacáridos (ácidos urónicos), constituyen las sustancias pécticas, las cuales se presentan principalmente de tres formas: protopectina, pectina y ácido péctico (Esau, 1985).

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado compuesto por alcoholes aromáticos, los cuales le dan soporte estructural, rigidez, protección e impermeabilidad a los polisacáridos estructurales de celulosa y hemicelulosa (Aro *et al.* 2005). La composición química de este biopolímero (Fig.

1.1-c), se encuentra constituido principalmente por: cumaril (H), guaiacil (G) y sirigil (S) (Ralph *et al.* 2004). En la Tabla 1.1 se describe la composición química de cada uno de los compuestos que conforman a los materiales lignocelulósicos, así como sus características principales.

Tabla 1.1. Composición y estructura química de la lignina, celulosa y hemicelulosa (Chen, 2014).

	Lignina	Hemicelulosa	Celulosa
Subunidades	Guaiacil propano (G), Sirigil propano (S), p-hidroxifenil propano (H)	D-Xilosa, manosa, L-arabinosa, galactosa, ácido glucurónico	Unidades de glucosa
Enlaces entre sus subunidades	Varios enlaces éter y enlaces C-C, algunos enlaces éter β -O-4	Enlaces β -1,4-glucosídicos en algunas cadenas. Enlaces β -1,3-, β -1.6-glucosídicos en los extremos de los enlaces	Enlaces β -1,4-glucosídicos
Polimerización	4 000	>200	100 -14 000
Polímero	Lignina G, lignina GS, lignina GSH	Xilosa, galactoglucomanano (Gla,Glu,Man), glucomanano (Glu,Man)	Glucano
Composición	Amorfa, heterogénea, polímero tridimensional no lineal.	Molécula heterogénea tridimensional con una pequeña región cristalina	molécula lineal tridimensional compuesta de una región cristalina y otra amorfa
Enlaces entre los tres componentes	Contiene enlaces químicos con hemicelulosa	Contiene enlaces químicos con la lignina	Sin enlaces químicos

1.2.2.2. Estructura de la pared celular

De acuerdo con Chen, (2014), la composición química de la pared celular está constituida en mayor porción por celulosa (la cual determina la estructura de la pared celular), posteriormente, encontramos en mayor cantidad la lignina y consecutivamente la hemicelulosa y pectinas, cutinas, suberinas y ceras. La distribución y concentración de cada uno de estos componentes varía de acuerdo al tipo de pared en el que se encuentre. Cuando las células están lignificadas, la

pared celular se puede dividir en 3 tipos: lámina media, pared primaria y posteriormente la pared secundaria (Fig. 1.2).

La capa más externa de la pared celular es la lámina media, la cual está constituida principalmente por lignina, además está constituida por sustancias pécticas. Esta lamina le otorga hidrofobicidad y plasticidad a las plantas (Taiz *et al.* 2006). Posterior a la lámina media, se encuentra la pared primaria, que es formada gracias a las secreciones de protoplastos, es decir, durante el crecimiento celular. La composición química de esta pared celular está constituida principalmente por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina), proteínas, enzimas, glicoproteínas, y algunos iones como es el calcio. En algunas ocasiones, la lignina también se encuentra presente en esta pared celular, pero en pequeñas concentraciones. Esta pared primaria tiene como objetivo el proporcionar soporte estructural y mecánico controlar la velocidad y la dirección del crecimiento celular, resistir la deshidratación, y activar la interacción entre las moléculas de la señal fuente y las células (Phitsuwan *et al.* 2013; Chen, 2014).

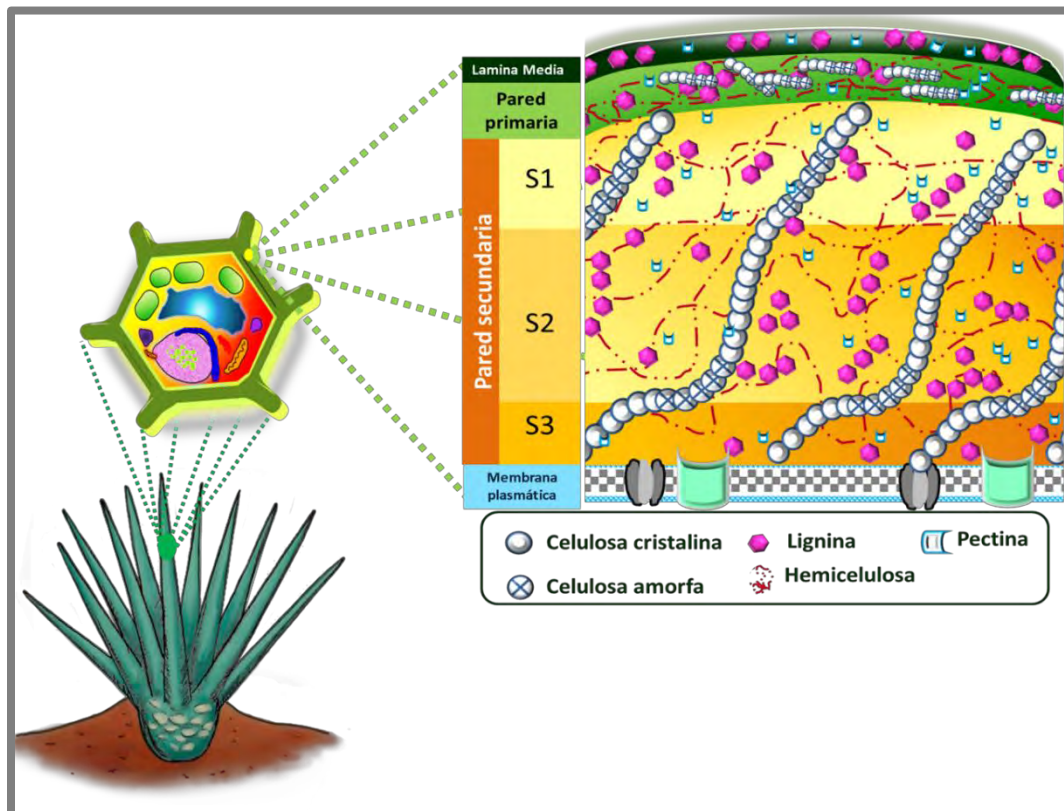


Fig. 1.2. Estructura y composición química de la pared celular vegetal (adaptado de Phitsuwan *et al.* 2013 y Achyuthan *et al.* 2010).

Una vez que se detuvo el crecimiento de la pared primaria, comienza a darse la formación de la pared secundaria. Esta pared está dividida en tres capas: capa interna (S3), la capa intermedia (S2), y la capa externa (S1) (Bidlack *et al.* 1992). Cada una de estas capas tiene diferencias en la composición, la estructura, el ángulo microfibrilar (Fig. 1.2). Esta pared está conformada por celulosa y hemicelulosa y una mayor concentración de lignina en comparación con las otras paredes. La presencia de la lignina en esta pared genera soporte mecánico para que las plantas crecen hacia arriba (Somerville, 2006). La concentración de celulosa en esta pared celular es mayor que la pared primaria, carece de pectinas y su componente básico es la hemicelulosa (Chen, 2014).

1.2.2.3. Anatomía vegetal

Los compuestos lignocelulósicos se encuentran distribuidos y concentrados en diversas formas de acuerdo a la planta, a su estructura y anatomía vegetal. Los tres órganos vegetativos principales de las plantas son: la raíz, el tallo y sus hojas (Esaú, 1985). Las hojas en particular, están constituidas principalmente en cuatro tejidos: la cutícula, epidermis, parénquima, haces vasculares constituidos por xilema y floema (Fig. 1.3). La presencia de cada uno de estos componentes varía en relación a cada planta. De acuerdo con Esaú (1985), las definiciones y características de cada uno de estos tejidos se describen a continuación.

La epidermis se encuentra en la capa superior del cuerpo de la planta en estado primario y es la interface entre el medio ambiente y la parte interna de la planta. Su objetivo es proteger mecánicamente e intervenir en la limitación de la transpiración y aireación. En particular, las especies del género *Agave* tienen epidermis que tienen la característica de contener una cutícula gruesa, un revestimiento ceroso y estomas complejos, además de que tienen la capacidad de adaptarse a condiciones áridas.

La cutícula es definida como aquella capa delgada constituida principalmente por cutina, que es un polímero de ácidos grasos de cadena larga (C16 y C18) unidos por enlaces éster, formando una red rígida tridimensional. El objetivo de la cutícula es prevenir la pérdida de agua y como se mencionó anteriormente, esta se encuentra en la parte superior de la epidermis. Posteriormente, encontramos el

parénquima que tiene como objetivo almacenar diversas sustancias, además de que se encarga de la cicatrización de las heridas que puede tener en el sistema vegetal y de ciertas estructuras adventicias. En este tipo de tejido, se encuentran principalmente células con pared primaria, enriquecida con sustancias pécticas. Las formas que llegan a tener estas células varían entre empalizadas o lagunares. Este tipo de tejidos pueden dar formación a tejidos de colénquima, esclerénquima o fibra; esto se logra una vez que el parénquima engrosa sus paredes y dan formación a estas nuevas estructuras.

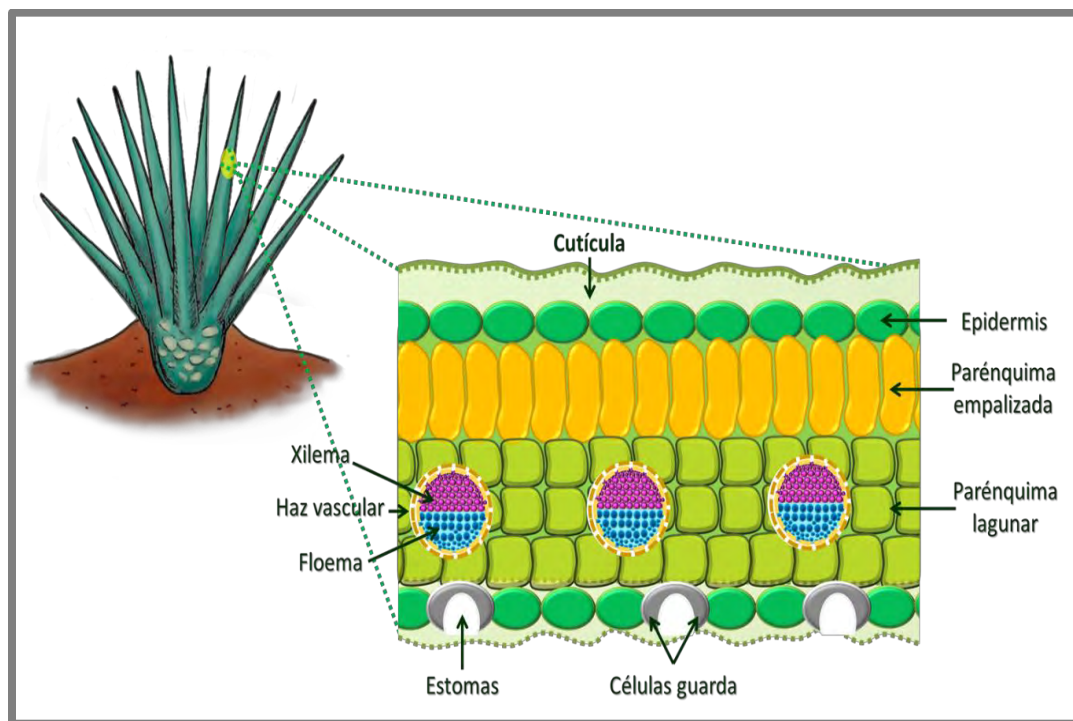


Fig. 1.3. Anatomía vegetal de las hojas (Adaptado de Streffer, 2014).

Los tejidos de colénquima y esclerénquima son otras dos estructuras que son el sostén en la planta. Las células de la colénquima están constituidas por paredes primarias engrosadas. Este tejido está compuesto por celulosa, pectina y hemicelulosa, y pequeñas o nulas cantidades de lignina. A diferencia de las células colenquimáticas, las células esclerenquimáticas tienen paredes secundarias lignificadas. Este tipo de estructura vegetal, ofrece elasticidad, fortaleza y resistencia a la planta. Dentro de las estructuras constituidas por células esclerenquimáticas, están las fibras. Estas presentan una estructura alargada y

estrecha, con extremos engrosados. Estas también están constituidas principalmente por paredes secundarias lignificadas. Esta estructura es clasificada en dos: xilares o fibras de leño (xilema secundario) y las extraxilares. Esa clasificación se da de acuerdo a su localización, ya sea que estén presentes o no en el xilema secundario.

Los haces vasculares son otra estructura importante dentro de la anatomía vegetal, ya que se encuentra constituido por células xilemáticas y floemáticas que se encargan de la conducción de agua y nutrientes. El xilema tiene como función la conducción de agua, almacenamiento y soporte, por eso se extiende de manera continua a lo largo de la hoja vegetal. Mientras que el floema lleva a cabo el transporte y almacenamiento de sustancias nutritivas.

Los oxalatos de calcio son cristales vegetales que se encuentran en todos los tejidos vegetales. Estas estructuras ayudan a darle rigidez a la planta, pero a su vez, le permite tener cierta flexibilidad a la planta. Las estructuras cristalinas se presentan en diferentes formas, dependiendo de su arreglo estructural. Los tipos de cristales que hay son: drusas (formas compuestas), estiloides (alargados en formas simples), y rafidios (alargados y agrupados). Los cristales parecen aportar una función protectora de la hoja, pero en grandes cantidades indican la presencia de estrés. El tipo de oxalato de calcio puede ser de dos tipos: whewelita (oxalato de calcio monohidratado) o weddelita (oxalato de calcio dihidratado) (Prychid *et al.* 1999).

1.3. Anatomía del *Agave tequilana* F.A.C. Weber

El género *Agave* es considerado originario de México, dentro del cual se encuentran 135 especies endémicas, 272 de 310 especies de *Agave* reportados hasta en la actualidad (García, 2002). Los agaves son plantas rosetas, monocotiledóneas y monocárpicas. La anatomía del agave se encuentra constituida principalmente por el sistema radicular, un tallo, un cogollo y hojas (comúnmente conocidas como pencas) las cuales contienen una espina apical y espinas laterales.

El *Agave tequilana* F.A.C. Weber (Fig.1.4) pertenece al subgénero *Agave* y se encuentra dentro del grupo Rigidaceae. La abreviatura F.A.C. Weber se emplea para

indicar a Frédéric Albert Constantin Weber, autoridad en la descripción y clasificación científica de los vegetales. Esta especie de agave se caracteriza por ser una planta carnosa en forma de roseta, fibrosa, de color azul o verde grisáceo originado por su alto contenido de ceras que impiden que la planta pierda agua. La característica fenotípica más importante son sus hojas rígidas y lanceoladas, con espinas marginales y apicales; almacena inulina en el tallo y es productora de fructuosa (Gentry, 1982).

Este tipo de agave es una planta xerófila debido a que se desarrolla en zonas áridas y cálidas. Es una planta que mide entre 2.2 a 2.8 metros de altura, tiene un tallo grueso y corto (30 a 50 cm de altura al lograr la madurez). Sus hojas o comúnmente conocidas como pencas, miden entre 90 y 120 cm, lanceoladas y con fibras firmes además de cóncavas. Tienen una coloración de glauco azulado a verde grisáceo y una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm en la punta de las hojas, además de una serie de espinas laterales en cada penca (Granados, 1993).

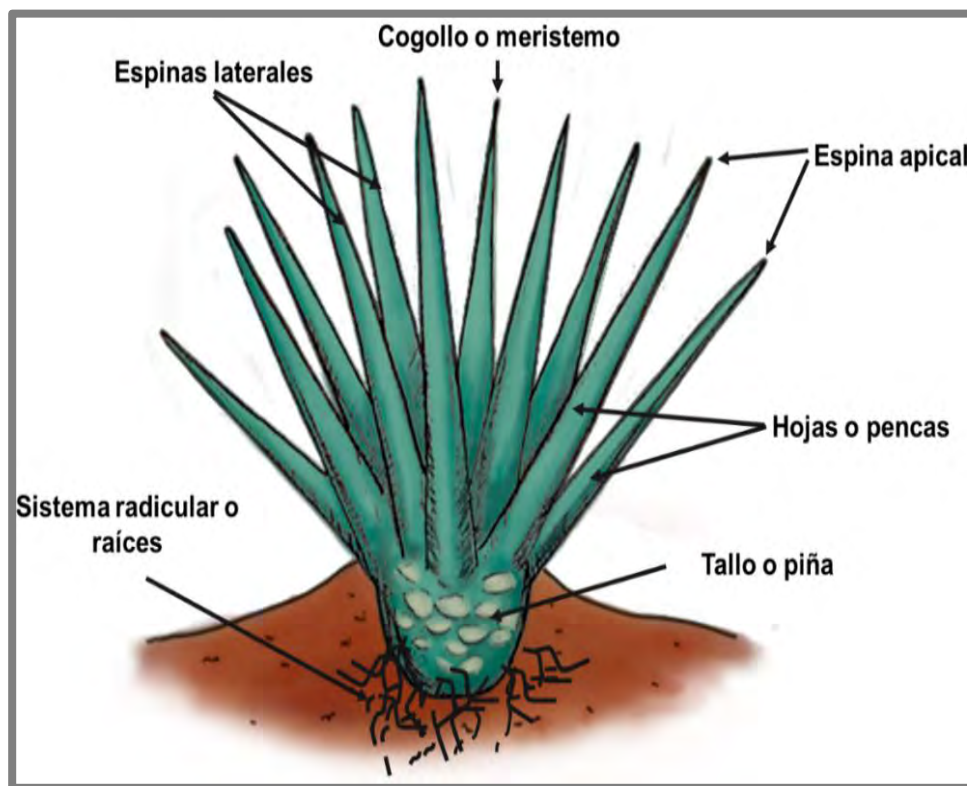


Fig. 1.4. Morfología del *Agave tequilana* F.A.C. Weber.
Esquema obtenido de: <http://www.baluartes.com.mx/home.html#galeria>

1.4. Pretratamientos

La producción de biohidrógeno se puede llevar a cabo por medio de biomasa sometida a fermentación oscura (Marika *et al.* 2014). Sin embargo, debido a la estructura compleja de la biomasa, es necesario someter al material lignocelulósico a una serie de pretratamientos antes de la degradación enzimática. La aplicación de los pretratamientos tiene tres objetivos principales: romper los enlaces que unen la lignina a la celulosa y hemicelulosa, disminuir la cristalinidad de la celulosa y por último, incrementar la disponibilidad de la celulosa (Ren *et al.* 2009). Para esto, existen diversos tipos de pretratamientos: físicos (trituration o molienda), químicos (ácido, alcalino u oxidativo), físico-químicos (explosión con vapor) y biológicos (enzimas, hongos o bacterias).

1.4.1. Tipos de pretratamientos

La aplicación de los pretratamientos tiene tres objetivos principales: romper los enlaces que unen la lignina a la celulosa y hemicelulosa, disminuir la cristalinidad de la celulosa y por último, incrementar la disponibilidad de la celulosa (Ren *et al.* 2009). Para esto, existen diversos tipos de pretratamientos: físicos (trituration o molienda), químicos (ácido, alcalino u oxidativo), físico-químicos (explosión con vapor) y biológicos (enzimas, hongos o bacterias). A continuación, se explicarán cada uno de estos tipos de pretratamientos.

1.4.1.1. Físicos

1.4.1.1.1. Fragmentación mecánica

Reducir de tamaño, picar, triturar y moler, son los diversos métodos mecánicos de disminución de tamaño de partículas (0.2–2 mm) con el fin de mejorar la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica (Palmowski y Muller, 1999). El objetivo de este proceso es incrementar el tamaño del poro de la partícula, su área superficial y a reducir la cristalinidad y polimerización de la celulosa, por lo que la disponibilidad de la celulosa es mayor para la hidrólisis enzimática (Panagiotopoulos *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2007).

1.4.1.2. Químicos

1.4.1.2.1 Hidrólisis ácida

Consiste en el uso de ácido sulfúrico, nítrico y clorhídrico para llevar a cabo la remoción de hemicelulosa e incrementar la disposición de la celulosa para la hidrólisis enzimática (Schell *et al.* 2003). Durante la hidrólisis ácida se rompen los puentes entre los complejos de lignina, logrando su solubilización gracias a las condiciones ácidas (Knappert *et al.* 1981). Los estudios han demostrado que este tipo de pretratamientos incrementa la disponibilidad de azúcares presentes en la hemicelulosa pero al mismo tiempo, la hemicelulosa solubilizada puede generar compuestos inhibitorios debido a las reacciones hidrolíticas y así generar los inhibidores, tales como los monómeros, furfural e hidroximetil furfural (HMF) (Fengel y Wegener, 1989).

1.4.1.2.2. Hidrólisis alcalina

Este pretratamiento está basado en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que hay entre los xilanos de la hemicelulosa y otros compuestos, como por ejemplo la lignina (Sung *et al.* 2002). Las principales soluciones alcalinas utilizadas son: NaOH, KOH, Ca(OH)₂ o amonio, donde se ha observado que se logra una deslignificación pero también por la alteración química que sufre la lignina, se forman compuestos fenólicos como vanilina o siringaldehído (Taherzadeh y Karimi, 2008).

1.4.1.2.3. Oxidativos

Los pretratamientos oxidativos usan soluciones como el peróxido o el ácido peracético con el objetivo de lograr una oxidación en la biomasa y así, eliminar la hemicelulosa y lignina con el fin de incrementar la accesibilidad de la celulosa (Azzam, 1989). En este tipo de pretratamiento, se pueden llevar a cabo diversas reacciones, tales como el desplazamiento de las cadenas laterales, la ruptura de enlaces alquil aril éter o la ruptura oxidativa de los núcleos aromáticos (Hon y Shiraishi, 2001).

1.4.1.2.3.1. Peróxido de hidrógeno alcalino

El uso del peróxido de hidrógeno (PH) como agente oxidante produce un incremento en la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática ya que se obtienen mejores rendimientos de disponibilidad de celulosa (~80 o 90%) y un 50% de eliminación de lignina y la mayoría de la hemicelulosa (Azzam, 1989). Los radicales $\bullet\text{OH}$ que se producen al someter al PH bajo condiciones alcalinas (pH 11.5 y 11.6), son fundamentales ya que probablemente son los causantes de la solubilización de la lignina y parte de la hemicelulosa (Gould, 1985).

Existen diversos estudios en los que se ha aplicado el PH a diversos tipos de sustrato y analizado diversas variables de respuesta (Tabla 1.2). Según Gould (1985), la concentración de PH debe ser mayor o igual a 1% y la relación de biomasa y volumen de PH debe ser mayor o igual a 0.25 (p/v) para una buena deslignificación. En estos trabajos, se observa que la concentración mínima de peróxido es de 1% y la máxima de 5%. Sin embargo, si comparamos los rendimientos de recuperación de celulosa obtenidos por Wilkinson *et al.* (2014) y de Su *et al.* (2015), ambos tienen rendimientos similares, a pesar de que la concentración de PHA fue diferente (5% y 2%, respectivamente).

Tabla 1.2. Estudios de deslignificación a partir de peróxido de hidrógeno bajo condiciones alcalinas reportados en la literatura.

	Sustrato	Variables de respuesta				Resultados	Referencia
		H ₂ O ₂	Tiempo	temperatura	pH		
1	Aserín	1%	45 min	150°C	11.5	Enriquecimiento de celulosa: 60 %. Remoción de hemicelulosa de 80 % y 17% de lignina	Ayeni <i>et al.</i> , 2013.
2	Paja de centeno	2%	12 h	20-70°C	-	Remoción de hemicelulosa de 71.9% y 87.8% de lignina	Sun <i>et al.</i> , 2000
3	Residuo de granos cerveceros	5%	5 h	100°C	11.5	Enriquecimiento de celulosa entre 85-90%	Wilkinson <i>et al.</i> , 2014
4	Paja de cebada	1.5%	14 h	45°C	12	Remoción de hemicelulosa 85.3% y 72.3% de lignina	Sun <i>et al.</i> , 2001
5	Olote	2%	6 h	50°C	11.5	Recuperación de celulosa 81.3%. Remoción de hemicelulosa de 38.7% y 75.4% de lignina	Su <i>et al.</i> , 2015
6	Bagazo de manzana de anacardo	4%	6 h	35°C	11.5	Recuperación de celulosa de 48.23%. Remoción de hemicelulosa de 21.61% y 7.83% de lignina.	Costa <i>et al.</i> , 2013

Otra de las ventajas del trabajo reportado por Su *et al.* (2015), es que además de lograr remociones de lignina y hemicelulosa de 75.4% y 38.7% respectivamente, recuperan las fracciones separadas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Los rendimientos de recuperación son de 81.3% de celulosa, 88.9% de hemicelulosa y 77.5% de lignina. Al obtener un buen rendimiento de deslignificación, se verá favorecida la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa debido a que estarán más expuestas a las hidrólisis enzimáticas que se llevan a cabo para obtener la sacarificación. Además, el uso de PHA tiene la ventaja de no producir subproductos tóxicos tales como ácido acético y furfural que son inevitables en el pretratamiento ácido (Su *et al.* 2015).

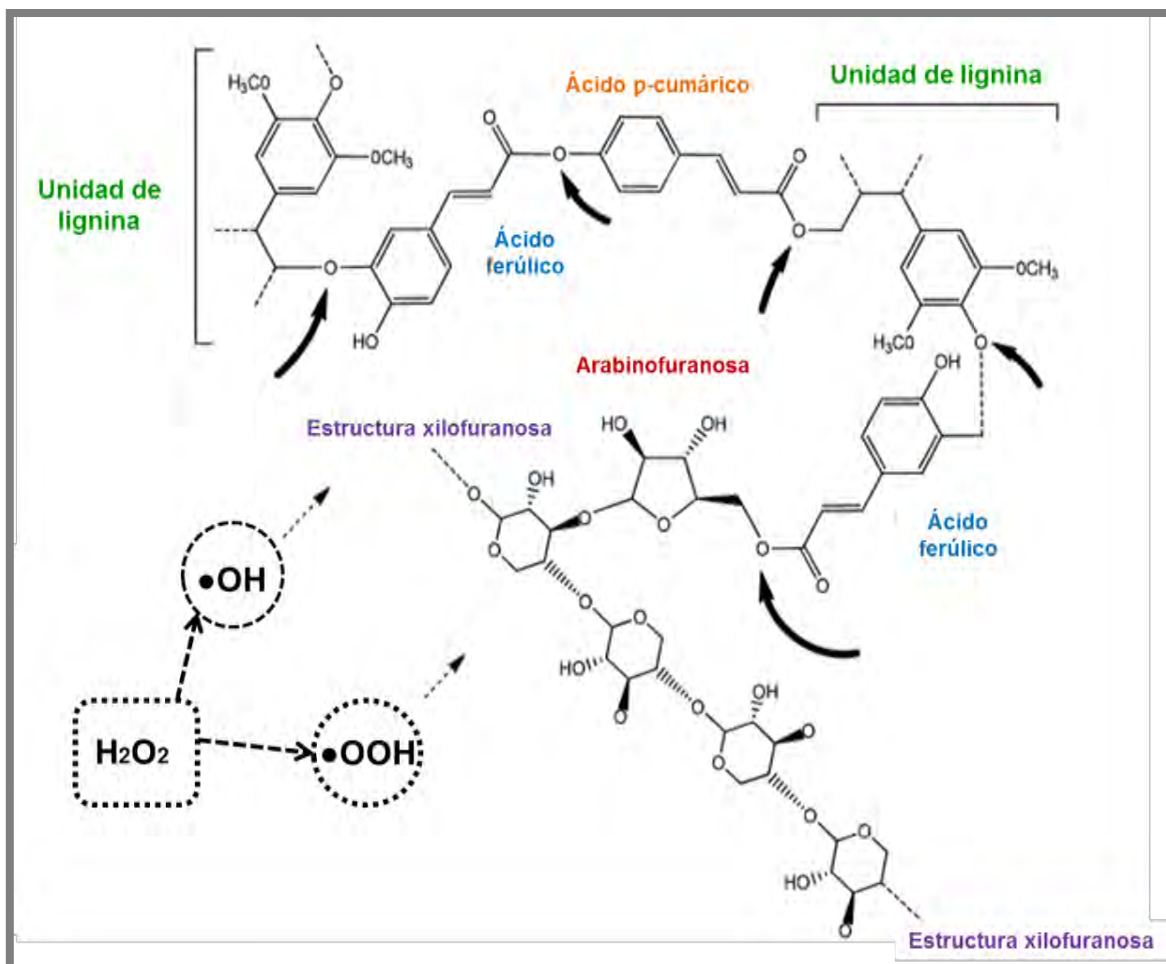


Fig. 1.5. Mecanismo de oxidación de la lignina presente en la biomasa lignocelulósica (Wilkinson *et al.* 2014).

El mecanismo llevado a cabo durante el pretratamiento con PHA consiste en la saponificación de los enlaces ésteres α -bencilo que se encuentran entre la lignina y la hemicelulosa, generando su solubilización. Este proceso se lleva a cabo gracias a la presencia de los radicales hidroxilos (\bullet OH) e hidroperoxilos (\bullet OOH) (Wilkinson *et al.* 2014). Estos radicales se generan al someter al PH bajo condiciones alcalinas, es decir, a pH de 11.5-11.6 (Gould, 1985). Los radicales también pueden generar un ataque en los enlaces fenólicos α -O-4, así como la ruptura de enlaces no fenólicos β -O-4, con la consecuente remoción de las fracciones de lignina residual. Este proceso se genera por medio de la ruptura de enlaces carbono-carbono o por la degradación de los hidratos de carbono, liberando fracciones que se oxidan principalmente en ácidos carboxílicos (Su *et al.* 2000). Dos de los compuestos liberados durante la hidrólisis de la lignina son el ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico (Fig. 1.5).

1.4.1.3. Físico-químicos

1.4.1.3.1. Explosión con vapor

Este tratamiento consiste en el uso del vapor de agua con el objetivo de penetrar la pared celular y producir que la hemicelulosa se hidrolice y la lignina sea transformada. Esto ocurre debido a que el agua tiene la característica de ser ácida a temperaturas muy altas (160-260°C), por determinado lapso (dese 30 segundos hasta 20 minutos), con una presión que va desde 0.69 hasta 4.83 MPa. Todas estas condiciones favorecen la hidrólisis de la celulosa, pero también ésta puede ser alterada debido al alto grado de cristalinidad e inaccesibilidad a las microfibrillas (Fan y Ragauskas, 2012).

1.4.1.3.2. Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)

El pretratamiento AFEX es especialmente recomendado para biomasa que tiene un contenido de lignina menor al 15%. Este proceso mejora significativamente la sacarificación (hasta 90%) de diversos sustratos lignocelulósicos ya que el efecto físico del contacto del vapor con la biomasa a alta temperatura y el efecto químico de la degradación de la estructura lignocelulósica por parte del amoníaco mejora la disponibilidad de la celulosa (Reshamwala *et al.* 1995). La desventaja de este

pretratamiento es que no es costeable a nivel industrial como por los residuos generados.

1.4.1.4. Hidrólisis enzimática

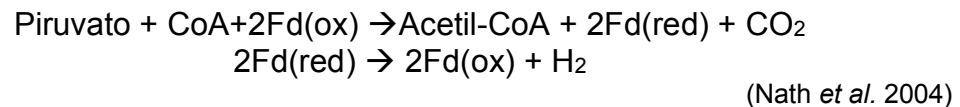
Este tipo de tratamiento es llevado a cabo por enzimas celulasa que son altamente específicas. El objetivo de la hidrólisis enzimática con celulasas es degradar la celulosa en glucosa (azúcar reductor) gracias a la acción de la actividad celulolítica. Es importante recordar que la actividad celulolítica es la consecuencia de cuatro actividades enzimáticas individuales. Estos azúcares, posteriormente son utilizados para llevar a cabo la fermentación oscura para la producción de biocombustibles, como el biohidrógeno (Sun *et al.* 2002). Las celulasas son una mezcla de enzimas con tres actividades: endoglucanasas, exoglucanasas (glucohidrolasas o celobiohidrolasas) y la β -glucosidasa (Coughlan y Ljungdahl, 1988). El grado de sacarificación del hidrolizado depende de diversos factores, tales como el tipo de biomasa a tratar, el grado de cristalinidad de la celulosa, la concentración, composición y afinidad de la enzima, entre otras (Yang *et al.* 2011).

1.5. Fermentación oscura por producción de biohidrógeno

La producción de biohidrógeno por medio de la fermentación oscura es un proceso prometedor debido a que se pueden usar diversos tipos de sustratos (residuos orgánicos, aguas residuales, entre otros). Además, no requiere de energía lumínica (de ahí su nombre de fermentación oscura) haciéndolo un proceso económicamente factible y sustentable (Nath y Das, 2004). Este proceso de fermentación es un fenómeno ubicuo en condiciones anóxicas o anaerobias (es decir, no hay oxígeno presente como aceptor de electrones). Dentro de este proceso, se utiliza como fuente de carbono a los monosacáridos presentes, principalmente glucosa, xilosa y fructuosa. Estos compuestos pueden ser sacarificados previamente por medio de diversos pretratamientos o tratamientos enzimáticos aplicados a la biomasa lignocelulósica, con el fin de que tengan una mayor disponibilidad para las bacterias que llevan a cabo la fermentación oscura. Cuando los monosacáridos son fermentados a ácido acético o butírico, se lleva a cabo la producción de

biohidrógeno el cual surge como subproducto de esta fermentación (López-Gutierrez, 2015).

En la Fig. 1.6 se presenta la ruta bioquímica para la conversión de la biomasa en biohidrógeno por medio de la fermentación oscura. Dentro de la vía de producción de biohidrógeno, la fermentación de la glucosa a biohidrógeno, piruvato, el producto del catabolismo de la glucosa, se oxida a acetil-CoA. Dentro de esta oxidación de piruvato a acetil-CoA, se lleva a cabo la reducción de ferredoxina (Fd). Fd reducido es consecutivamente oxidado por hidrogenasa llevándose a cabo la liberación de biohidrógeno en forma molecular (Hallenbeck y Benemann, 2002). Esta vía es conocida como Fd-hidrogenasa y es llevada a cabo por bacterias anaerobias estrictas.



Otra vía de producción de biohidrógeno es cuando la enzima hidrogenoliasa produce biohidrógeno y dióxido de carbono a partir de formiato. Este proceso es llevado a cabo por bacterias facultativas. Sin embargo, existen otras rutas metabólicas que compiten con las vías antes mencionadas, generando otros productos reducidos a partir de piruvato, tales como ácidos orgánicos volátiles (propionato), otros ácidos orgánicos (lactato) o productos como el etanol (Lee *et al.* 2009).

Uno de los factores que influyen en la producción de biohidrógeno es la presión parcial que llega a tener este proceso. Debido a que, cuando se tiene una presión parcial <60 Pa y el producto final es el acetato, se llegan a obtener teóricamente 4 molH₂/mol de glucosa. Mientras que, cuando la presión es >60Pa, se obtienen rendimientos teóricos de 2 mol H₂/mol glucosa y como producto final se obtiene el butirato (Tommasi *et al.* 2016).

Teóricamente, a partir de un mol de glucosa se pueden obtener hasta 12 moles de biohidrógeno (C₆H₁₂O₆ + 6H₂O → 12H₂ + 6CO₂). Sin embargo, en la naturaleza no existen vías metabólicas que logren esto debido a que el crecimiento de células no sería posible y la reacción no es termodinámicamente favorable

($\Delta G^\circ=3.2 \text{ kJ/mol}$) (Woodward *et al.* 2000). Como se describió anteriormente, a partir de las bacterias facultativas, se logran obtener de 2 a 4 moles de biohidrógeno a partir de cada mol de glucosa consumida, por medio de las vías de butirato y acetato.

La generación de biohidrógeno por medio de la fermentación oscura se debe principalmente a bacterias anaerobias o facultativas. Comúnmente, las especies de bacterias involucradas son del género *Clostridium*, las cuales tienden a formar esporas, bacterias termofílicas (Zhang *et al.* 2003; Cakir *et al.* 2010) y anaerobias acidogénicas así como bacterias facultativas de los géneros *Enterobacter* y *Bacillus* (Chen *et al.* 2005).

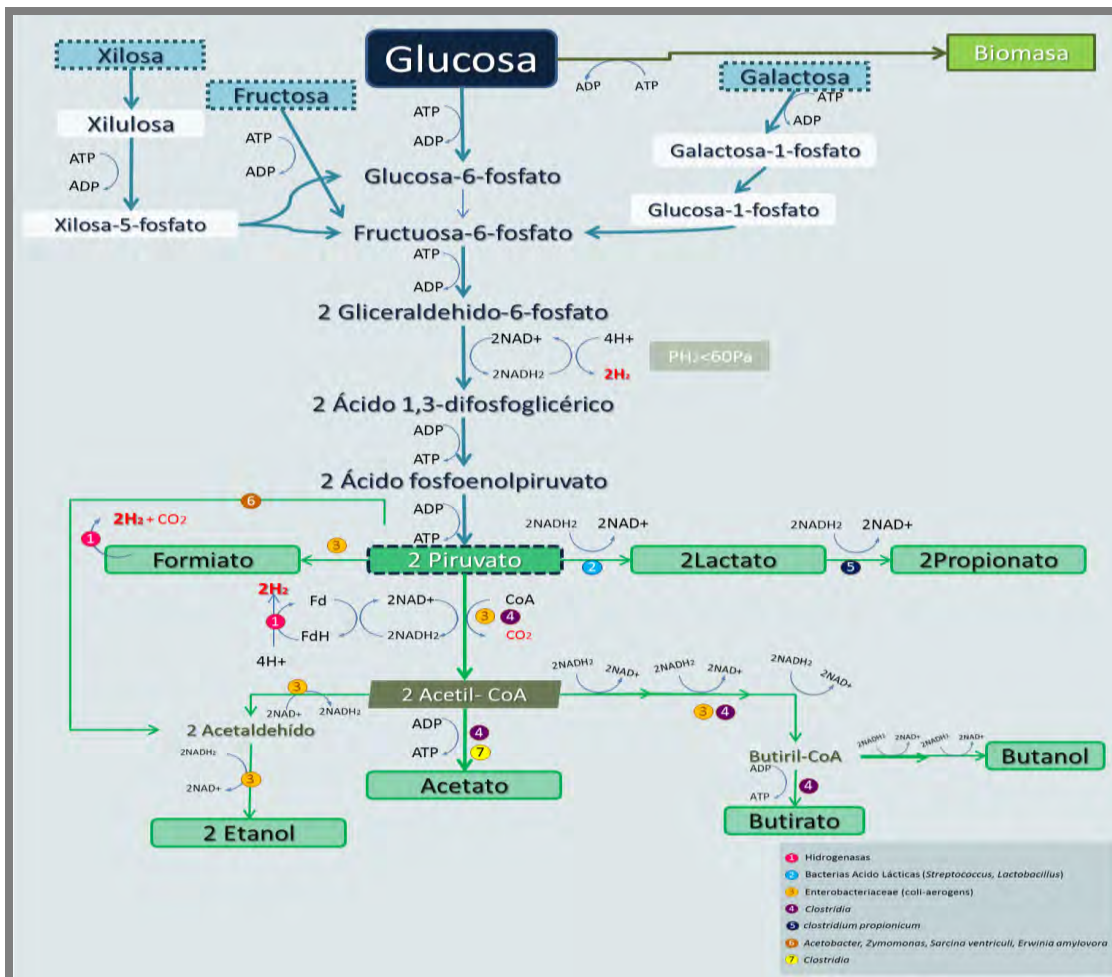


Fig. 1.6. Ruta bioquímica para la conversión de monosacáridos en biohidrógeno por medio de la fermentación oscura (López-Gutiérrez, 2015; Prescott *et al.* 2002; Xi-Chen *et al.* 2006).

1.6. Justificación

El uso irracional de los combustibles fósiles y el impacto negativo que tienen estos durante su combustión hacia el medio ambiente ha provocado una crisis energética y ambiental. Debido a esto, se han buscado diversas fuentes de energía que ayuden a mitigar estos problemas, y la producción de biocombustibles es una alternativa viable. El biohidrógeno es uno de estos combustibles ya que se puede producir por medio de la fermentación oscura a partir de residuos orgánicos. Entre ellos, los residuos agrícolas son un material factible que puede ser empleado para la producción de biohidrógeno debido a su composición química, su abundancia y bajo costo.

Debido a lo anterior, se están buscando diversas fuentes de residuos lignocelulósicos para revalorizarlos y generar biocombustibles. Tal es el caso de la industria tequilera en México, ya que durante la fabricación de tequila, se desechan las pencas, que constituyen aproximadamente el 50%. Durante los últimos 6 años, la cantidad promedio de plantas cultivadas fue de 48'733,192 (SAGARPA y CRT, 2005) y fueron desechadas alrededor de 1'096, 672 toneladas de pencas como residuos. Este tipo de biomasa es considerada desecho o utilizados de forma ineficiente como abono para las tierras. Por tal motivo, es necesario valorizar el aprovechamiento de este tipo de residuo y para ello, se propone utilizarlo como sustrato en la producción del biohidrógeno.

Sin embargo, una limitante del uso de biomasa lignocelulósica para la obtención de biohidrógeno, es la baja disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa debido a la compleja estructura morfológica de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber. Además, la presencia de lignina dificulta aún más la disponibilidad de dichos polímeros. Debido a esto, el presente trabajo explora la posibilidad de remover la lignina presente en la penca del agave empleando peróxido de hidrógeno en medio alcalino. También se documentaron los cambios en la estructura morfológica de la penca después del tratamiento con peróxido, empleando microscopía electrónica, difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja.

1.7. Hipótesis

La formación de radicales libres durante el pretratamiento de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber con peróxido de hidrógeno en medio alcalino facilitará la remoción de la lignina presente en la penca de agave. Esto incrementará la disponibilidad de celulosa y hemicelulosa al ataque de enzimas celulolíticas y por consecuencia, se favorecerán los rendimientos de producción de azúcares y de producción de biohidrógeno por fermentación oscura.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo general

Evaluar la producción de biohidrógeno vía fermentación oscura a partir de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber sometida a un pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino.

1.8.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar el manejo óptimo y conservación de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber para su uso en experimentos de laboratorio.
- 2) Evaluar la influencia del peróxido de hidrógeno alcalino sobre la estructura morfológica y la composición química de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber.
- 3) Evaluar el efecto del tiempo de hinchamiento y del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino sobre el rendimiento de deslignificación.
- 4) Implementar el proceso de sacarificación enzimática de las fracciones enriquecidas en celulosa y hemicelulosa obtenidas durante el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino.
- 5) Evaluar el rendimiento de la producción de biohidrógeno en lote a partir de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber pretratada con peróxido de hidrógeno alcalino.

Capítulo 2.- Materiales y métodos



2.1. Estrategia metodológica

La estrategia metodológica se divide principalmente en cinco pasos (Fig. 2.1). La primera es la separación de las diversas fracciones de la penca (cutícula, epidermis y fibra) con el objetivo de llevar a cabo su respectiva caracterización. Posteriormente, se evaluó el uso como sustrato de cada una de estas fracciones en la producción de biohidrógeno sin ningún tratamiento previo.

El segundo paso fue la determinación del mejor proceso de conservación y manejo de la penca para su uso en el laboratorio. Para esto, se evaluaron dos condiciones: secado a 60°C y liofilización. El tercer paso consistió en evaluar el pretratamiento con PHA estudiando cuatro condiciones: la concentración de PH, el pH, el efecto de hinchamiento con PH sin ajuste de pH y finalmente, el tiempo de pretratamiento con PHA. De este proceso, se obtuvieron tres fracciones que fueron caracterizadas de manera morfológica y química, tal como se describe en la Fig. 2.1.

Como cuarto paso se realizó la hidrólisis enzimática de las fracciones 1 y 2 obtenidas después del pretratamiento con PHA. Cada uno de los hidrolizados obtenidos se caracterizó de manera morfológica y química. Una vez obtenidas las fracciones hidrolizadas, se llevó a cabo el quinto paso que consistió en someter estas fracciones a fermentación oscura para la generación de biohidrógeno.

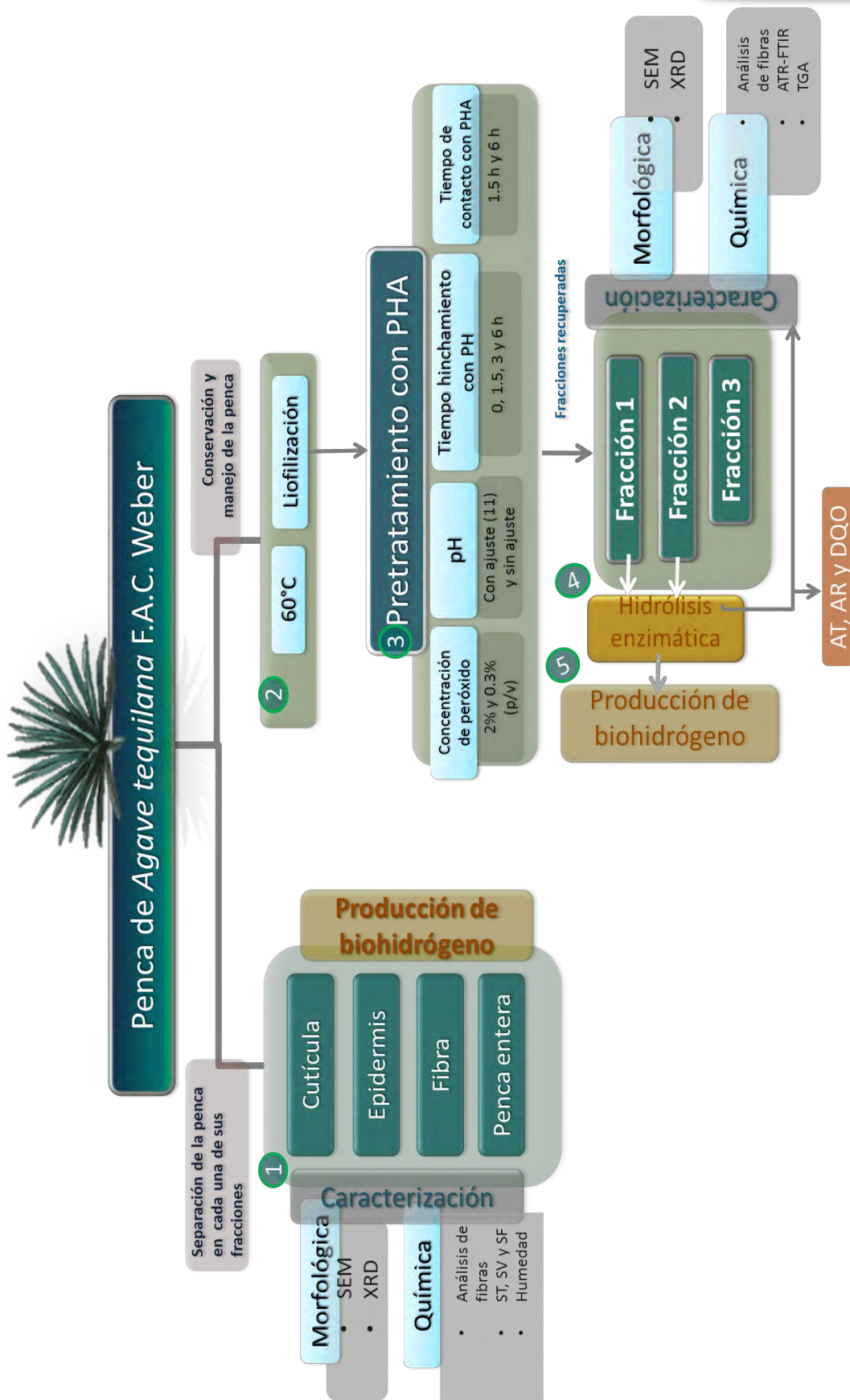


Fig. 2.1. Estrategia metodológica

2.2. Penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber

La penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber se colectó de los residuos generados en la tequilera Casa Herradura, ubicada en Amatitán, Jalisco. La penca se trituró y se sometió a dos métodos de secado: el primero fue secar la penca a 60°C en la estufa y el segundo método consistió en someterla a un proceso de liofilización.

2.3. Fraccionamiento de la penca

Para llevar a cabo la caracterización de la penca, ésta se separó en tres fracciones (la cutícula, la epidermis y la fibra) de manera manual y con la ayuda de un cúter (Fig. 2.2).

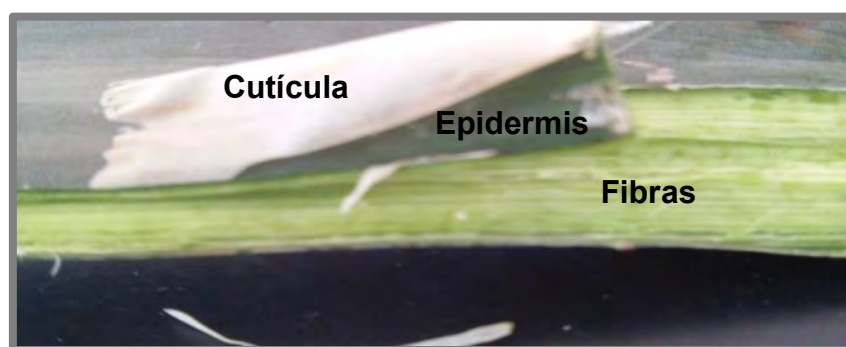


Fig. 2.2. Fracciones en la que fue separada la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber.

Cada fracción se caracterizó tanto química como morfológicamente, tal como se muestra en la Figura 2.3. Posteriormente, cada fracción se sometió a cinéticas de producción de biohidrógeno sin pretratamiento con el objetivo de evaluar el rendimiento de producción de biohidrógeno de las tres fracciones individuales.

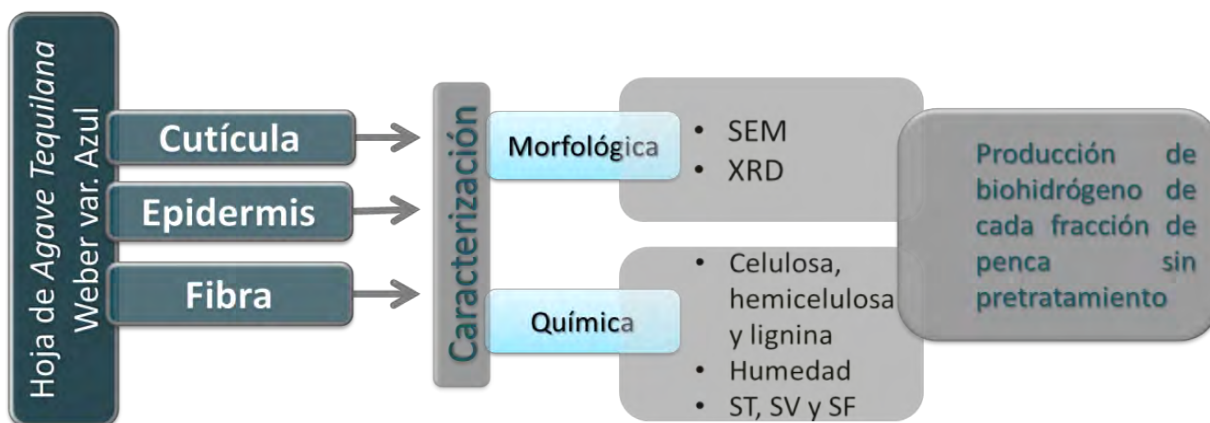


Fig. 2.3. Diagrama de la estrategia experimental para la caracterización de las fracciones de la penca y su producción de biohidrógeno.

2.4. Caracterización morfológica

2.4.1. SEM

Cada una de las fracciones de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber se caracterizaron morfológicamente empleando el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) ESEM FEI-QUANTA 200. Se llevaron a cabo análisis morfológico superficial, análisis por electrones retrodispersados y análisis químico por espectroscopia de dispersión de energía (EDS); todo esto a bajo vacío.

2.4.2. Microscopia óptica

La penca también se caracterizó morfológicamente empleando un microscopio estereoscópico óptico (DM 2000, Leica Microsystems, DE) con una fuente de luz externa (NI-150, Nikon Instruments, EE.UU.). Se obtuvieron imágenes a 10×, 20×, 30× y 40× de resolución con una cámara digital (EC3, Leica Microsystems, DE) adaptada al microscopio. Para ello, se hicieron cortes a diversas partes de la penca fresca y secada a 60°C, con y sin pretratamiento con PHA. Los cortes se realizaron con un micrótopo rotatorio (RM2125RT, Leica Microsystems, DE) y con ellos se efectuaron preparaciones temporales montadas sobre glicerina en portaobjetos estándar.

2.5. Caracterización físico-química de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber

Para efectuar los análisis químicos la penca se sometió a tratamientos mecánicos. Para la liofilización, se molió en una trituradora y picadora de forraje o molino de granos. Para el análisis de fibras, la penca fue triturada en un molino Thomas Wiley® Mini-Mill. Para la determinación y análisis en XRD, ATR-FTIR, TGA la muestra fue pulverizada en un molino. Para el análisis en SEM, la penca se fraccionó con un cúter.

2.5.1. Análisis de fibras

Para la determinación de celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos solubles, se aplicó el método propuesto por Van Soest (Fig. 2.4) reportado por Keys *et al.* (1969)

empleando el analizador de fibras semi-automático (ANKOM Technology, MAcedon, NY, USA), en el cuál se utilizan bolsas de poliéster.

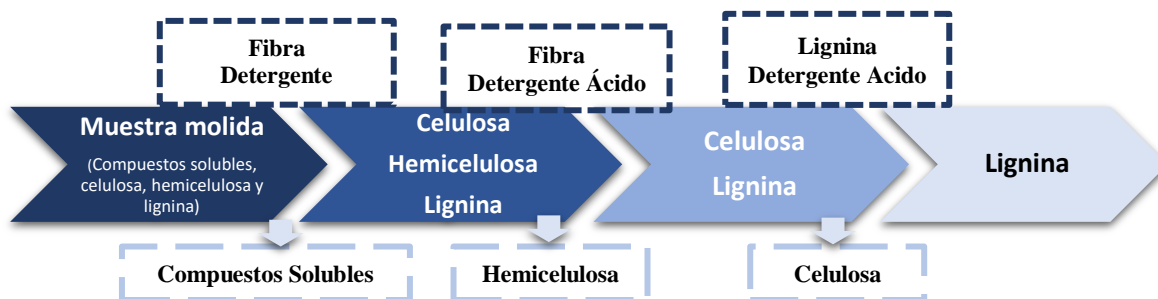


Fig. 2.4. Diagrama del método de Van Soest para el análisis de fibras.

2.5.2. Determinación de humedad

Para llevar a cabo la determinación de humedad y sólidos totales la peca se dividió en tres partes: superior, media e inferior. Además, también se le determinó humedad y sólidos totales a la cutícula, epidermis, fibra y la peca completa. Se tomaron 5 g de cada muestra y se empleó una termobalanza Ohaus MB45-2A0.

2.5.3. Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y sólidos fijos

La determinación de sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos (SF) se realizó para la cutícula, epidermis, fibra y peca entera. Los sólidos se determinaron por Standard Methods (APHA, 1998).

2.5.4. XRD

Para determinar el índice de cristalinidad (IC) de la celulosa, las muestras se analizaron en el Difractómetro de Rayos-X (XRD, por sus siglas en inglés) Bruker D8 Advance con radiación monocromática Cu K α ($\lambda=1.5818$ Å), con un voltaje de 35 keV y una corriente de 25 mA. Las muestras fueron analizadas en un intervalo de 5-70° en 2 θ . El IC se calculó a partir del método de deconvolución (Ibbett, *et al.* 2008) que propone la ecuación 1 para su cálculo. Los datos fueron procesados en el programa MagicPlot Student 2.5.1.0.

$$IC = \frac{Cr}{Cr+Ca} \times 100 \quad (1)$$

Donde, Cr corresponde a la suma de las áreas de los picos de la celulosa cristalina que se encuentran a 15°, 16.5°, 22.8° y 34.6°; Ca corresponde al pico de celulosa

amorfa o no cristalina. Como estándar, se utilizó celulosa microcristalina (AVICEL PH101), la cual sirvió para la identificación de los picos de la celulosa cristalina.

2.5.5. ATR-FTIR

Para este análisis, se utilizó el ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared) Thermo-Nicolet, Nexus 470 FT-IR E.S.P. Esta técnica se usó para la identificación de grupos funcionales en cada una de las muestras obtenidas, antes y después del pretratamiento e hidrólisis enzimática aplicada en la penca. Cada uno de los espectros se obtuvo en un intervalo de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ con 4 cm^{-1} de resolución y 120 escaneos. Las muestras analizadas fueron previamente secadas a 60°C por 24 h.

2.5.6. TGA

El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) de las muestras sin y con pretratamiento con PHA se llevó a cabo en el analizador TGA Thermo Cahn - Versa Therm High Sensivity. Se utilizaron 25 mg de cada muestra y fueron analizadas a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Los termogramas se hicieron en un intervalo de temperatura entre $25\text{-}800^\circ\text{C}$ con una atmósfera de nitrógeno a un flujo de $20\text{ mL}/\text{min}$. Todas las muestras fueron previamente secadas a 60°C por 24 h. Cada análisis fue procesado en el programa SigmaPlot 11.0.

2.6. Pretratamiento de la penca con PHA

2.6.1. Metodología del pretratamiento con PHA

La penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber fue molida, homogenizada y finalmente liofilizada para, posteriormente someterla al pretratamiento con PHA propuesto por Su *et al.* (2015). La metodología PHA (Fig. 2.5) se divide en tres procesos: el primero consiste en la recuperación de sólidos sometidos al pretratamiento con PHA (Fracción 1), los cuales están enriquecidos principalmente por celulosa y hemicelulosa. El segundo procedimiento consiste en la recuperación de la fracción de hemicelulosa (Fracción 2) y el tercer procedimiento tiene como objetivo el recuperar la lignina soluble (Fracción 3).

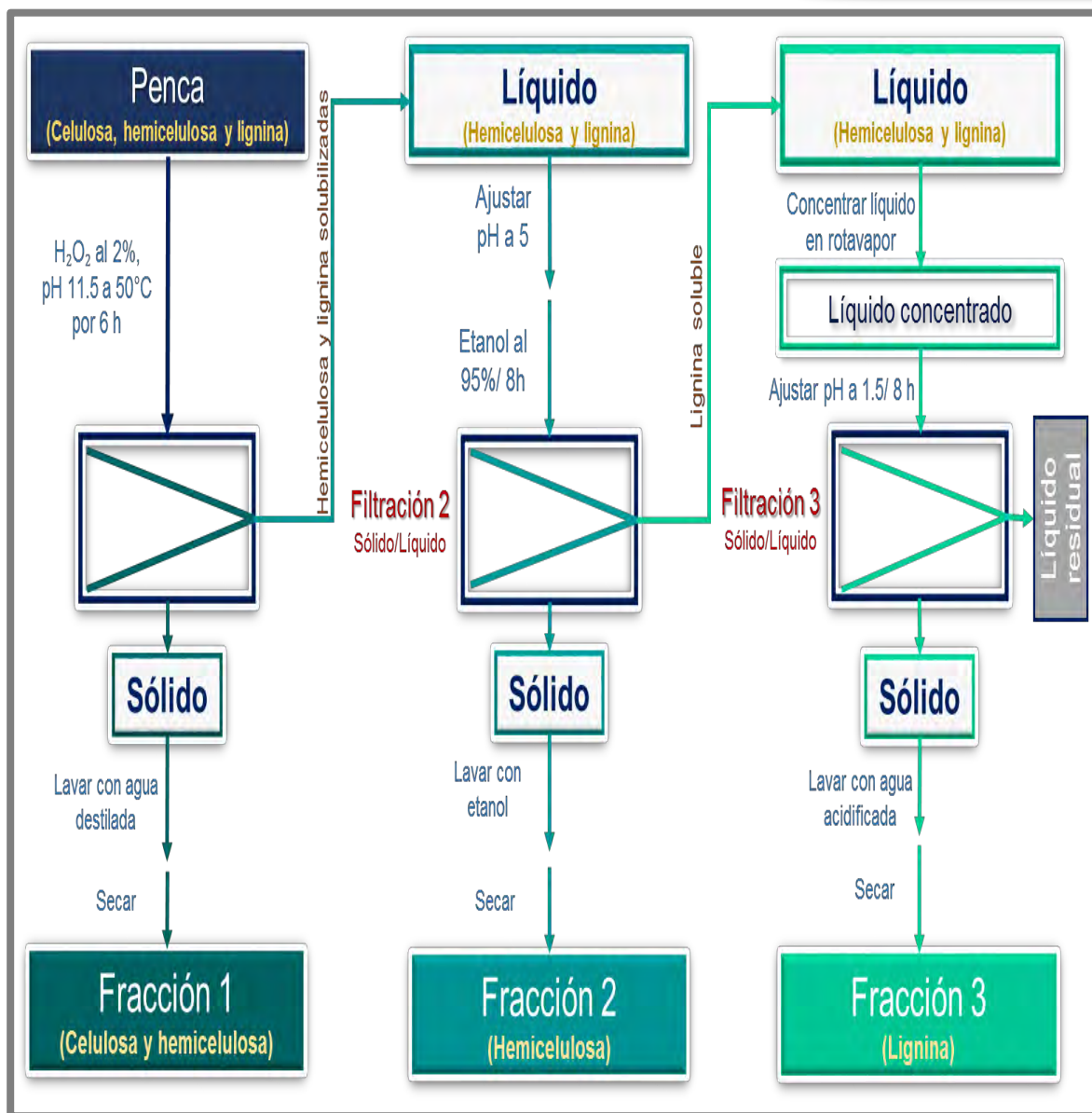


Fig. 2.5. Diagrama de flujo del pretratamiento de la peca con PHA y su fraccionamiento (Su *et al.* 2015).

Recuperación de la Fracción 1:

La peca liofilizada se colocó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con una solución de PHA al 2% en una proporción de 1:20 (p/v). La solución de PHA al 2% se preparó mediante la dilución de 33 mL de H_2O_2 al 30% (p/p) en 500 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 11.5 con NaOH al 5M. La suspensión sólido/ líquido se colocó en baño maría con una agitación de 120 rpm y 50°C por 6 h. Posteriormente, la mezcla se filtró para separar la biomasa de una solución con coloración amarilla. Los

residuos sólidos (fracción 1) se lavaron con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secaron a 60°C por 24 h. Este experimento se realizó a diferentes concentraciones de H₂O₂ y a diferentes valores de pH, tal y como se muestra en la Tabla 2.1. Cabe mencionar que cada experimento se realizó por triplicado.

Recuperación de la Fracción 2 y 3:

El líquido amarillo obtenido de la filtración del procedimiento anterior, se recuperó y ajustó a pH de 5 con HCl 6M. Posteriormente, se le añadieron tres volúmenes de etanol al 95% y se incubaron estáticamente durante 8 h para precipitar el sólido enriquecido en hemicelulosa (Fracción 2). Este semisólido, se lavó con etanol al 70% y posteriormente se secó a 60°C. El líquido residual se concentró hasta cuatro veces en rotavapor. A esta solución concentrada, se le ajustó el pH a 1.5 con HCl 6M con el objetivo de precipitar la lignina (Fracción 3) ya que no es soluble a valores de pH ácido. La lignina insoluble se separó del líquido por filtración. Después se lavó tres veces con agua acidificada (pH 2). La Fracción 3 se liofilizó y posteriormente se pesó. Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. El etanol se recuperó en el rotavapor con el fin de ser reutilizado.

2.6.2. Condiciones a evaluar en el pretratamiento con PHA

Dentro de esta fase experimental se evaluaron 4 condiciones: la concentración de PH, el pH, tiempo de contacto con el PHA y el tiempo de contacto con PH sin ajuste de pH. En cuanto a la concentración de peróxido de hidrógeno se decidió trabajar bajo dos diferentes concentraciones (Tabla 2.1): 2% (Su *et al.* 2015) y al 0.3% (Abreu, 2013). El pH se evaluó a un valor de 11.5 debido a que se ha reportado que a tales condiciones se encuentra la mayor concentración de radicales \bullet OH (Gould, 1985). Para esto se trabajó a otra condición donde no se ajustó el pH.

Una vez obtenidos los resultados de esta evaluación, se eligió la muestra en la que se obtuvieron los mejores rendimientos de deslignificación y se evaluaron dos tiempos de contacto entre el PHA y la penca. Su *et al.* (2015) evaluaron diversos tiempos de contacto con PHA, dentro de los cuales se encontró que 1.5 y 6 h tuvieron los mejores rendimientos de deslignificación. Otra de las condiciones a

evaluar fue el tiempo de contacto de la penca con el peróxido de hidrógeno sin ajuste de pH. Este tiempo de contacto se evaluó porque se sabe que los tejidos vegetales se hinchan al estar en contacto con el peróxido de hidrógeno, lo cual podría favorecer una mejor deslignificación.

Tabla 2.1. Concentraciones del peróxido de hidrógeno y valores de los pH evaluados en el pretratamiento de deslignificación con PHA.

ID	Experimento	Relación biomasa: H ₂ O ₂	Concentración de H ₂ O ₂	pH
1	Peróxido de hidrógeno alcalino 2%	1:20 p/v	2%	11.5
2	Peróxido de hidrógeno 2%	1:20 p/v	2%	Sin ajuste
3	Peróxido de hidrógeno alcalino 0.3%	1:20 p/v	0.3%	11.5
4	Peróxido de hidrógeno 0.3%	1:20 p/v	0.3%	Sin ajuste

2.6.3. Caracterización de los sólidos recuperados del pretratamiento con PHA

Una vez recuperada cada fracción obtenida del pretratamiento con PHA, se caracterizó tanto morfológica como químicamente. En la Figura 2.6 se indican los parámetros incluidos en dicha caracterización.

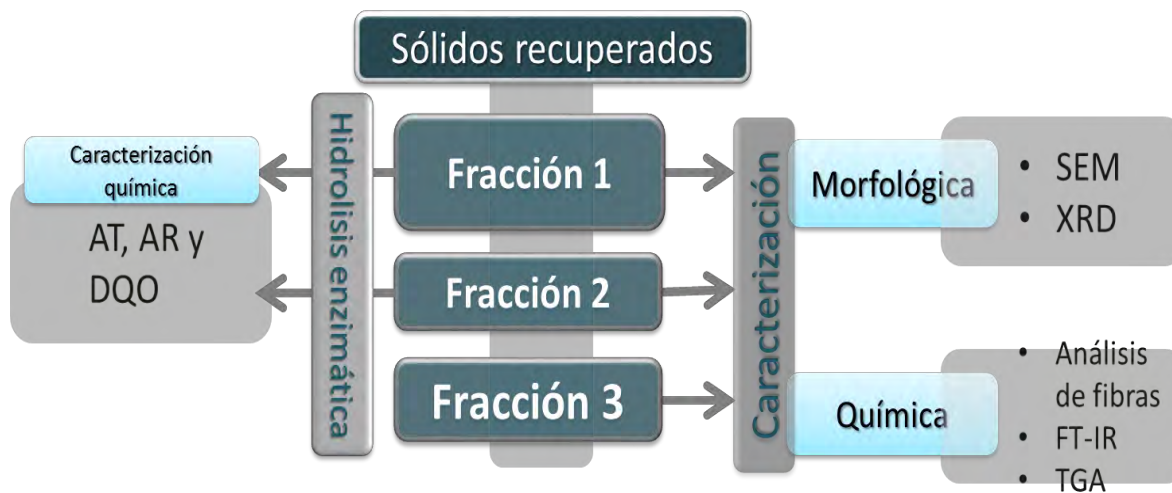


Fig. 2.6. Caracterización química y morfológica de los sólidos recuperados después del pretratamiento con PHA y de los hidrolizados.

2.7. Tratamiento enzimático

2.7.1. Condiciones de la hidrólisis enzimática

Las fracciones 1 y 2 se sometieron a hidrólisis enzimática bajo las condiciones reportadas por López-Gutiérrez (2015). Estas condiciones fueron: 3.5% de penca suspendida en buffer de citratos 50 mM con pH 5.5 y con 0.7 mg proteína/mL de Celluclast 1.5L. Todas las hidrólisis se incubaron a 40°C y 130 rpm durante 12 h.

2.7.1.1 Caracterización de la mezcla de enzima Celluclast 1.5L

La cuantificación de proteínas en el Celluclast 1.5L fue por el método de Bradford (Bradford, 1976). La concentración de proteína en esta enzima fue de 43.20 mg/mL, valor semejante al reportado por López-Gutiérrez (2015) de 39.23 mg/mL.

2.7.2. Determinación de azúcares totales, azúcares reductores y la demanda química de oxígeno

Para la determinación de azúcares totales (AT) se utilizó el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Los azúcares reductores (AR) se determinaron a partir del método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Finalmente, la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se basó en lo propuesto en el Standard Methods (APHA, 1998). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Aquamate UV/VIS.

2.8. Cinéticas de producción de biohidrógeno

2.8.1. Inóculo

El inóculo se obtuvo de un digestor anaerobio que trata vinazas producidas en la tequilera Casa Herradura localizado en Amatitán, Jalisco. Este lodo granular fue tratado térmicamente primero a 2 h a 90 °C y posteriormente se dejó a 104°C por 24 h con el fin de inactivar células vegetativas, enriquecerlo en bacterias formadoras de esporas productoras de biohidrógeno y disminuir la actividad metanogénica. Una vez terminado el tratamiento térmico el lodo fue molido en un mortero.

2.8.2. Producción de biohidrógeno en lote

Para la producción en lote de biohidrógeno se emplearon botellas serológicas de 60 mL con un volumen de trabajo de 30 ml, donde se añadió 4.5 g SSV/L de sustrato (biomasa con o sin pretratamiento), 3 g SSV/L de inóculo y 3 mL de medio mineral cuya composición fue (g/L): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 4.5; Na_2HPO_4 , 11.9; K_2HPO_4 , 0.125; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.015; $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.025; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 y ZnCl_2 , 0.075 (Arreola-Vargas *et al.* 2015). Una vez añadido todo lo anterior, se completó a 30 mL con agua desionizada. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.5 y se intercambié la atmósfera del espacio vacío de las botellas serológicas con N_2/CO_2 (80/20%) por ~ 45 s y se colocó en un agitador horizontal a 37°C y 150 rpm. Una vez transcurrida la fase lag (~ 8 h), se efectuaron mediciones periódicas (cada 2-3 h) del volumen de gas producido.

El biogás producido en cada cinética se midió por medio de una bureta invertida de 250 ml con agua acidificada (pH 2). El volumen de biogás se cuantificó como el volumen de agua desplazado en la bureta. Se colectó 1 mL de biogás para ser analizado en el cromatógrafo de gases (AGILENT Technologies 6890N) con Detector de Conductividad Térmica (TCD) para determinar la concentración de H_2 , CH_4 y CO_2 presentes en cada muestra. Para calcular la máxima producción de biohidrógeno acumulada, se utilizó la ecuación (2) de Gompertz modificada (Cui *et al.* 2010) y Start Matlab 2010.

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

Ecuación de Gompertz modificada

Donde, **H** es el volumen total de biogás producido (mL) durante toda la fase experimental, **H_{\max}** es la máxima producción de biohidrógeno acumulada (mL), **R_{\max}** es la velocidad máxima de producción de este biogás (ml/h), **$e= 2.72$** , **λ** es el tiempo de fase lag (horas) y **t** es el tiempo de incubación (Cui *et al.* 2010).

Capítulo 3.- Resultados y discusión

3.1. Caracterización morfológica y química de los estándares de Avicel de celulosa microcristalina y lignina

Con el fin de poder interpretar los datos obtenidos de la caracterización química (FT-IR y TGA) y morfológica (SEM, XRD) de las fibras obtenidas en los experimentos realizados en este trabajo, se emplearon un estándar de celulosa microcristalina (Avicel) y uno de lignina. El estándar de hemicelulosa no fue posible conseguirlo.

3.1.1. Avicel de celulosa microcristalina

La estructura morfológica de la celulosa microcristalina se puede observar en las micrografías de la Fig. 3.1-a y Fig. 3.1-b, obtenidas por SEM. El estándar de celulosa microcristalina está constituida por pequeños aglomerados conformados por la celulosa y que dan lugar a pequeñas estructuras irregulares. Este tipo de micrografías son semejantes a las reportadas por López-Gutiérrez (2015) y Kim, *et al.* (2008). Sin embargo, por la amplificación, no fue posible observar las estructuras cristalinas de la celulosa a detalle debido a que el tamaño de los cristales de celulosa fue de alrededor de 5nm (Park *et al.* 2010).

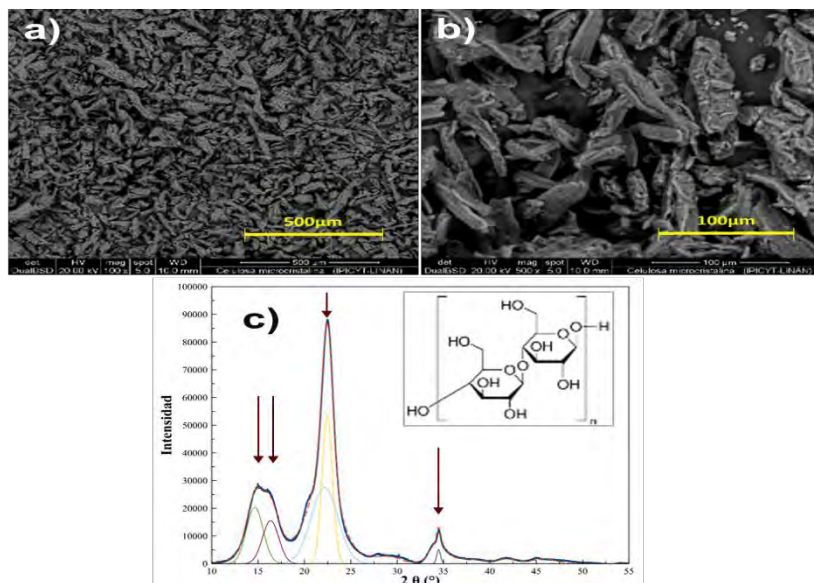


Fig. 3.1. Caracterización morfológica del avicel de celulosa microcristalina. a) Micrografía del avicel de celulosa microcristalina a 100×. b) Micrografía del avicel de celulosa microcristalina a 500×. c) Difractograma de DRX.

El IC de este estándar, fue de 65.3%, valor que se encuentra dentro del rango reportado por Terinte *et al.* (2011), Park *et al.* (2010) y López-Gutiérrez (2015). En el difractograma (Fig. 3.1-c) las flechas indican la posición de los picos de la celulosa microcristalina.

La caracterización química se realizó por medio del análisis termogravimétrico. Como se observa en la Fig. 3.2, se gasificaron dos compuestos en dos intervalos de temperatura diferentes. La primera gasificación se llevó a cabo entre 60 y 86°C, con una pérdida de peso de 2.14%. A estos rangos de temperatura, el primer compuesto gasificado es el agua presente en el estándar (Chowdhury *et al.* 2013). En un rango de 210°C a 240°C hubo una pérdida de peso del 94.50%. De acuerdo con la literatura, a este rango de temperatura se lleva a cabo la gasificación de la celulosa (Kabir *et al.* 2013). Además, hubo una pérdida de peso del 3.21% que puede corresponder a otros compuestos que se gasificaron durante toda la rampa de temperatura a la que se sometió la muestra, al no haber una concentración importante de tales compuestos, no hubo una señal representativa como fue en el caso de la celulosa y la humedad. Al final del análisis se obtuvieron las cenizas que correspondieron a un 0.15% de la muestra.

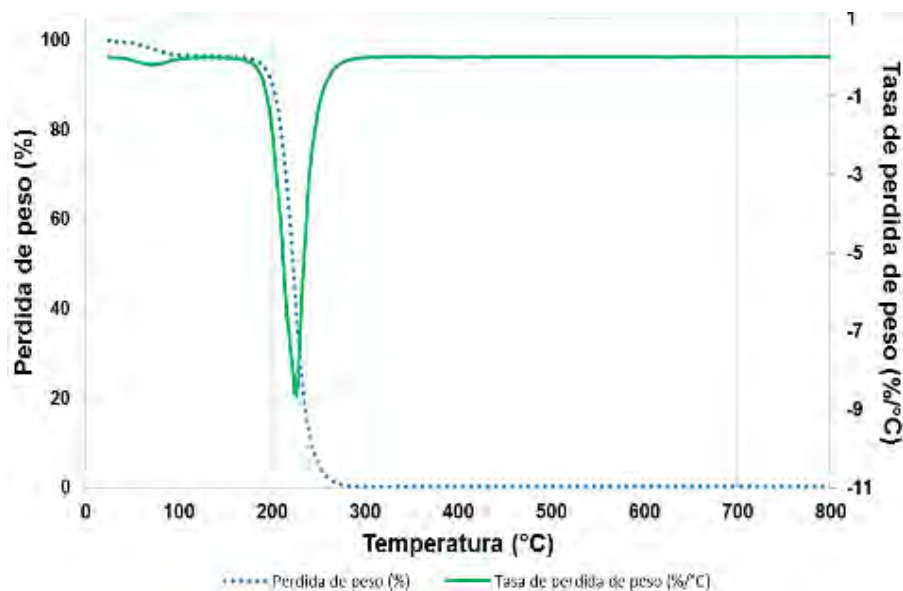


Fig. 3.2. Termograma del Avicel de celulosa microcristalina. Los termogramas se realizaron con una rampa de temperatura de 10°C/min de 25 a 800 °C, en una atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min.

3.1.2. Estándar de lignina

De acuerdo con las características de este compuesto de SIGMA-ALDRICH, el estándar de lignina contiene un bajo porcentaje de concentración de sulfonatos (4% de azufre). Este tipo de lignina es de tipo kraft, la cual fue obtenida a partir de madera dura. En las micrografías (Fig.3.3-a y Fig. 3.3-b) se muestra la morfología de la lignina, la cual es similar a la reportada por Ferry *et al.* (2015). El IC de esta muestra no se pudo cuantificar debido a que en el difractograma (Fig. 3.3-c) solo se observa una curva que representa la parte amorfa de la muestra y hay ausencia de señales de celulosa cristalina debido a que éste es un estándar de lignina.

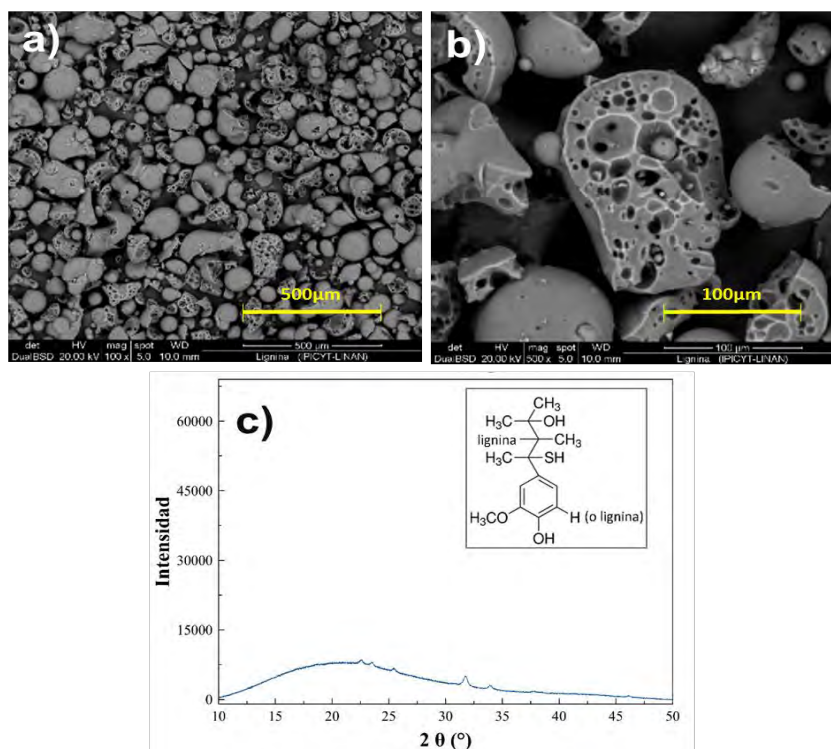


Fig. 3.3. Caracterización morfológica del estándar de lignina. a) Micrografía del estándar de lignina a 100×. a) Micrografía del estándar de lignina a 500×. c) Difractograma de DRX.

Entre la lignina y la celulosa, la lignina es uno de los compuestos más difíciles de descomponer debido a su estructura química compleja (Yang *et al.* 2007). De acuerdo con el análisis termogravimétrico (Fig. 3.4) entre 64-170°C hubo una pérdida de peso de 9.15% lo que sugiere que es la gasificación de la humedad. Sin embargo, también entre 105 y 300°C se lleva a cabo la descomposición térmica de los enlaces α y β -aril-alquil-éter; los cuales son característicos de la lignina (Shankar

et al. 2015). Además, otra gasificación de la lignina se lleva a cabo a 520°C con una pérdida de peso del 7.54% y esto se debe a que se requiere de altas temperaturas para la degradación de una fracción de la lignina con alta estabilidad térmica (Su *et al.* 2015). Asimismo, hubo una pérdida del 5.02% de masa a lo largo de toda la rampa de temperatura a la que se sometió la muestra y un 36.67% de cenizas; cuya composición se muestra en la Tabla 3.1.

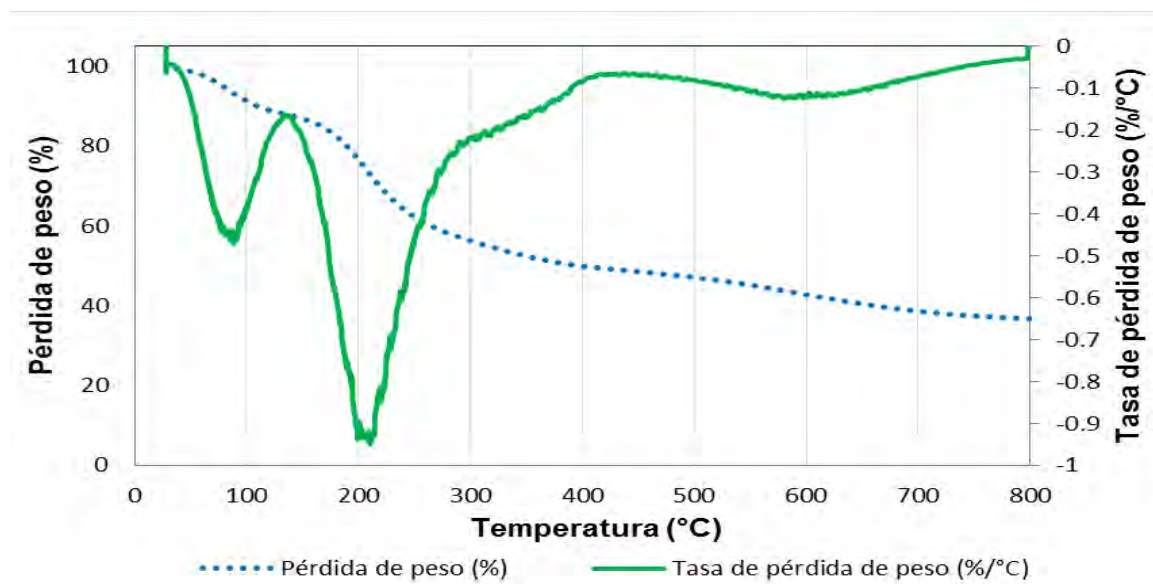


Fig. 3.4. Termograma del estándar de lignina. Los termogramas se realizaron con una rampa de temperatura de 10°C/min de 25 a 800 °C, en una atmósfera de nitrógeno a un flujo de 20 ml/min.

Tabla 3.1. Composición química de las cenizas del estándar de lignina.

Analito	Concentración (mg/g ceniza)	Analito	Concentración (mg/g ceniza)
Aluminio	0.023 (±0.004)	Magnesio	0.020 (±0.006)
Calcio	0.074 (±0.019)	Manganeso	0.006 (±0.002)
Fósforo	0.008 (±0.0004)	Potasio	1.097 (±0.110)
Hierro	0.019 (±0.0003)	Sodio	2.049 (±0.164)
Litio	0.009 (±0.002)	Zinc	0.003 (±0.0005)

3.2. Caracterización de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber

3.2.1. Morfología de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber

3.2.1.1. Microscopía óptica

La penca se puede dividir anatómicamente en tres fracciones principales: cutícula, epidermis y fibra (Fig. 3.5-a). Wattendorff y Holloway (1980) caracterizaron químicamente la cutícula, la cual describen como un complejo de hidrocarburos poliméricos cuya función principal es aislar e impermeabilizar el área foliar. Además, se tienen registros de que la cutícula mide de 3 a 15 μm de espesor (Nobel, 1988). En tanto que la epidermis, en el *Agave tequilana* F.A.C. Weber, tiene la particularidad de presentar un complejo estomático de área muy pequeña comparada con la de otros agaves; así como una densidad estomática relativamente alta (Hernández-Valencia *et al.* 2003).

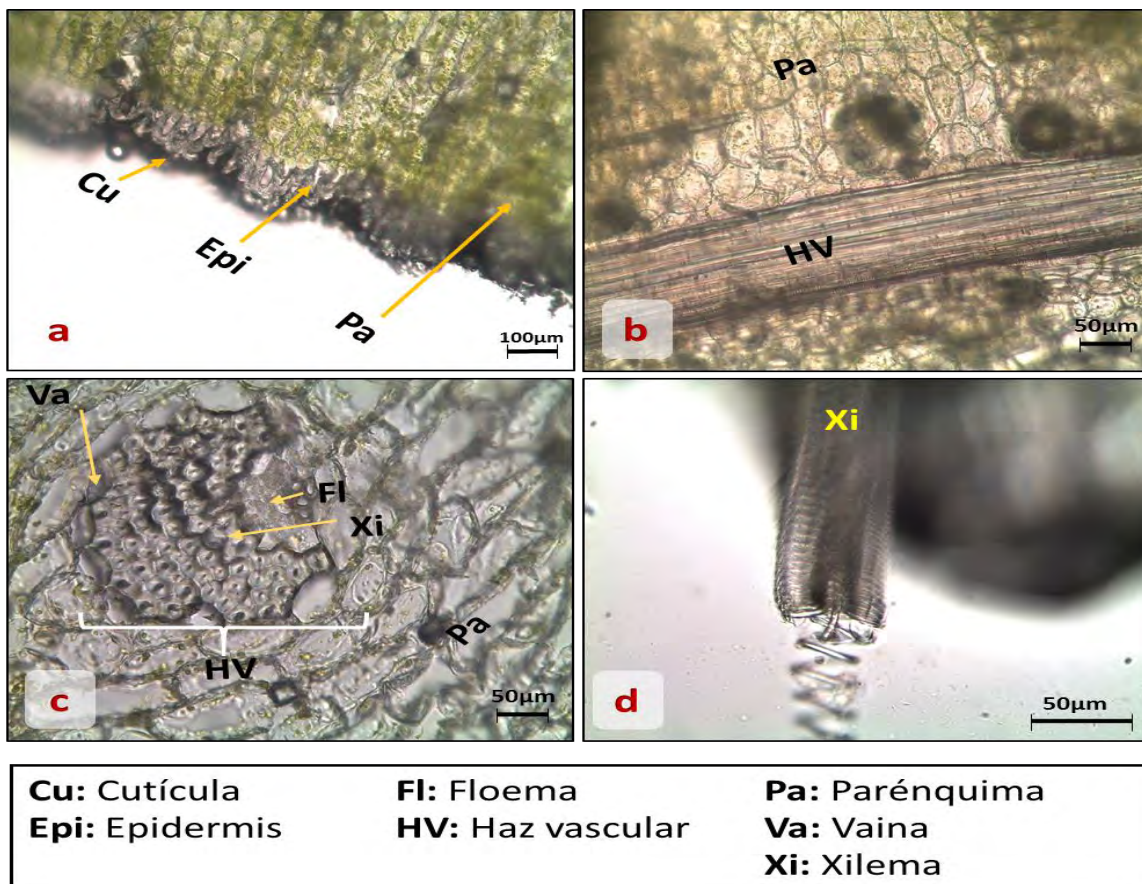


Fig. 3.5. Fracciones de penca observadas con microscopio óptico. a) Corte transversal de la penca. b) Corte longitudinal de la penca. c) Haz vascular de una fracción de la penca con corte transversal. d) Xilema.

En la fracción de la fibra (Fig. 3.5-b) se encuentran los haces vasculares que están constituidos por el xilema (Fig. 3.5-c y 3.5-d) que se encarga de conducir el agua, y el floema (Fig. 3.1-c), en el que se transportan principalmente compuestos orgánicos en solución (Esaú, 1985). En la Fig. 3.5-b, se observa la fibra de la penca en corte longitudinal y en la Fig. 3.5-c se observa un corte transversal de esta fracción.

3.2.1.2. SEM

La distribución de la celulosa, hemicelulosa y lignina, depende del tipo de pared celular que constituya a cada tejido. Por ejemplo, en la micrografía Fig. 3.6-a, se observa el complejo estomático presente en la cutícula que se describió a detalle anteriormente. La cutícula está conformada principalmente por dos polímeros lipofílicos: cutina y ceras cuticulares, cuya concentración varía de acuerdo a diversos factores destacando los genéticos, fisiológicos y ambientales (Tafolla-Arellano *et al.* 2013). Otro de los compuestos químicos presentes, pero en menor cantidad, es la lignina. Este compuesto se encuentra en la pared secundaria celular y junto con la cutina y las ceras cuticulares proporcionan protección a la planta.

En la micrografía de la Fig. 3.6-b se observan dos fracciones de la penca: la epidermis y una parte de la fibra. La epidermis está constituida principalmente por células de pared primaria, es decir, esta parte de la penca está compuesta esencialmente por celulosa y hemicelulosa (Esaú, 1985). En las micrografías de la Fig. 3.6-b y c se observa la fracción de la fibra que está constituida por tejido de parénquima, oxalatos de calcio (con formas de rafidios y estiloides) y haces vasculares. El parénquima es un tejido constituido por células de pared primaria, la cual está constituida principalmente por hemicelulosa y pectinas, y en menor concentración por celulosa (Esaú, 1985). El parénquima también se encuentra en los haces vasculares, tanto en la periferia del haz, así como en la parte interna de la estructura del haz vascular.

El haz vascular (Fig. 3.6-d) está conformado por xilema y floema. El xilema está constituido por una estructura helicoidal lignificada cubierta por un tejido constituido por células de pared primaria, enriquecidas fundamentalmente en

celulosa. Mientras que el floema, es un tejido con células de pared primaria que nunca se lignifican (Esaú, 1985). Se encuentran además vainas que son estructuras lignificadas que rodean al xilema y floema.

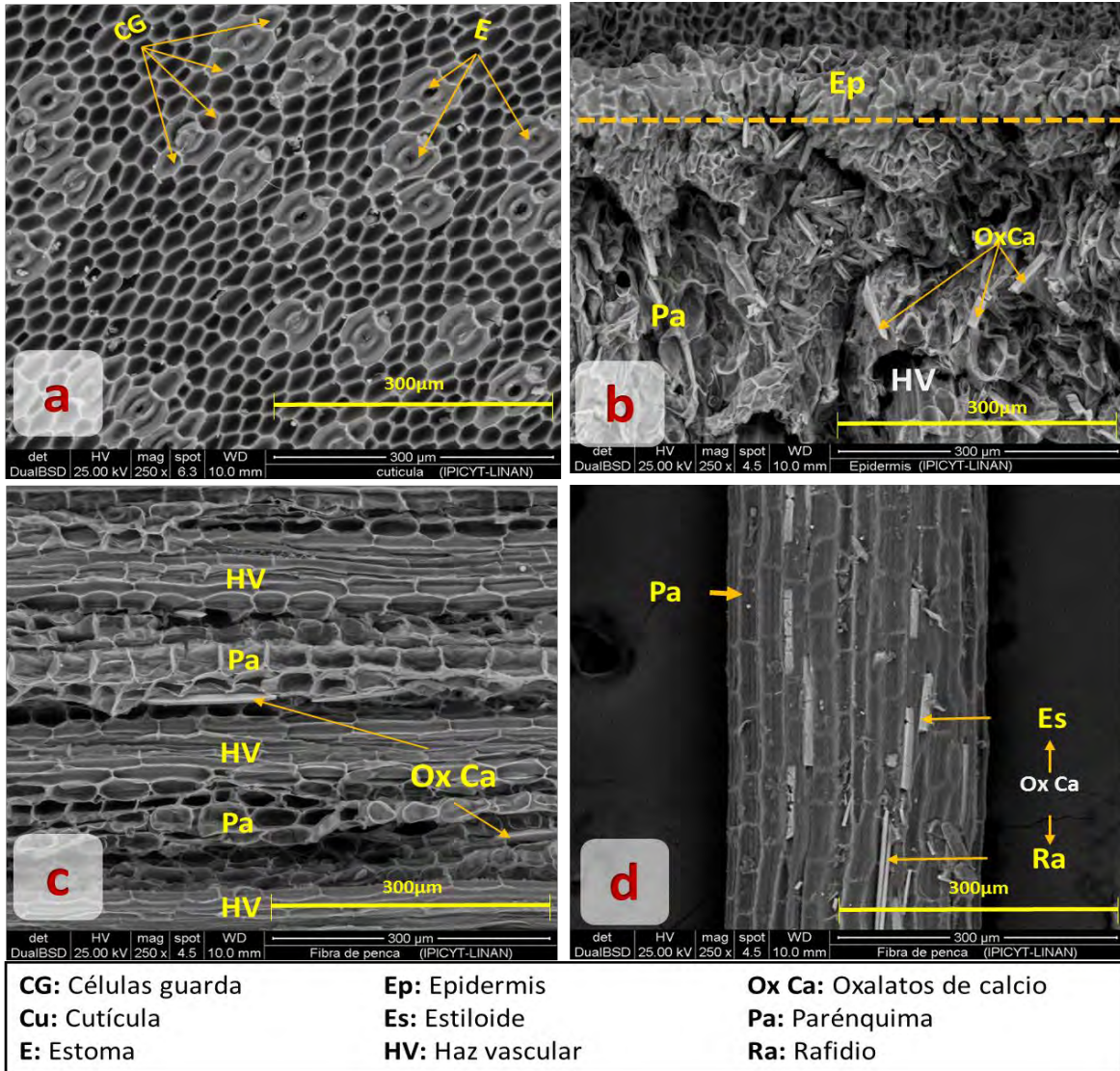


Fig. 3.6. Micrografías de las fracciones de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber.

a) Complejo estomático en la superficie de la cutícula. b) Estructura morfológica de la epidermis y fibra. c) Corte longitudinal de la fibra de la penca. d) Haz vascular.

En cada uno de los tejidos que constituyen a la penca, se encuentran diversas estructuras cristalinas, entre las que se encuentran los silicatos (Fig. 3.7-c). Otros cristales presentes en la penca, son los oxalatos de calcio, en este caso de tipo monohidratado, mejor conocidos como whewellitas (Pérez-Pimienta *et al.* 2015).

Los oxalatos de calcio en las plantas juegan un papel importante debido a que son los encargados de la regulación en los niveles de calcio, la protección contra la herbivoría y la destoxificación de metales pesados; además de que ayudan en darle rigidez a las hojas de la planta permitiendo a su vez tener cierta flexibilidad debido a su tamaño pequeño (Jáuregui-Zúñiga y Moreno, 2004). Existen diversas formas de cristales a lo largo y ancho de la planta y éstos varían en cada especie vegetal, pero existen cuatro clasificaciones principales: rafidios, drusas, estiloides y prismas.

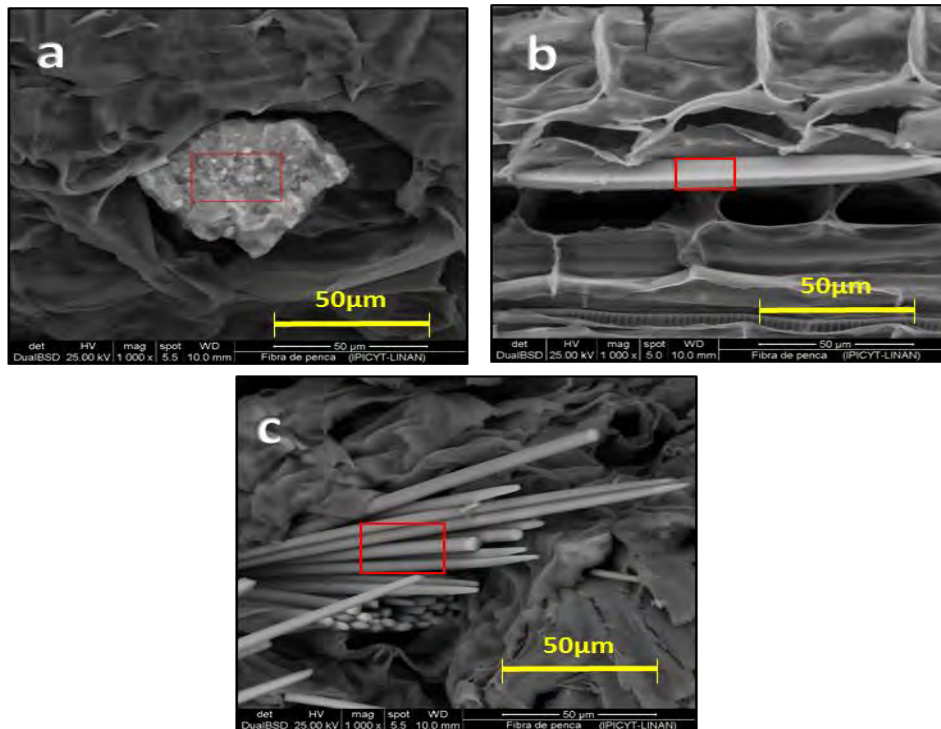


Fig. 3.7. a) Oxalatos de calcio monohidratados en forma de rafidios. b) Oxalato de calcio monohidratado en forma de estiloide. c) Silicato.

En el caso de la penca se presenta dos tipos de estructuras de oxalatos de calcio: rafidios (Fig. 3.7-a) y estiloides (Fig. 3.7-b). En el Anexo A se muestran los EDS de cada cristal, el cual ayuda a verificar que efectivamente están constituidos por calcio (micrografías a y b) y por sílice (micrografía c). Los oxalatos de calcio observados en estas micrografías son característicos de esta especie vegetal y han sido observados en fibras semejantes a las de la penca y en bagazo de *Agave tequilana* F.A.C. Weber (Pérez-Pimienta *et al.* 2015; López-Gutiérrez, 2015). Estos datos se corroboraron con la carta cristalográfica 00-020-0231 de la base de datos del “International Centre for Diffraction Data”.

3.2.1.3. Índice de cristalinidad de la celulosa

Se determinó el Índice de Cristalinidad (IC) de la celulosa presente en la cutícula, epidermis, fibra, penca entera y penca liofilizada (Tabla 3.2). La cutícula es la fracción de la penca que muestra un menor IC, seguido por la epidermis y finalmente la fibra. El IC se relaciona con el porcentaje de concentración de celulosa que se encuentra presente en cada fracción ya que este índice incrementa conforme aumenta el porcentaje de concentración de la celulosa. Lo anterior confirma la presencia de celulosa en las tres fracciones mencionadas, aunque en diferente concentración. Comparando estas tres fracciones con la penca entera, el IC de la penca es menor. Esto quizás se debe a la presencia de un mayor porcentaje de concentración de celulosa amorfa en otras partes de la penca, lo cual hace que la fracción de la celulosa cristalina sea menor comparada con la fracción amorfa presente en toda la penca.

Tabla 3.2. Índice de Cristalinidad (IC) de cada una de las fracciones de la penca, así como de la penca entera y liofilizada.

Fracción de la penca	IC (%)
Cutícula ^{1a}	34.53
Epidermis ^{1a}	55.17
Fibra^{1a}	55.85
Penca entera secada a 60°C^{1a}	43.97
Penca entera liofilizada ^{1b}	58.59
Penca entera liofilizada ²	60.63

(¹) Penca de Amatitán, Jal. (²) Penca de Arandas, Jal. (^a) Lote de pencas colectado en abril del 2015); (^b) Lote de penca colectado en septiembre del 2015.

En cuanto al IC determinado para la penca entera secada a 60°C se encontró que tiene una diferencia importante comparado con los obtenidos para los dos lotes de penca liofilizada (43.97%, 58.59 y 60.63%; respectivamente). Considerando que se ha demostrado que la celulosa cristalina no se ve afectada por el proceso de liofilización (Hall *et al.* 2010), las diferencias observadas podrían deberse a otros factores relacionados con las condiciones en que se cultivó el agave tales como el clima, el tiempo de cosecha, la madurez de la planta y el tipo de suelo, entre otros factores; que determinan las propiedades químicas de la biomasa lignocelulósica.

Entre dichas propiedades está la concentración de celulosa (Cedeño y Álvarez, 1999). Esto se puede corroborar observando que la penca liofilizada (lote 1b) y la penca entera secada a 60°C (lote 1a) tienen diferentes IC a pesar de que provienen del mismo lugar. Sin embargo, la diferencia entre estos dos lotes de penca es el tiempo de corte. En cuanto a los IC de los dos lotes de penca liofilizada son muy similares a pesar de que tienen diferente lugar de procedencia. Esta similitud puede ser por coincidencia ya que por ser de diferente lugar se esperaría cierta diferencia. Los difractogramas de cada fracción se muestran en el Anexo B.

3.2.2. Caracterización físico-química de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber

3.2.2.1. Composición química

La composición química de cada una de las fracciones de la penca se muestra en la Tabla 3.3. El porcentaje de concentración de la celulosa, hemicelulosa y lignina tanto de la penca entera como de la fibra, son similares a las reportadas por Salas, (2013), las cuales se reportan en la misma Tabla 3.3. La cutícula está constituida principalmente por ceras, cutina y lignina; los cuales le ayudan a dar protección a la planta y evitan la pérdida de agua (Esaú, 1985). Como se puede observar en la Tabla 3.3, la lignina se encuentra enriquecida en esta fracción de la penca, lo cual corrobora lo anteriormente mencionado. Mientras que la fracción de la epidermis está enriquecida en celulosa y hemicelulosa (Tabla 3.3), principales constituyentes de las células con pared primaria. Sin embargo, la fracción que tiene un mayor porcentaje de concentración de celulosa y hemicelulosa es la fibra de la penca, y un menor porcentaje de concentración de lignina comparada con la cutícula y epidermis (Tabla 3.3). Esto se debe a que la fibra está constituida por tejido parenquimal (células con pared primaria), haces vasculares que están conformados principalmente por floema (estructura constituida por células de pared primaria enriquecidas en celulosa), xilema y vainas (estructuras de paredes secundarias enriquecidas en lignina). Por lo tanto, la fracción de fibra de penca es la que se espera que sea la que principalmente contribuya a la producción de biohidrógeno por dos razones fundamentales: (a) es la fracción con mayor porcentaje de concentración de celulosa y hemicelulosa y (b) es la fracción que se encuentra en

mayor porción en la penca, en comparación con la epidermis y la cutícula. Por otra parte, el contenido alto de lignina en la cutícula hace necesario llevar a cabo una deslignificación con el objetivo de dejar expuesta la fibra al ataque enzimático posterior.

Tabla 3.3. Composición química de la penca entera y sus fracciones.

Fracción de la penca	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Compuestos Solubles (%)
Cutícula ^{1a}	6.45 (±0.1)	5.72 (±0.9)	55.84 (±5.6)	31.77 (±2.15)
Epidermis ^{1a}	19.38 (±3.2)	7.99 (±1.32)	4.49 (±0.56)	67.87 (±4.76)
Fibra ^{1a}	20.08 (±3.1)	5.1 (±0.16)	0.37 (±0.2)	75.33 (±6.2)
Fibra [*]	28.79 (±1.82)	10.71(±0.66)	0.72 (±0.14)	64.71 (±2.35)
Penca entera secada a 60°C ^{1a}	21.28 (±1.50)	8.51 (±0.56)	4.26 (±1.8)	65.14 (±2.06)
Penca entera secada a 60°C [*]	28.79 (±1.82)	10.71 (±0.66)	5.05 (±0.04)	55.18 (±2.46)
Penca entera liofilizada ^{1b}	23.23 (±1.46)	6.27 (±0.12)	3.84 (±0.82)	66.50 (±1.42)
Penca entera liofilizada ²	38.93 (±3.1)	9.94 (±1.45)	3.1 (±0.50)	47.60 (±4.10)
Penca entera liofilizada ^{1b*}	30.32	4.43	5.80	54.71 (otros)

(¹) Penca de Amatitán, Jal. (²) Penca de Arandas, Jal. (^a) Lote de pencas colectado en abril del 2015); (^b) Lote de penca colectado en septiembre del 2015. (*) Lote analizado por TGA. (*) Datos reportados por Salas, S. (2013).

Para evaluar el efecto del proceso de secado como forma de conservación, se sometió la penca a un secado a 60°C y se comparó con otra muestra de penca que se liofilizó. Como se puede observar en la Tabla 3.3 la penca entera secada a 60°C (lote 1a) y la sometida al proceso de liofilización (lote 1b) no muestran diferencias importantes en su composición química probablemente porque provienen del mismo lugar (Amatitán, Jal.). La diferencia que existe entre una y otra muestra se puede deber a que fueron cosechadas en diferentes épocas. Esto concuerda con los datos de IC, donde también hubo una diferencia entre ambos lotes de pencas. Sin embargo, comparando los dos lotes de penca entera liofilizadas (lote 1b y lote 2), se pueden observar diferencias importantes debido a que estos lotes de penca son de diferentes lugares de procedencia.

Todos los datos anteriores fueron obtenidos por medio del método de Van Soest. Con el fin de corroborar estos datos, también se analizó la composición química de la penca por medio de TGA. Los datos indican que no hay diferencias importantes en la composición química cuando la penca entera liofilizada se analizó por el método de Van Soest (lote 1b) y por medio de TGA (lote 1b*). La diferencia entre ambos datos se puede deber a que son diferentes principios en los que se basa cada método. El análisis TGA se basa en la pérdida de peso debido a la gasificación de cada componente (Carrier, 2011), mientras que el método de Van Soest (Keys *et al.* 1969) se basa en diversos hidrolizados para eliminar secuencialmente cada uno de los componentes (celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos solubles).

3.2.2.2. Determinación de humedad y sólidos totales de distintas partes de la penca

Se determinó el porcentaje de humedad y sólidos totales (ST) de la parte superior, central e inferior de la penca con el fin de determinar si es más factible el trabajar de la penca entera o con alguna de estas partes. En la Fig. 3.8, se observa que el porcentaje de humedad de las tres fracciones de la penca es de 70% a 80% de humedad. Esto indica que humedad se encuentra distribuida casi uniformemente a lo largo de la penca y por consecuencia, es factible trabajar con la penca entera. En tanto que el porcentaje de concentración de los ST fue de 17 a 29%. A escala industrial será más favorable trabajar con la penca entera ya que el fraccionarla implicaría mayor trabajo y costos de producción de biohidrógeno.

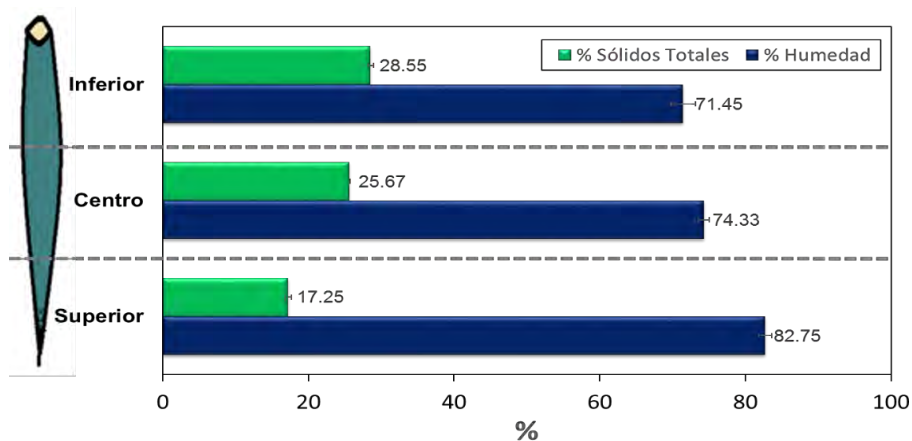


Fig. 3.8. Determinación de humedad y sólidos totales de la penca.

3.2.2.3. Determinación de ST, SV y SF de las fracciones de la penca

A cada una de las fracciones de la penca, se les determinó el porcentaje de sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos (SF). En la Fig. 3.9 se muestran los datos obtenidos que indican que la fibra, epidermis y penca entera tienen un contenido de humedad alto y por lo tanto un bajo contenido de materia orgánica medida como SV. El caso contrario se observa en la cutícula, en donde el contenido de humedad es muy bajo mientras que el contenido de SV es muy alto.

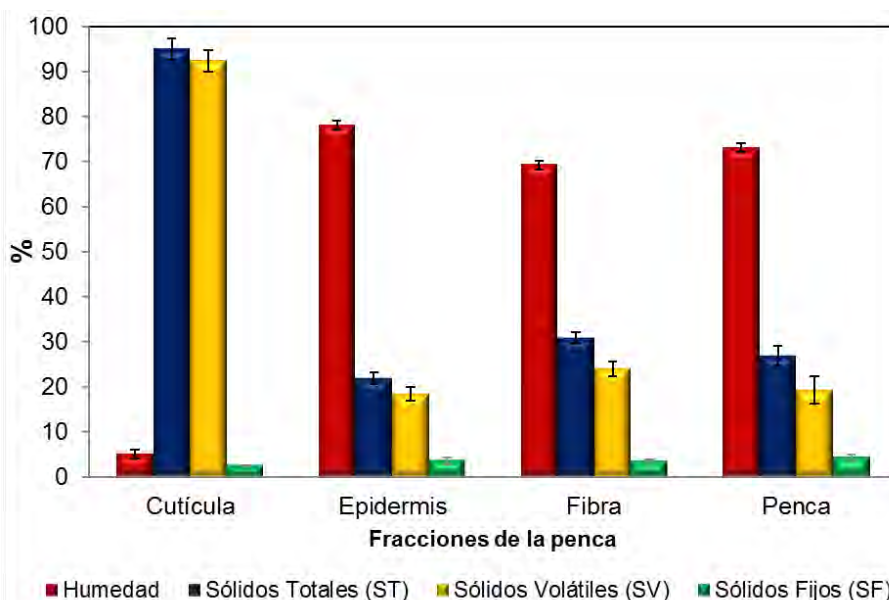


Fig. 3.9. Sólidos totales, sólidos volátiles y sólidos fijos de la penca y sus fracciones.

3.2.2.4. ATR-FTIR

Otra forma de determinar de manera cualitativa la composición química de la penca es por medio de FT-IR, mediante la identificación de grupos funcionales distintivos de los diversos compuestos que constituyen a la penca. Existen diversos estudios donde se ha utilizado esta técnica como parte de la caracterización de sustratos y en la identificación de los cambios realizados por la aplicación de diversos pretratamientos sobre la biomasa (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015; El Mansouri y Salvadó, 2007; Vázquez *et al.* 1997).

En la Fig. 3.10 se observan los espectros del estándar de lignina (EL), Avicel de celulosa microcristalina (ACM) y la penca liofilizada^{1b} (PL). En la Tabla 3.4 se

resume las bandas principales identificadas tanto en los estándares y la penca liofilizada. En todos los espectros se encuentra una banda ancha a longitudes de onda entre 3600 y 3100 cm^{-1} que puede ser atribuido a radicales O-H presentes en polisacáridos de la celulosa (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015). También puede ser atribuido a radicales O-H de fenoles que se encuentran presentes en la lignina (El Mansouri y Salvadó, 2007). Para nuestro caso puede ser atribuido a ambos debido a que estos dos compuestos están presentes en la penca.

Otra de las bandas presente en el espectro de la penca aparece a 2920 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento de los grupos C-H de los grupos metilos y metilenos de la lignina (El Mansouri y Salvadó, 2007). Tal y como se observa en la Tabla 3.4 esta banda puede ser asignada a celulosa, hemicelulosa o lignina. En este trabajo se le asignó a lignina ya que más adelante, en el proceso de deslignificación con PHA, esta banda disminuyó debido a la remoción de lignina. Otra banda presente en el espectro de la penca es la que se encuentra a una longitud de onda 1608 cm^{-1} que, de acuerdo con la literatura, es atribuida al estiramiento de grupos carbonilos conjugados con anillos aromáticos presentes en la lignina (Vázquez *et al.* 1997). Dicha banda aparece en el estándar de lignina también, por lo que se comprueba que corresponde a este grupo funcional.

La señal que aparece a una longitud de onda de 1320 cm^{-1} , de acuerdo con la literatura, corresponde a la vibración de los grupos O-H y C-H que están presentes en la celulosa. Mientras que la banda presente en 1248 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace C-H (Pérez-Pimienta *et al.* 2015) atribuido a la hemicelulosa. Otro de las bandas destacadas en el espectro de la muestra de penca es la que aparece en 1031 cm^{-1} . Las bandas presentes en la longitud de onda 1030 - 1058 cm^{-1} son atribuidas principalmente a la celulosa (Popescua *et al.* 2012; Oh *et al.* 2005). Sin embargo, también corresponde a la vibración del grupo C-H presente en guayacil, compuesto presente en la estructura química de la lignina (Sun *et al.* 2000, El Mansouri y Salvadó, 2007, Guilherme *et al.* 2015; Silva *et al.* 2008). Por tal razón, esta banda también se presenta en el estándar de lignina (Fig. 3.10-a).

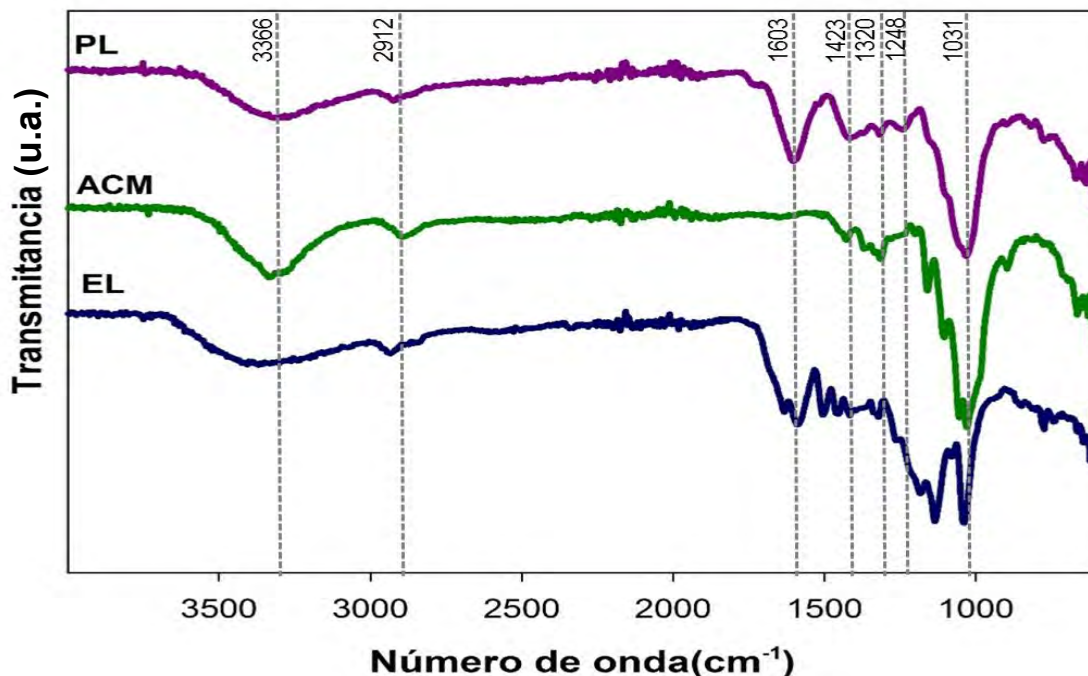


Fig. 3.10. Espectros del estándar de lignina (EL), Avicel de celulosa microcristalina (ACM) y de la penca entera liofilizada^{1b} (PL). Las bandas principales se indican con una línea vertical.

Tabla 3.4. Bandas características de los espectros de FT-IR de los estándares de lignina, Avicel y penca entera liofilizada mostradas en la Fig. 3.10.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Tipo de Vibración	Posible fuente
3800-3100	Estiramiento de O-H o N-H	Celulosa o ácidos amino
3400	Estiramiento de O-H	Lignina
2910, 2848	Estiramiento de C-H en CH y CH ₂	Celulosa, hemicelulosa o lignina
1745	Estiramiento de C=O	Hemicelulosa
1734	Estiramiento de C=O	Grupos éster y ácidos carboxílicos
1647	Estiramiento de O-H absorbidos	Agua
1605	Vibración del anillo aromático	Lignina
1515	Vibración de C=C en anillos aromáticos	Lignina
1460	Deformación de C-H	Lignina
1430	Flexión de O-H	Celulosa
1390, 1360	Estiramiento de O-H fenólicos	Lignina
1372	Deformación de C-H	Celulosa, hemicelulosa
1315	Deformación de O-H y balanceo de CH ₂	Celulosa
1252	Flexión de C-H	Hemicelulosa
1235	Estiramiento de C-H	Lignina, hemicelulosa
1164	Vibración asimétrica C-O-C	Celulosa (Enlaces β-glucosídicos)
1058, 1030	Estiramiento del anillo C-O	Celulosa, hemicelulosa y lignina

3.3. Deslignificación de la penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber durante el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino: efecto del pH, concentración de peróxido de hidrógeno, pre-hinchamiento y tiempo de contacto

3.3.1. Evaluación del pH y la concentración de peróxido de hidrógeno alcalino durante el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino

Uno de los factores que más influyen para la remoción eficiente de lignina, es la concentración de PH debido a que, mientras exista una mayor concentración de este compuesto, se puede obtener una mayor concentración de radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{OOH}$. Estos radicales son los encargados de llevar a cabo la oxidación de la lignina, de tal forma que se logra oxidarla generando una deslignificación de la estructura lignocelulósica (Su *et al.* 2015). En la Tabla 3.5 se muestran los resultados del uso de dos concentraciones de PH: 2% (Su *et al.* 2015) y 0.3% (Abreu, 2013). La mayor remoción de lignina, y la mayor recuperación de celulosa y hemicelulosa se obtuvieron cuando se utilizó una concentración de PH al 2%. Con esto se corroboró lo estipulado por Gould (1985), quien indica que la concentración de PH debe ser mayor o igual a 1% para una buena deslignificación. Por otra parte, el porcentaje de recuperación de la celulosa a partir de la penca fue de 85.13%, similar (81.3%) al reportado por Su *et al.* (2015) para olote de maíz.

Tabla 3.5. Recuperación de la celulosa, hemicelulosa y lignina en la fracción 1 obtenida después del pretratamiento de la penca con PHA.

Muestra	Recuperación (%)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Peróxido de hidrógeno al 2% y pH 11.5	85.13	69.00	18.00
Peróxido de hidrógeno al 2% y pH SA*	71.79	93.00	63.00
Peróxido de hidrógeno al 0.3% y pH 11.5	83.45	50.00	50.00
Peróxido de hidrógeno al 0.3% y pH SA*	76.30	93.44	93.34

*Sin ajuste (SA).

Otro de los factores que tienen gran influencia para que haya una buena deslignificación es el pH. El mecanismo del pretratamiento con PHA consiste en la saponificación de los enlaces ésteres y éster que se encuentran en y entre la lignina y la hemicelulosa, generando su solubilización. Los radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) e hidropéroxido ($\bullet\text{OOH}$) son generados por la descomposición del PH y son

responsables de la deslignificación y solubilización de hemicelulosa (Fang *et al.* 1999). La máxima producción de estos radicales comienza bajo condiciones alcalinas, es decir, a partir de un pH de 11.5 y 11.6 (Gould, 1985), tal y como se observa en el diagrama de especiación en la Fig. 3.11. En el diagrama se aprecia que a partir de un pH de 11.5, la concentración de los radicales hidroperóxidos se mantiene constante mientras que la concentración de los radicales hidroxilos incrementa hasta un pH de 14. Por tal motivo, mientras las condiciones sean más alcalinas, las concentraciones de estos dos radicales se incrementará, por lo que se esperaría una mayor deslignificación.

Dicho efecto del pH se corroboró realizando un experimento con ajuste del pH a 11.5 y otro experimento sin dicho ajuste (el pH se mantuvo ~5.7). Esto se realizó para ambas concentraciones de PH (2% y 0.3%). En la Tabla 3.5 se muestran los resultados y es notorio que cuando se ajustó el pH a 11.5 en los experimentos con una concentración de PH al 2% o al 0.3% hubo mejores rendimientos de remoción de lignina que cuando no se realizó el ajuste. Esto se debió a que, bajo condiciones neutras, y de acuerdo con el diagrama de especiación del PH, hay una menor concentración de los radicales que cuando se tiene un pH de 11.5.

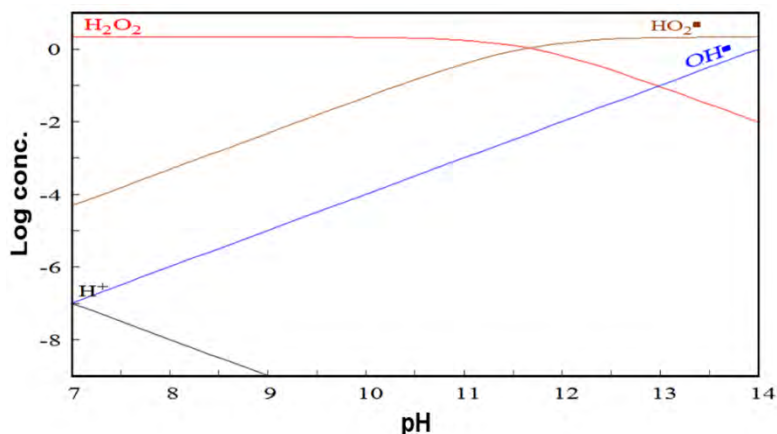


Fig. 3.11. Diagrama de especiación del peróxido de hidrógeno.

3.3.2. Efecto del tiempo de hinchamiento con peróxido de hidrógeno sobre la penca liofilizada

Con el fin de lograr que se obtuvieran mejores rendimientos de deslignificación, se dejó el PH en contacto con la penca a cuatro tiempos diferentes (0, 1.5, 3 y 6 h)

antes del ajuste de pH a 11.5 con el objetivo de generar un hinchamiento de la penca previo al pretratamiento con PHA. Una vez transcurridos estos tiempos, se ajustó el pH a 11.5 y se dejó actuar al PHA por 6 h. Esto se hizo con el fin de que una vez que el PH penetrara las paredes de la penca, generara un hinchamiento y una vez que se ajustara el pH se esperaba que los radicales pudieran tener mayor contacto con la lignina que se encuentra presente de manera interna en esta biomasa.

3.3.2.1. Caracterización morfológica

Con el fin de evaluar los cambios morfológicos que generó el hinchamiento con PH en la penca, se realizó un análisis de SEM de la penca después de los cuatro tiempos de hinchamiento (Fig. 3.12). En base a las micrografías obtenidas, se observa que en los diferentes tiempos de hinchamiento se obtuvieron cambios morfológicos muy semejantes. Dentro de estos cambios, se observa una remoción significativa del parénquima y de cristales oxalatos de calcio. Además de que las estructuras internas (xilema y floema) están mayormente expuestas.

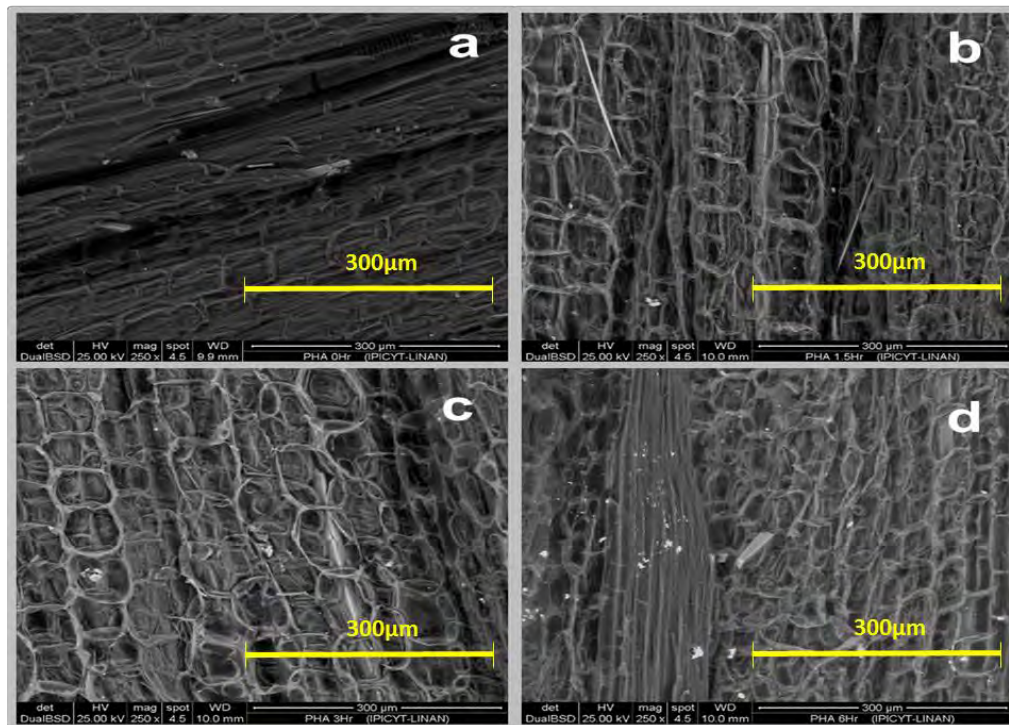


Fig. 3.12. Micrografías de SEM que muestran el efecto del tiempo de hinchamiento con peróxido de hidrógeno en la penca entera liofilizada. a) 0 horas de hinchado. b) 1.5 horas de hinchado. c) 3 horas de hinchado. d) 6 horas de hinchado.

Una vez transcurridos los cuatro tiempos de hinchamiento antes mencionados, a cada uno de estos experimentos se les ajustó el pH a 11.5 y se dejó actuar por 6 horas. En la Fig. 3.13 se observan las micrografías de las fibras obtenidas de este experimento. Comparando las 4 micrografías, se observa que no hay un cambio importante a ninguno de los tiempos de hinchamiento evaluados. La Fig. 3.13-a muestra la fibra de la penca sin un hinchamiento, únicamente se sometió al pretratamiento con PHA directo, es decir, se ajustó el pH en este momento. La fibra observada en esta micrografía, muestra cambios morfológicos similares a las fibras que se sometieron previamente a un hinchamiento con PH, en donde parte del parénquima fue removido y las estructuras internas (xilema y floema) quedaron más expuestas. Esto indica que el efecto de hinchamiento no tiene un impacto importante en el proceso de deslignificación.

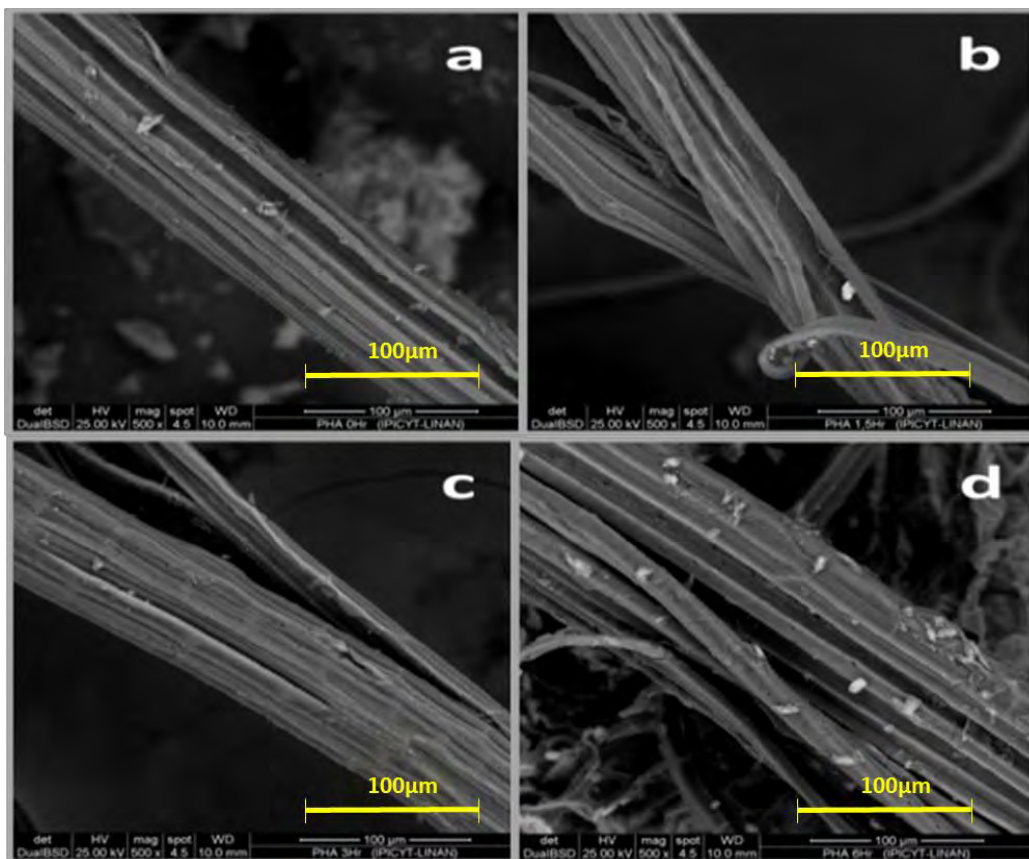


Fig. 3.13. Micrografías SEM de la fracción 1 del pretratamiento con PHA previamente hinchadas con peróxido de hidrógeno. a) 0 horas de hinchamiento, b) 1.5 horas de hinchamiento, c) 3 horas de hinchamiento, d) 6 horas de hinchamiento.

El efecto de hinchamiento tampoco tuvo un efecto importante en el IC (Fig. 3.14) ya que resultaron semejantes. Sin embargo, la peca entera liofilizada sometida directamente con PHA, sin previo hinchamiento (Fig. 3.14 H-0h), tiene un menor IC comparada con la peca entera liofilizada hinchada, tanto a 1.5 h (Fig. 3.14 H-1.5h) y 3 h (Fig. 3.14 H-3h). Se observó lo contrario al comparar el IC de la peca sin hinchamiento, con el IC de la peca con hinchamiento a 6h (Fig. 3.14 H-6h), ya que esta última tuvo un menor IC. Para la producción de biohidrógeno se busca tener el menor IC posible, ya que, la estructura de la celulosa cristalina es más fácil de degradar enzimáticamente (sólo puede ser hidrolizada lentamente por las exocelulasas, Baldrian y Valaskova, 2008).

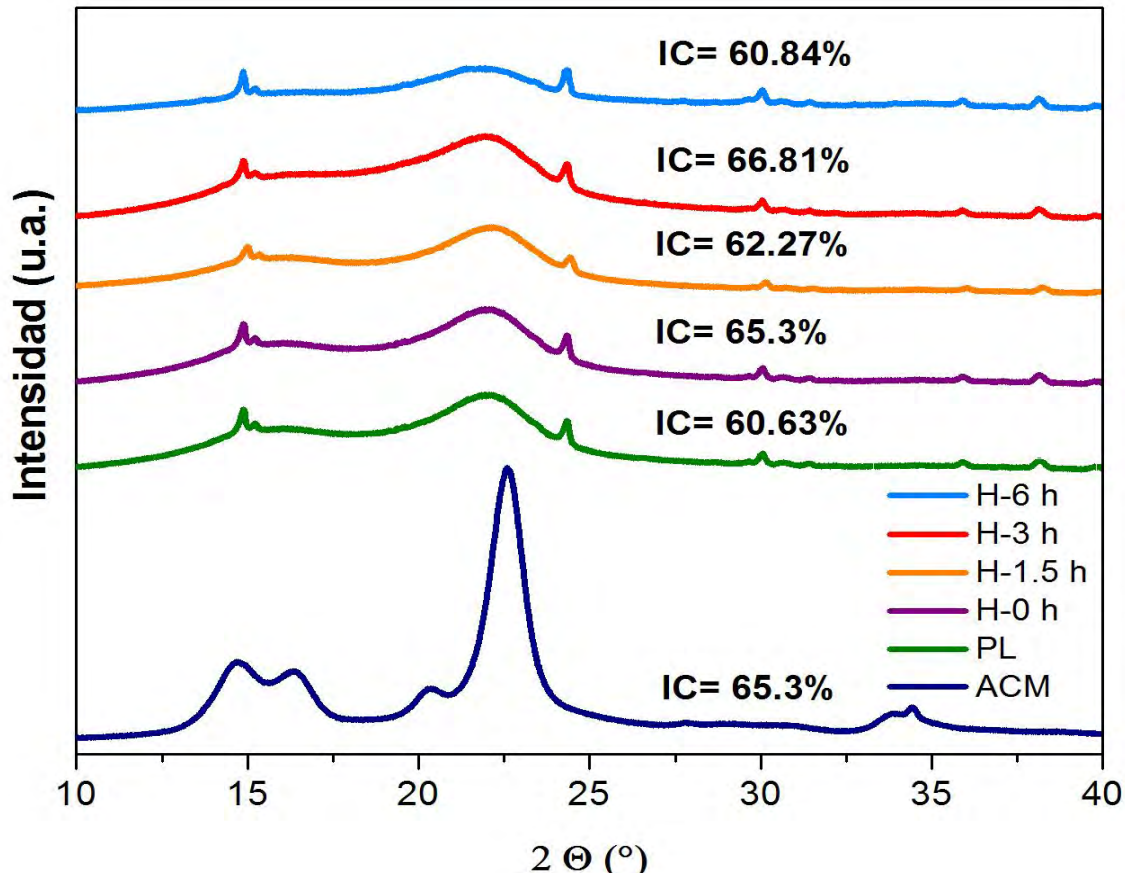


Fig.3.14. Índice de cristalinidad del Avicel de celulosa microcristalina (ACM), de la peca liofilizada sin ningún pretratamiento (PL), de la fracción 1 a partir de la peca previamente hinchada con peróxido de hidrógeno: con 0 h de hinchamiento (H-0 h); 1.5 h de hinchamiento (H-1.5 h); 3 h de hinchamiento (H-3 h); 6 h de hinchamiento (H-6 h).

3.3.2.2. Caracterización química

Aunque en la Tabla 3.5 se empleó el método de Van Soest para determinar la composición de las fibras, los datos arrojados por dicho método durante el análisis del efecto del tiempo de contacto del PHA mostraron ciertas inconsistencias. En el Anexo C se muestra el balance de masa calculado con base en los datos obtenidos con el método de Van Soest y las inconsistencias observadas. Por tal razón, la caracterización de las fibras en el resto de los experimentos relacionados con el pretratamiento con PHA se realizó mediante un análisis termogravimétrico (Tabla 3.6).

De acuerdo con los resultados del análisis termogravimétrico (Tabla 3.6), la fracción con mayor deslignificación (72.85%) fue la penca sometida directamente al pretratamiento con PHA sin previo hinchamiento (0 h). En tanto que las fracciones sometidas al hinchamiento, tuvieron remoción de lignina de 57 a 64%. Además, la fracción sin previo hinchamiento fue una de las fracciones con mayor enriquecimiento de celulosa. Por lo tanto, el efecto de hinchamiento con PH previo al ajuste de pH, no tiene un gran impacto ni en la deslignificación ni tampoco en el enriquecimiento de celulosa. Además, el enriquecimiento de celulosa es muy semejante en todos los tiempos de hinchamiento. Esto corrobora lo que se observó en SEM, donde el efecto del tiempo de hinchamiento produjo cambios morfológicos similares a los observados en la fibra sin previo hinchamiento.

Tabla 3.6. Porcentajes de recuperación de las fibras presentes en la fracción 1 obtenida después del pretratamiento con PHA y previamente hinchada con peróxido de hidrógeno.

Tiempo de hinchamiento (h)	Recuperación en la fracción 1(%)*		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
0	132	50.56	27.15
1.5	130	47.40	36.20
3	142	56.88	43.44
6	122	60	36

*El porcentaje de recuperación se calculó a partir del análisis termogravimétrico.

Otra forma de caracterizar químicamente el efecto de hinchamiento en la penca entera liofilizada es por medio de ATR-FTIR, técnica que ayuda a determinar cualitativamente los cambios químicos en la penca. Las bandas en 3370 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} y 1020 cm^{-1} son características de la celulosa (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015), las cuales se intensifican con el pretratamiento de PHA. Estas bandas tienen menor intensidad en el espectro de la penca liofilizada sin pretratamiento con PHA (Fig. 3.15-a) comparado con los espectros de las pencas hinchadas. Esto sugiere que posiblemente hubo un enriquecimiento de celulosa.

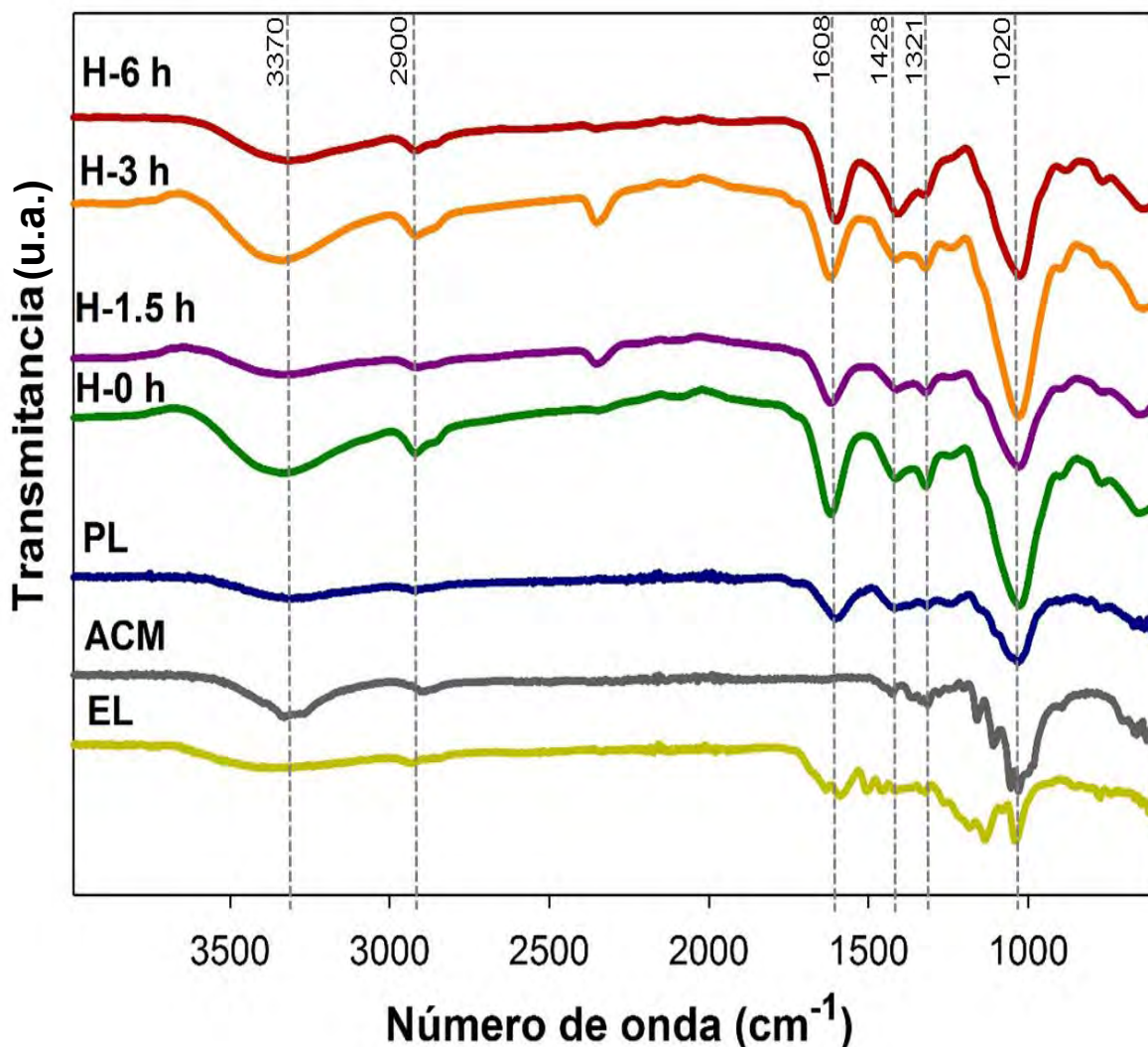


Fig. 3.15. Espectros de la penca entera liofilizada (PL), de la fracción 1 con: 0 h de hinchamiento (H-0h); 1.5 h de hinchamiento (H-1.5h); 3 h de hinchamiento (H-3h); 6 h de hinchado (H-6h). Las bandas principales se indican con una línea vertical.



3.3.3. Efecto del tiempo de contacto del peróxido de hidrógeno alcalino con la penca entera liofilizada

3.3.3.1. Recuperación de celulosa, hemicelulosa y lignina

Una vez evaluado el efecto de pH, la concentración de PH y el hinchamiento; se concluyó que es necesario tener un pH alcalino (11.5) y una concentración de PH del 2% para obtener mayores rendimientos de deslignificación y enriquecimiento de celulosa. Además, se observó que el pre-hinchamiento no tiene un impacto significativo en la remoción de lignina, ni en el enriquecimiento de celulosa. Por tal motivo, se decidió trabajar únicamente con PH al 2% y con un pH de 11.5. Además, con el fin de optimizar el tiempo de contacto del PHA con la penca, se evaluaron dos tiempos: 1.5 y 6 h; tiempos en donde se obtuvieron mejores rendimientos de deslignificación y enriquecimiento de celulosa en el trabajo de Su *et al.* (2015). Para evaluar los efectos de estos dos tiempos, se caracterizó cada fracción de manera morfológica (SEM y XRD) y química (ATR-FTIR y TGA).

Para llevar a cabo el análisis de fibras se empleó un análisis termogravimétrico. En base a los datos obtenidos (Tabla 3.7) la fracción 1 que se vio mayormente enriquecida en celulosa (de 45.39% incrementó a 270%) y con una remoción de hemicelulosa y lignina del 100% fue la penca con PHA a 1.5 h. En tanto que en el experimento con PHA a 6 h tuvo un enriquecimiento de celulosa del doble, una remoción de hemicelulosa del 70% y una deslignificación del 94%. Además, en este experimento con PHA a 6 h se obtuvo un 30% de hemicelulosa y un 4% de lignina. Por lo que las condiciones del experimento 1 son las más favorables para llevar a cabo una mayor deslignificación y un mayor enriquecimiento de celulosa.

Estos resultados difieren con los reportados por Su *et al.* (2015) ya que ellos reportan un 81.3% de enriquecimiento de celulosa. Esta diferencia puede deberse a que son sustratos diferentes (olote). La diferencia en la cantidad de lignina removida en el experimento con PHA a 1.5 h y PHA a 6 h, puede deberse a que, mientras más tiempo de reacción esté el PHA con la penca, el pH tiene a incrementar (de 11.5 hasta 13.2), lo que genera la producción de los radicales hidroperóxidos (HO_2^\bullet) superóxido (O_2^\bullet) y en menor cantidad, los hidroxilos ($^\bullet\text{OH}$).

Cuando la concentración de ion hidroxilo es superior a la del anión perhidroxilo (HO_2^-), la deslignificación se podría reducir (Sun *et al.* 2000). Cabe mencionar, que en estos experimentos se trató de mantener el pH a 11.5, ajustándolo cada hora. Sin embargo, cuando transcurría esa hora, se tenía un pH >13 por lo que esto pudo contribuir a que en el experimento con PHA a 6 h, haya una menor deslignificación (Sun *et al.* 2000).

En cuanto a la fracción 2, en el experimento con PHA a 1.5 h se recuperó un 72.75% de hemicelulosa y en el experimento con PHA a 6 h se recuperó un 56.64% de hemicelulosa. Esto indica que en el experimento con PHA 1.5 h, hubo una mayor eficiencia de recuperación de hemicelulosa. Su *et al.* (2015) recuperaron hasta un 88.9% de hemicelulosa. Esta diferencia se puede deber a que la biomasa utilizada es diferente ya que ellos utilizan la mazorca de maíz, en tanto que en este trabajo se utilizó penca; biomasa con estructura química diferente. Además, en esta fracción también se recuperó entre un 36.24% en la F2E1 y un 39.88% en la F2E2 de lignina. Esto puede deberse a que la hemicelulosa se encuentra unida a la hemicelulosa mediante enlaces éster y éter, lo que contribuyó a que, cuando la hemicelulosa precipitara gracias al etanol, la lignina que aún estaba unida a la hemicelulosa también precipitara.

Tabla 3.7. Recuperación de las tres fracciones recuperadas del pretratamiento con PHA a 1.5 h y 6h de contacto con la penca, con base en el análisis termogravimétrico.

a) Porcentaje de recuperación en el experimento con PHA a 1.5h			
Fracción	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Fracción 1 (F1E1)	270	0	0
Fracción 2 (F2E1)	2.96	72.75	36.24
Fracción 3 (F3E1)	0	0	11.49
b) Porcentaje de recuperación en el experimento con PHA a 6h			
Fracción	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Fracción 1 (F1E1)	201	30	4
Fracción 2 (F2E1)	2.52	56.46	39.88
Fracción 3 (F3E1)	0	0	17.26

En la fracción 3 del experimento con PHA a 1.5 h, se recuperó un 11.49% de lignina y, junto con la fracción 2, hubo una recuperación del 47.74%. En tanto que en la fracción 3 con PHA a 6 h, hubo una recuperación de lignina del 17.26% y junto con la fracción 2, hubo una recuperación total del 57.06%. El resto de la lignina pudo quedar aún soluble en el residuo final en ambos experimentos.

3.3.3.2. Caracterización de la fracción 1

3.3.3.2.1. Análisis morfológico

La penca de *Agave tequilana* F.A.C. Weber fue sometida a un proceso de liofilización como método de conservación de la penca para su uso en laboratorio, muestras que se pueden observar en las micrografías de las Fig. 3.16-a y 3.16-e. En la micrografía de la Fig. 3.16-a se observa un haz vascular de penca cubierto por tejidos de parénquima, tejido enriquecido en hemicelulosa y pectinas. En la micrografía Fig. 3.16-e se observa el haz vascular cubierto por tejido parenquimal. Los haces vasculares son una estructura importante dentro de la anatomía vegetal, ya que se encuentran constituidos de manera interna por el xilema y el floema que se encargan de la conducción de agua y nutrientes respectivamente. Estas estructuras se encuentran principalmente lignificadas y cuentan con una estructura laminar constituida especialmente por celulosa (Esaú, 1985).

En la micrografía de la Fig. 3.16-b se observa el haz vascular obtenido en la fracción 1 del experimento con PHA a 1.5 h (F1E1), donde la estructura vegetal no sufrió cambios significativos. En este haz también se observan oxalatos de calcio de tipo estiloide y una disminución del grosor del tejido de parénquima que cubre al haz. Esto se debe a que parte de la hemicelulosa fue removida, principal compuesto que constituye a este tejido. Comparando las micrografías de las Fig. 3.16-b y 3.16-f, se observa que el haz vascular de la micrografía 3.16-f sufrió mayores cambios morfológicos. Este haz vascular corresponde a la fracción 1 obtenida en el experimento de PHA a 6 h (F1E2). Además, en este mismo haz vascular se observa que hubo una mayor remoción de oxalatos de calcio, así como una mayor remoción del parénquima.

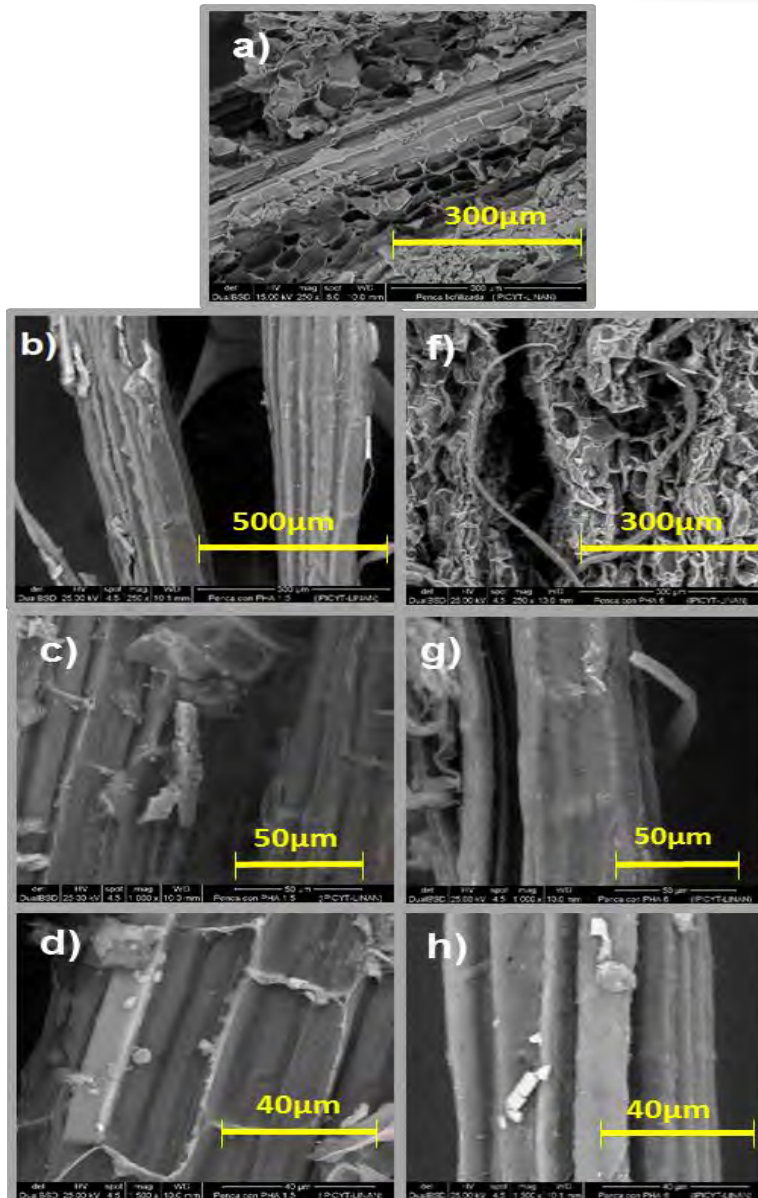


Fig. 3.16. Micrográficas de la penca entera liofilizada sin pretratamiento con PHA y de la fracción 1 obtenidas después del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F1E1) y 6 h (F1E2). a) Penca entera liofilizada sin PHA a 250×. b) F1E1 a 250×. c) F1E1 a 1000×. d) F1E1 a 1500×. e) F1E2 a 250×. f) F1E2 a 1000×. g) F1E2 a 1500×.

Otro de los cambios que se puede observar es que los tejidos del xilema y el floema presentes en el haz vascular se encuentran más expuestos (comparar Fig. 3.16-g y Fig. 3.16-h con Fig. 3.16-c y 3.16-d, respectivamente). Cambios morfológicos similares se han observado en otras investigaciones donde se ha utilizado peróxido de hidrógeno para el pretratamiento de biomasa, como el bagazo de azúcar de caña (Guilherme *et al.* 2015) o el olote de maíz (Su *et al.* 2015). Las micrográficas de las

Fig. 3.16-b, c y d, muestran que parte del parénquima fue removido, pero en una menor proporción comparada con la remoción observada en las Fig. 3.16-f, g y h. Además, los oxalatos de calcio aún se observan en las Fig. 3.16-b, c y d.

En cuanto al IC de la celulosa cristalina la fracción 1 obtenida con PHA a 1.5 h (F1E1) fue de 63.33% (Fig. 3.17) y para la fracción 1 obtenida con PHA a 6 h (F1E2) fue de 68.84%, lo que indica que ambas condiciones incrementaron el IC ya que la penca entera liofilizada sin ningún pretratamiento tiene un IC de 58.39%. Este incremento se debe a que la cantidad de celulosa disponible incrementó (Xu *et al.* 2007). Este fenómeno se ha visto reflejado también en diversos pretratamientos (Le Troedec *et al.* 2008; Borchani *et al.* 2015). Por lo tanto, la fracción que se vio mayormente enriquecida en celulosa fue la F1E1 al tener el mayor IC.

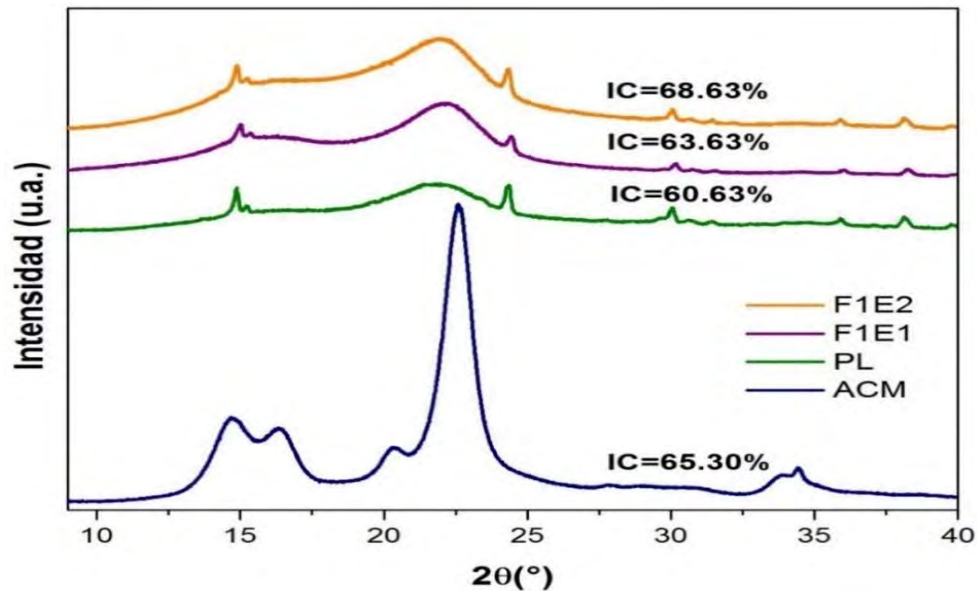


Fig. 3.17. Índice de cristalinidad de la celulosa de: estándar de celulosa microcristalina (ACM); penca liofilizada (PL) sin pretratamiento; fracción 1 con PHA a 1.5 h (F1E2); la fracción 1 con PHA a 6 h (F1E2).

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza ya que se trata del principal componente estructural de las células vegetales. Dentro de estas estructuras se encuentran microfibrillas con arreglos cristalinos y algunos arreglos amorfos (González-García *et al.* 2005). A partir de la celulosa, se lleva a cabo la producción de glucosa gracias a la ruptura de los enlaces glicosídicos presentes en la celulosa amorfa durante la hidrólisis enzimática. Sin embargo, cuando la celulosa

es cristalina, la ruptura de estos enlaces es mínima (Kumar P. *et al.* 2009). Debido a lo anterior, el incremento del IC en los experimentos F1E1 y F1E2 no es tan favorable para la hidrólisis enzimática ya que la estructura química de la celulosa cristalina es más compleja y las enzimas no logran sacarificarla con facilidad como es en el caso de la celulosa amorfa. No obstante, si la disponibilidad y exposición de celulosa fue mayor a 6 h comparada con lo observado a 1.5 h, posiblemente este pretratamiento tenga un mayor grado de sacarificación ya que la celulosa amorfa presente en la penca estará más disponible para las enzimas, que en la penca sin pretratamiento.

3.3.3.2.2. Caracterización química

Otra manera de realizar una determinación química cualitativa de los compuestos lignocelulósicos en la penca pretratada es por medio de espectroscopia FT-IR. En la Fig. 3.18 se muestran los espectros obtenidos de la penca sin pretratamiento, de la fracción 1 con PHA a 1.5 h (F1E1) y la fracción 1 con PHA a 6h (F1E2); así como los estándares de lignina y Avicel de Celulosa microcristalina. En la Tabla 3.4 se muestra un resumen de las bandas principales observadas en los espectros, así como el tipo de vibración de los grupos funcionales y sus posibles fuentes.

En todos los espectros se encuentra una banda entre 3600 y 3100 cm^{-1} , el cual puede ser atribuido a radicales O-H presentes en polisacáridos de la celulosa (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015). Sin embargo, el pico identificado en 3400 cm^{-1} también puede ser atribuido a radicales O-H de fenoles que se encuentran presentes en la lignina (El Mansouri y Salvadó, 2007). Este pico tiende a decrecer o desaparecer en los pretratamientos F1E1 (Fig. 3.18-F1E1) y F1E2 (Fig. 3.18-F1E2) comparado con el espectro de la penca sin pretratamiento (Fig. 3.18-PL). Esto sugiere que hubo una remoción de la lignina presente en la penca liofilizada, producto del proceso de deslignificación ocurrido durante el pretratamiento con PHA.

La banda a 1745 cm^{-1} corresponde al estiramiento de C=O, presentes en ácidos carboxílicos o ésteres, mientras que la banda a 1605 , 1515 y 1427 cm^{-1} se han atribuido al estiramiento de grupos carbonilos conjugados con anillos aromáticos

(Sun *et al.* 2004). A estas longitudes de onda se presenta la vibración de los grupos funcionales carbonilos-éster presentes en acetil y p-cumaril (Sun *et al.* 2001). En las fracciones 1 (Fig.3.18-F1E1) y 2 (Fig. 3.18-F1E2) de los dos experimentos con PHA, la presencia de estas 4 bandas fue nula o casi nula (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015; El Mansouri y Salvadó, 2007). Esto sugiere que se removió la lignina en los pretratamientos F1E1 y F1E2.

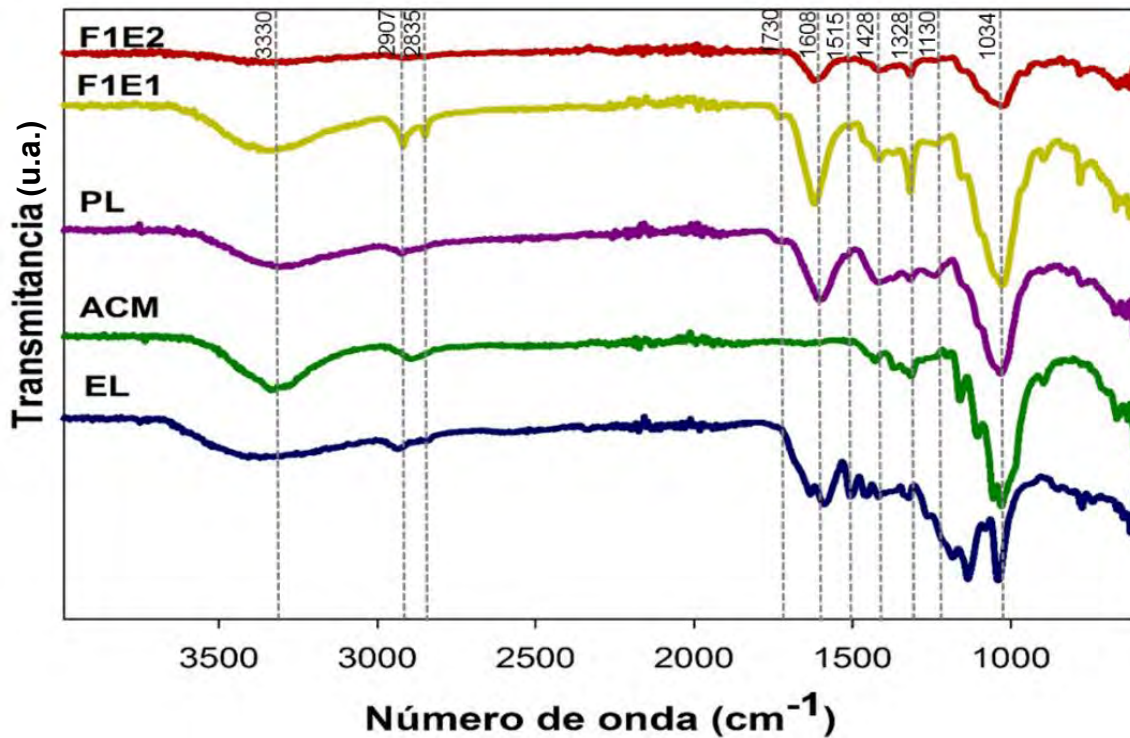


Fig. 3.18. Espectros del estándar de lignina (EL), del Avicel de celulosa microcristalina (ACM); la penca liofilizada (PL); las fracciones 1 con PHA a 1.5 h (F1E1) y 6h (F1E2). Las bandas principales se indican con una línea vertical.

La banda presente en la longitud de onda de 1030-1058 cm⁻¹ es atribuida principalmente a la celulosa (Popescua *et al.* 2012; Oh *et al.* 2005), la cual está presente en los espectros de las muestras F1E1 (Fig. 3.18-F1E1) y F1E2 (Fig. 3.18-F1E2), así como en el estándar de celulosa microcristalina, lo que indica que la celulosa si está presente en estas muestras. En el espectro de las muestras F1E1 (Fig. 3.18-F1E1) y F1E2 (Fig. 3.18-F1E2), esta banda se intensifica, lo que sugiere que posiblemente esta fracción esté mayormente enriquecida en celulosa, respecto a la penca entera liofilizada sin pretratamiento (Fig. 3.18-PL).

3.3.3.3. Caracterización de la fracción 2

3.3.3.3.1. Análisis morfológico

La Fig. 3.21 las micrografías de la fracción 2 a 1.5 h (Fig. 3.19-a, b y c) y a 6 h (Fig. 3.19-d, e y f). En ambos experimentos se observan cristales de oxalatos de calcio que fueron removidos en la primera parte del proceso, así como tejidos pequeños que pueden corresponder al parénquima y otros tejidos constituidos de hemicelulosa como colénquima o esclerénquima. De igual manera, se observan algunas estructuras helicoidales que corresponden al xilema y por tal motivo, en estas fracciones se encontró que en su composición química, había una fracción de lignina. Sin embargo, la hemicelulosa es el principal constituyente de la fracción 2 como lo sugieren las micrografías de ambos experimentos ya que en ambas se observa tejido de parénquima.

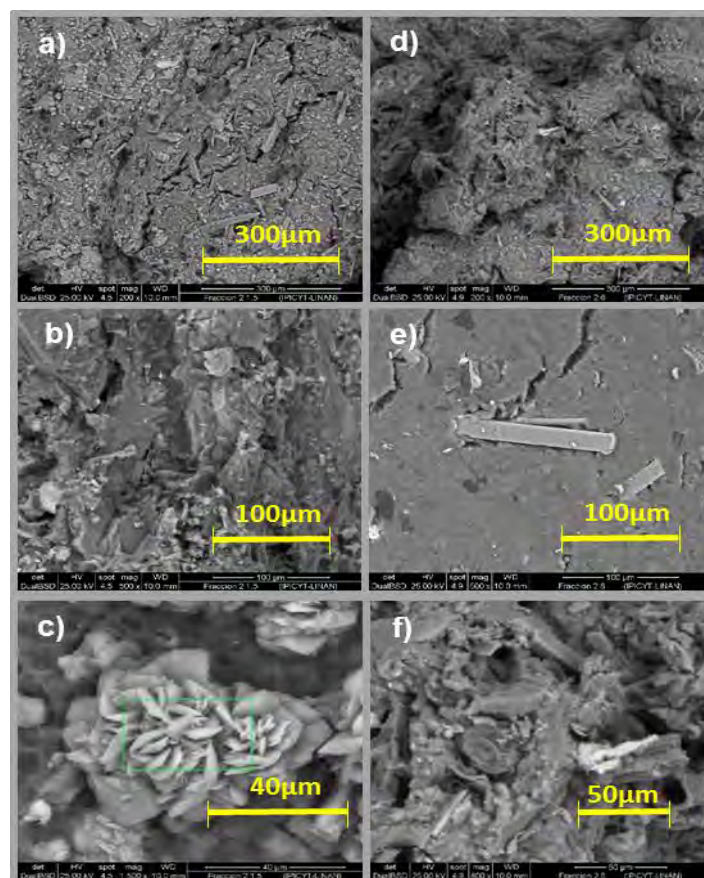


Fig. 3.19.- Micrografías de SEM que muestran la morfología de la fracción 2 recuperada del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F2E1) y 6h (F2E2). a) F2E1 a 200×. b) F2E1 a 250×. c) F2E1 a 1500×. d) F2E2 a 200×. e) F2E2 a 500×. f) F2E2. a 800×.

Uno de los aspectos relevantes encontrados en la fracción 2 a 1.5 h, fue la formación de súper drusas de oxalato de calcio (Fig. 3.19-c). He y Ni (2008) reportaron que la presencia de los radicales del PH, el pH y el tiempo de contacto, pueden generar la fractura de los rafidios y estiloides de oxalato de calcio y después dar lugar a su nucleación, proceso que pudo llevarse a cabo durante el pretratamiento originando la formación de estas súper drusas.

Como se puede observar en los difractogramas de la Fig. 3.20, para la fracción 2 de ambos experimentos a 1.5 h y 6 h, no se pudo calcular el IC de la celulosa, debido que en estas muestras no hay celulosa. Sin embargo, se observan picos que corresponden a oxalatos de calcio de tipo monohidratado (Fig. 3.20-b), mejor conocidos como whewellitas (Pérez-Pimienta *et al.* 2015).

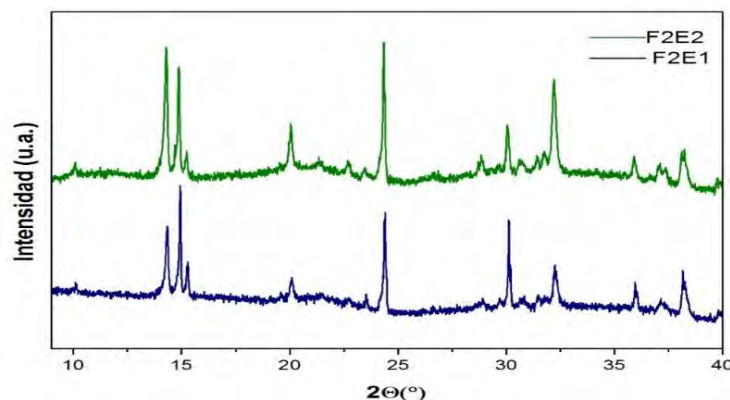


Fig. 3.20. Difractogramas de la fracción 2 del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F2E1) y a 6 h (F2E2).

3.3.3.3.2. Análisis químico

Unos de los compuestos principales que constituyen a la hemicelulosa, son los arabinoxilanos. Están constituidos químicamente de xilana con unidades de L-arabinofuranosa (L-arabinosa en su estructura pentagonal) con distribución al azar a lo largo de la cadena de xilosas. La xilosa y la arabinosa son ambas pentosas y son subunidades que constituyen a la hemicelulosa (Rostro, 2014). De acuerdo con Sun *et al.* (2012), los arabinoxilanos se caracterizan con bandas de absorción a 3422, 2921, 1461, 1325, 1159, 1127 y 1042 cm^{-1} .

De acuerdo a lo mostrado en la Fig. 3.21 en los espectros de la fracción 2 del experimento con PHA a 1.5 h (Fig. 3.21-F2E1) y del experimento con PHA a 6 h (Fig. 3.21-F2E2), las principales bandas presentes en estas dos muestras son a

3049, 2925, 1604, 1406, 1325, 1044 y 879 cm^{-1} . De acuerdo con lo mencionado en el párrafo anterior, las bandas correspondientes a la hemicelulosa son las que se encuentran a una longitud de onda de 2925, 1406, 1325 y 879 cm^{-1} . Por lo tanto, esto sugiere que las fracciones 2 de ambos experimentos contienen hemicelulosa.

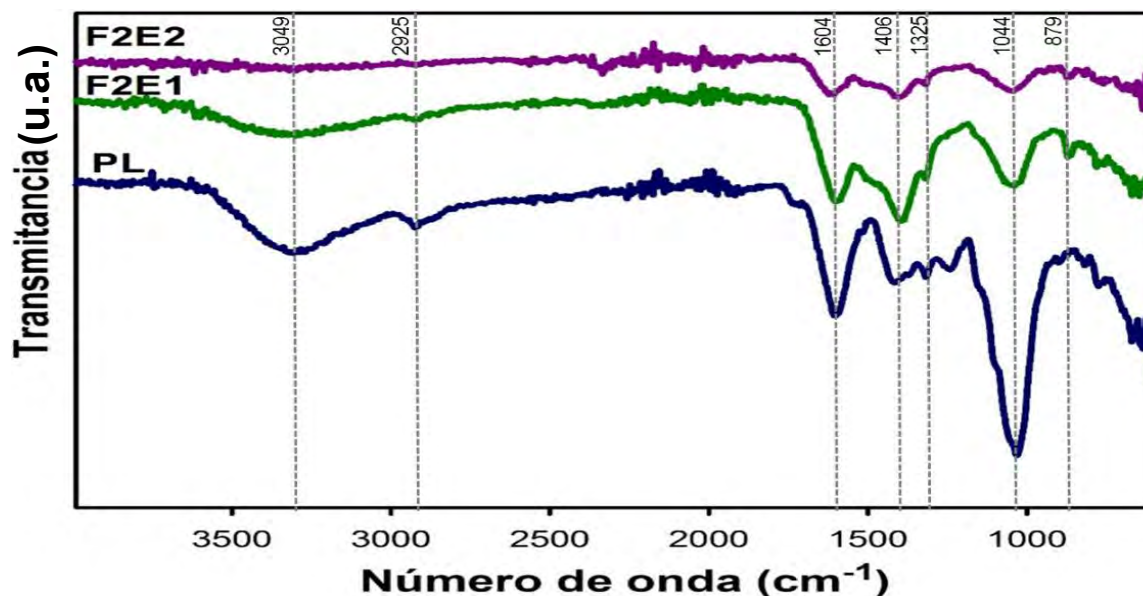


Fig. 3.21. Espectros de la peca liofilizada sin pretratamiento (PL), de la fracción 2 del experimento con PHA a 1.5 h (F2E1) y a 6 h (F2E2). Las bandas principales se indican con una línea vertical.

La banda presente en 3049 cm^{-1} puede ser atribuida a radicales O-H presentes en polisacáridos de la celulosa (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015). Esta banda tiende a decrecer tanto en la fracción 2 del experimento con PHA a 1.5 h como en el experimento con PHA a 6 h, lo cual se puede deber a que en esta fracción la presencia de celulosa es nula o casi nula. En tanto que, la banda presente a una longitud de onda de 1604 cm^{-1} se ha atribuido al estiramiento de grupos carbonilos conjugados con anillos aromáticos presentes en la lignina (Vázquez *et al.* 1997). La presencia de esta banda se debe a que en la fracción 2 de ambos experimentos, también se recuperó una fracción de la lignina, lo que corrobora la composición química determinada por TGA anteriormente presentada. La banda presente en 1044 cm^{-1} corresponde a la celulosa (Popescua *et al.* 2012; Oh *et al.* 2005), la cual tiende a decrecer con respecto a el espectro de la peca liofilizada (Fig. 3.21-PL). Esto se debe a que en la fracción 2 de ambos experimentos el porcentaje de concentración de celulosa disminuyó.

3.3.3.4. Caracterización de la fracción 3

3.3.3.4.1. Análisis morfológico

En la Fig. 3.22 se observan las estructuras morfológicas de la fracción 3 para el experimento de PHA a 1.5 h (Fig. 3.22-a) y para el experimento de PHA a 6 h (Fig. 3.22-b), así como el estándar de lignina (Fig. 3.22-c y d). La morfología del estándar de lignina no es similar a la de las fracciones 3 de ambos experimentos. Esto probablemente se debe a que el estándar de lignina corresponde a lignina extraída de madera dura (proceso Kraft).

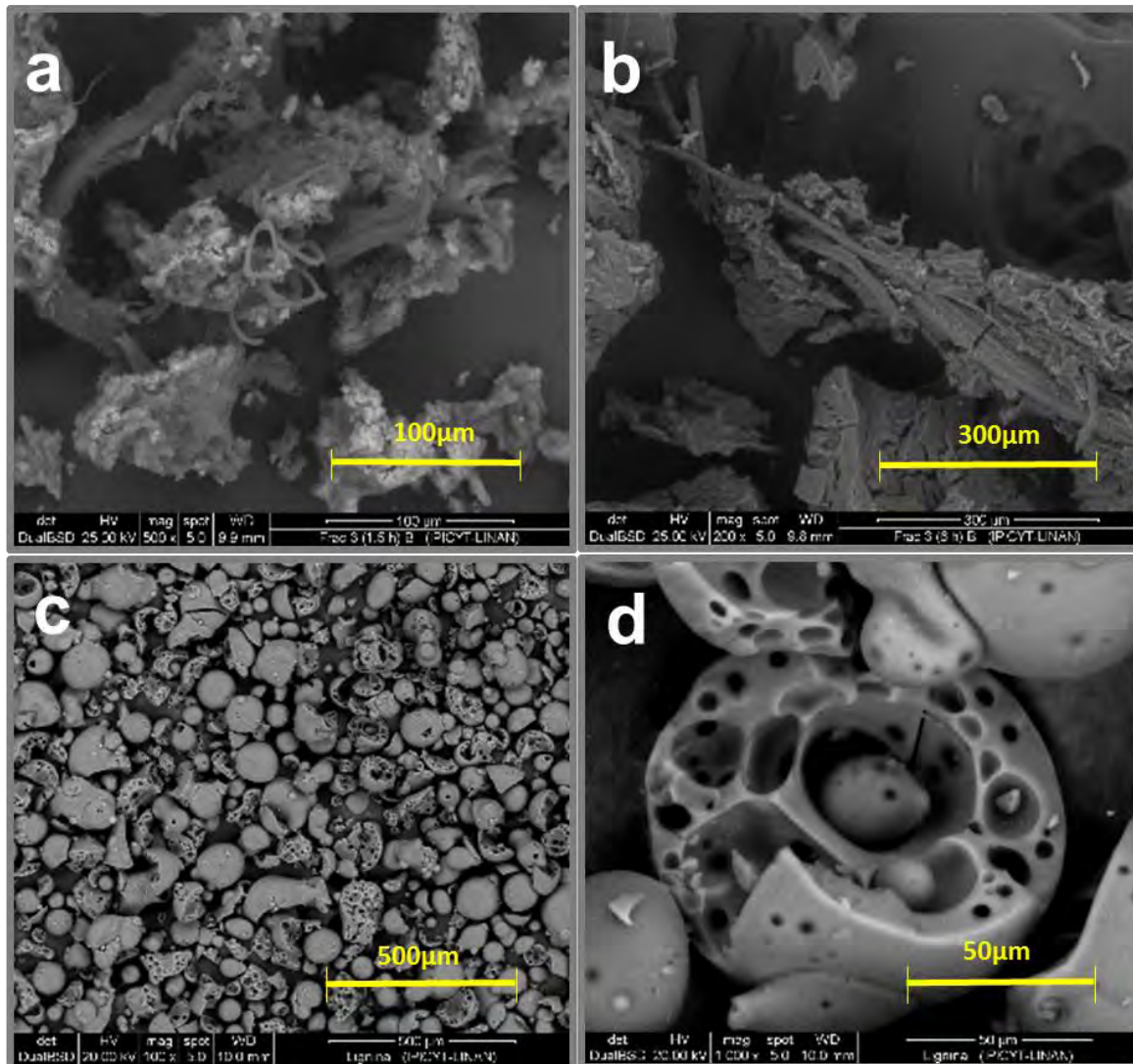


Fig. 3.22. Micrograffías de SEM que muestran la morfología de la fracción 3 recuperada del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F3E1) y a 6h (F3E2), así como el estándar de lignina. a) F3E1 a 500×. b) F3E2 a 300×. c) Estándar de lignina a 100×. d) Estándar de lignina a 500×. Flechas blancas: xilema. Flechas amarillas: vainas.

En la fracción 3 del experimento con PHA a 1.5 h se observan pequeños tejidos disgregados que podrían ser principalmente parte de las paredes lignificadas que fueron removidas de la penca. Este tipo de tejido también se observa en la fracción 3 del experimento con PHA a 6 h. Además, se observan estructuras helicoidales lignificadas del xilema (flechas blancas en la Fig. 3.22-a y Fig. 3.22-b) junto con vainas (flechas amarillas en la Fig. 3.22-a y Fig. 3.22-b) que también son tejidos lignificados (Esaú, 1985).

Para la fracción 3 de los experimentos con PHA a 1.5 h (Fig. 3.23-F3E1) y 6 h (Fig.3.23-F3E2), no fue posible cuantificar la celulosa cristalina ya que en los difractogramas solo se muestra una pequeña parte amorfa que no corresponde a la celulosa cristalina, sino a la lignina que está presente en estas muestras. Esta parte amorfa también se observa en el difractograma del estándar de lignina (Fig. 3.23-EL). Al igual que en las fracciones 2, aquí también se observan picos que corresponden a oxalatos de calcio de tipo monohidratado, mejor conocidos como whewellititas (Pérez-Pimienta *et al.* 2015).

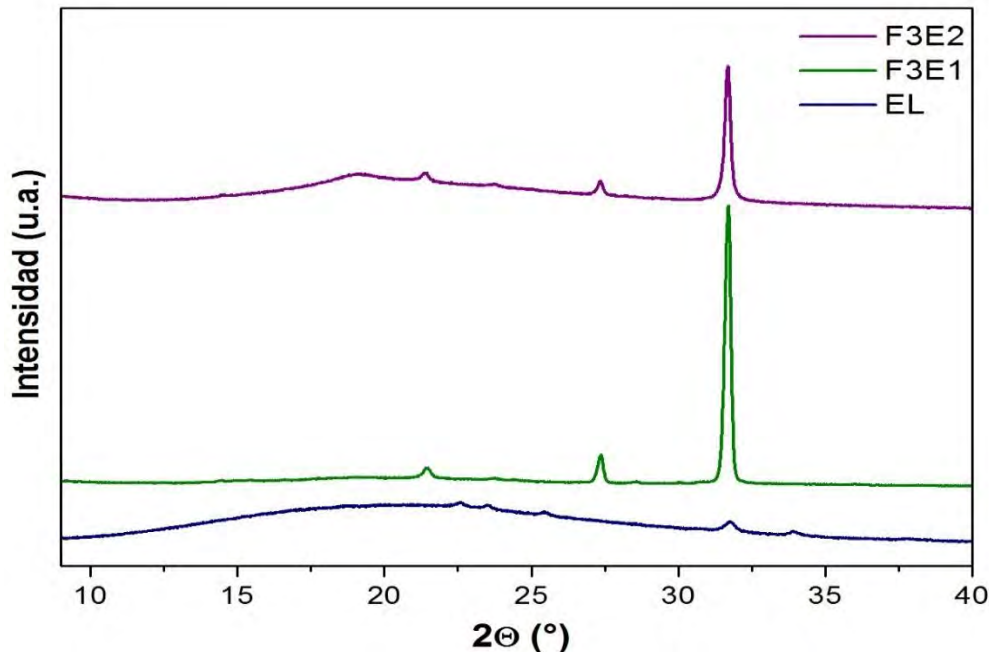


Fig. 3.23. Difractogramas de: estándar de lignina (EL), de la fracción 3 del pretratamiento con PHA a 1.5 h (F3E1) y de la fracción 3 recuperada del pretratamiento con PHA a 6h (F3E2).

3.3.3.4.2. Análisis químico mediante ATR-FTIR

En todos los espectros de la Fig. 3.24 se encuentra una banda presente entre 3600 y 3100 cm^{-1} , la cual puede ser atribuido a radicales O-H presentes en polisacáridos de la celulosa (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015). Sin embargo, la banda identificada en 3400 cm^{-1} también puede ser atribuido a radicales O-H de fenoles que se encuentran presentes en la lignina (El Mansouri y Salvadó, 2007). Este pico tiende a incrementar su intensidad en las fracciones 3 de ambos experimentos (Fig. 3.24-F3E1 y F3E2).

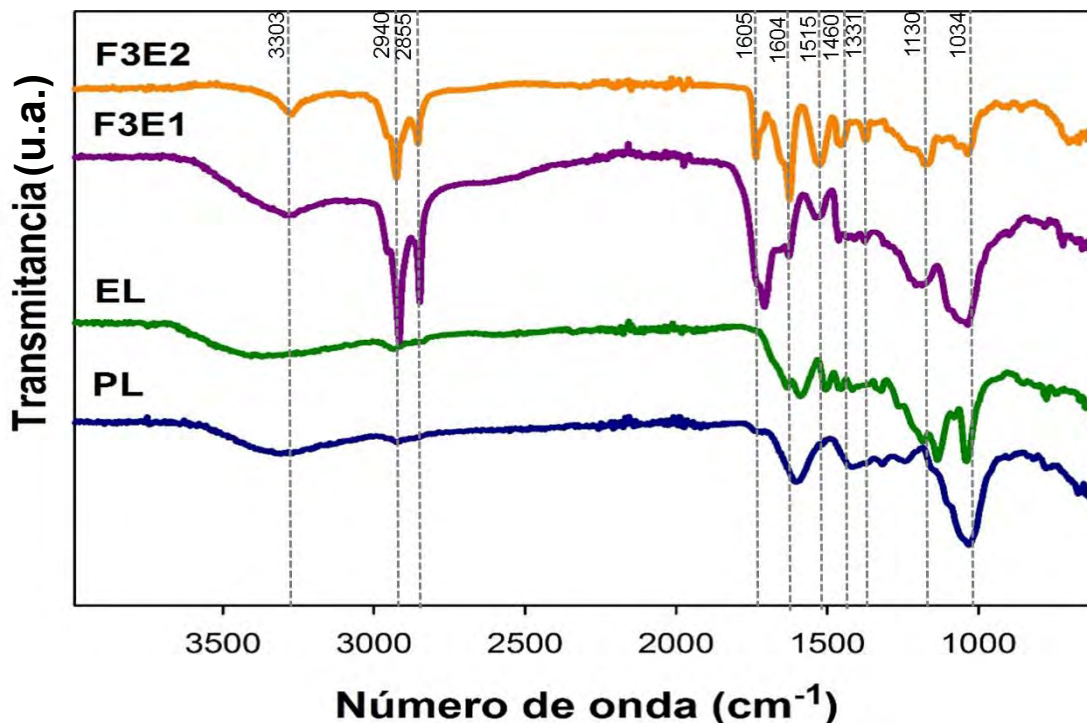


Fig. 3.24. Espectros de la penca entera liofilizada sin ningún pretratamiento (PL), estándar de lignina (EL), de la fracción 3 de los experimentos con PHA a 1.5 h (F3E1) y a 6 h (F3E2). Las bandas principales se indican con una línea vertical.

En los espectros de la fracción 3 de los experimentos con PHA a 1.5 h (Fig. 3.24-F3E1) y 6 h (Fig. 3.24-F3E2), hay una banda a una longitud de onda de 2855 cm^{-1} que solo aparece en la fracción 3 de ambos experimentos, pero no en la penca sin pretratamiento y en el estándar de lignina. De acuerdo con El Mansouri y Salvadó (2007), la región entre 3000-2800 cm^{-1} corresponde al estiramiento de grupos C-H de los grupos metilo y metileno de la lignina. Por lo que la banda presente en 2940 cm^{-1} , también corresponde a la vibración de este grupo funcional presente en la

lignina. La banda presente a 1735 cm^{-1} , corresponde a la vibración del grupo éster presente en el carbonilo-éster que son grupos funcionales presentes en acetil, fumaril, p-cumaril, etc. Estos grupos están presentes en lignina y hemicelulosa, lo que muestra que hubo una ruptura entre los enlaces éster del ácido p-cumárico y la lignina producto de la reacción con el PHA (Sun *et al.* 2002).

La banda a 1605 cm^{-1} es atribuida al estiramiento de grupos carbonilos conjugados con anillos aromáticos (Vázquez *et al.* 1997). A estas longitudes de onda se presenta la vibración del grupo carbonilos-éster en acetil, p-cumaril, etc. (Sun *et al.* 2001). Las otras dos bandas presentes en 1515 y 1460 cm^{-1} corresponden a la deformación de grupos C-H y vibración de los grupos aromáticos que son característicos de la lignina (Borchani *et al.* 2015; Su *et al.* 2015; El Mansouri y Salvadó, 2007). Estas bandas se presentan en la fracción 3 de los experimentos con PHA a 1.5 y 6 h. Esto sugiere que se removió la lignina de la fracción 1 y se recuperó la fracción de la lignina oxidada (fracción 3 de ambos experimentos). La banda a 1331 cm^{-1} es asociada con las unidades siringil. Las bandas a 1130 y 1034 cm^{-1} corresponden a la deformación del grupo aromático C-H (Sun *et al.* 2002).

Gartner y Gellerstedt (2000) en un estudio realizado con lignina obtenida a partir de madera dura kraft mediante su oxidación con PH, indican que este proceso de oxidación contribuye a la formación de nuevos grupos carboxílicos. Esto se da a partir de la oxidación del anillo aromático, de quinonas y otras estructuras de carbonilo conjugado o la oxidación directa de las cadenas laterales de lignina (Sun *et al.* 2002). Esta descomposición se da a partir de los radicales hidroxilos e iones radicales superóxidos que tienden a generar una oxidación de los fenoles presentes en la estructura química de la lignina. Por otra parte, la introducción de grupos carboxílicos en el polímero de lignina es importante ya que este grupo funcional es hidrofílico y por lo tanto facilita la disolución de la lignina en agua (Gartner y Gellerstedt, 2000). Por lo tanto, la fracción 3 de ambos experimentos, está enriquecida en lignina que está oxidada y fraccionada en sus subunidades constituyentes.

3.4. Producción de biohidrógeno en lote

3.4.1. Producción de biohidrógeno en lote de la penca entera y sus fracciones sin ningún pretratamiento

Cada una de las fracciones de la penca (cutícula, epidermis y fibra de la penca) se sometieron a ensayos de producción de biohidrógeno sin ningún pretratamiento. En la Fig. 3.25 se muestran los resultados de producción de biohidrógeno en lote de cada una de las fracciones de la penca, la penca entera secada a 60°C, la penca entera liofilizada y del inóculo utilizado como control. De acuerdo con esta figura, la fracción de penca que más biohidrógeno produjo es la fibra de la penca, esto se debe a que es la fracción más enriquecida en celulosa y hemicelulosa. Posteriormente, la epidermis y finalmente la cutícula. Esto es atribuido también a que estas fracciones tienen un menor porcentaje de concentración de celulosa y hemicelulosa.

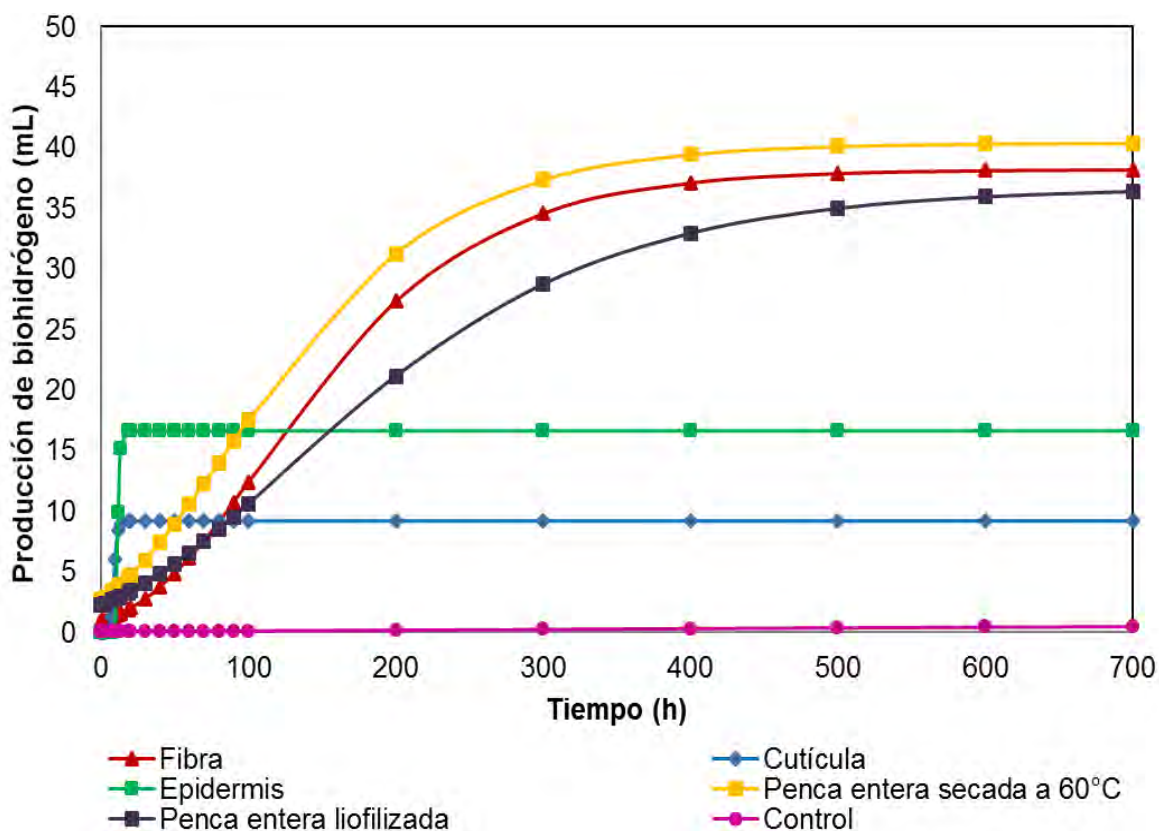


Fig. 3.25. Producción acumulada de biohidrógeno de la penca y sus fracciones sin ningún pretratamiento. Todos los ensayos se realizaron con un contenido de sólidos volátiles de 3.5 g SV/L a 35°C.

En la Tabla 3.8 se muestran las producciones máximas de biohidrógeno y su rendimiento a partir de las cinéticas de producción de cada una de las fracciones de la penca así como de la penca entera secada a 60°C y la penca entera liofilizada. La fracción de fibra fue la que mostró la mayor producción de biohidrógeno, así como el mayor rendimiento (38.25 mL hidrógeno y 0.06 mmoles H₂/g de fibra, respectivamente) seguida por la epidermis (16.613 mL·H₂ con un rendimiento de 0.02 mmoles H₂/g de epidermis) y la cutícula (9.16 mL·H₂ y un rendimiento de 0.005 mmoles H₂/g de cutícula). La cutícula tuvo la menor producción de biohidrógeno debido a que es la fracción con una menor cantidad de celulosa y hemicelulosa de acuerdo con el análisis de fibras.

En tanto que, la penca entera secada a 60°C y la penca entera liofilizada tuvieron prácticamente las mismas producciones de biohidrógeno (40.42 y 36.74 mL de H₂, respectivamente) y semejantes rendimientos de producción (0.057 mmoles H₂/g de penca entera y 0.055 mmoles H₂/g de penca liofilizada). Esto se debe a que las pencas enteras y la fibra tienen concentraciones similares de celulosa y hemicelulosa. Esto indica, en primer término, que el proceso de liofilización no tiene un efecto importante en la composición de la penca ni en la producción de hidrógeno. En segundo término, también indica que la producción de hidrógeno de la penca entera se debe principalmente a la hemicelulosa y celulosa presente en la fibra.

Tabla 3.8. Resultados de la producción en lote de biohidrógeno de las fracciones de la penca, de la penca entera secada a 60°C y de la penca entera liofilizada sin pretratamiento, obtenidos del ajuste de los datos al modelo de Gompertz.

Fracción de la penca	Hmax (mL·H ₂)	Hmax (mL·H ₂)	RMH (mmoles H ₂ /g SV)	RPH (mmoles H ₂ /g de fracción de penca)
Cutícula ^{1a}	9.16±0.5	9.16±2.4	0.06	0.0055
Epidermis ^{1a}	16.61±1.2	16.61±1.7	0.11	0.0199
Fibra ^{1a}	38.24±2.6	38.21±4.5	0.25	0.0595
Penca entera secada a 60°C ^{1a}	40.42±3.8	40.39±3.1	0.26	0.0552
Penca entera liofilizada ^{1b}	36.74±3.0	36.93±1.6	0.24	0.0574
Inóculo	1.210	0.49	0.02	0.0009

(¹)Penca de Amatitán, Jal. (^a) Primer lote de pencas (Abril del 2015); (^b) Segundo lote de penca (Septiembre del 2015).



3.4.2. Producción de biohidrógeno en lote de los hidrolizados enzimáticos de la penca entera liofilizada y de las fracciones 1 y 2 recuperadas del pretratamiento con PHA

3.4.2.1. Sacarificación enzimática de la penca liofilizada y de las fracciones 1 y 2

Con el fin de tener los azúcares disponibles para los microorganismos que llevan a cabo la producción de biohidrógeno vía fermentación oscura, fue necesario en primer término someter a hidrólisis enzimática a la fracción 1 (compuesta por celulosa y hemicelulosa principalmente) y a la fracción 2 (compuesta principalmente por hemicelulosa) obtenidas después del pretratamiento con PHA. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con Celluclast 1.5L se efectuó sobre las fracciones 1 obtenidas después del pretratamiento con PHA a 1.5 (F1E1) y 6 h (F1E2) de exposición; así como en las fracciones 2 obtenidas del pretratamiento con PHA a 1.5 (F2E1) y 6 h (F2E2). Además, se hidrolizó enzimáticamente a la penca entera liofilizada (PL) sin someterla al pretratamiento con PHA; con el fin de evaluar el efecto de la deslignificación sobre la producción de hidrógeno. Los resultados indican que el pretratamiento ayudó a que la disponibilidad de los polisacáridos se incrementara gracias a la remoción de lignina y las enzimas pudieron sacarificar una mayor cantidad de celulosa y hemicelulosa.

Los resultados obtenidos mostraron que los hidrolizados de PL alcanzaron concentraciones de 6.44 g AT/L y 5.89 g AR/L, respectivamente. En comparación con estas concentraciones los hidrolizados de F1E1 y F1E2, alcanzaron concentraciones 2.5 y 2.1 veces más altas respectivamente. En tanto que las muestras F2E1 y F2E2, alcanzaron concentraciones 1.4 y 1.1 veces más altas comparadas con los hidrolizados de la PL. Es interesante el hecho de que las hidrólisis enzimáticas de las fracciones 2, las cuales están constituidas por hemicelulosa recuperada, produjeron una concentración de AT mayor que la obtenida a partir de la PL. Esto indica que el pretratamiento ayudó a incrementar la disponibilidad de los polisacáridos gracias a la remoción de lignina y las enzimas pudieron sacarificar una mayor cantidad de celulosa y hemicelulosa.

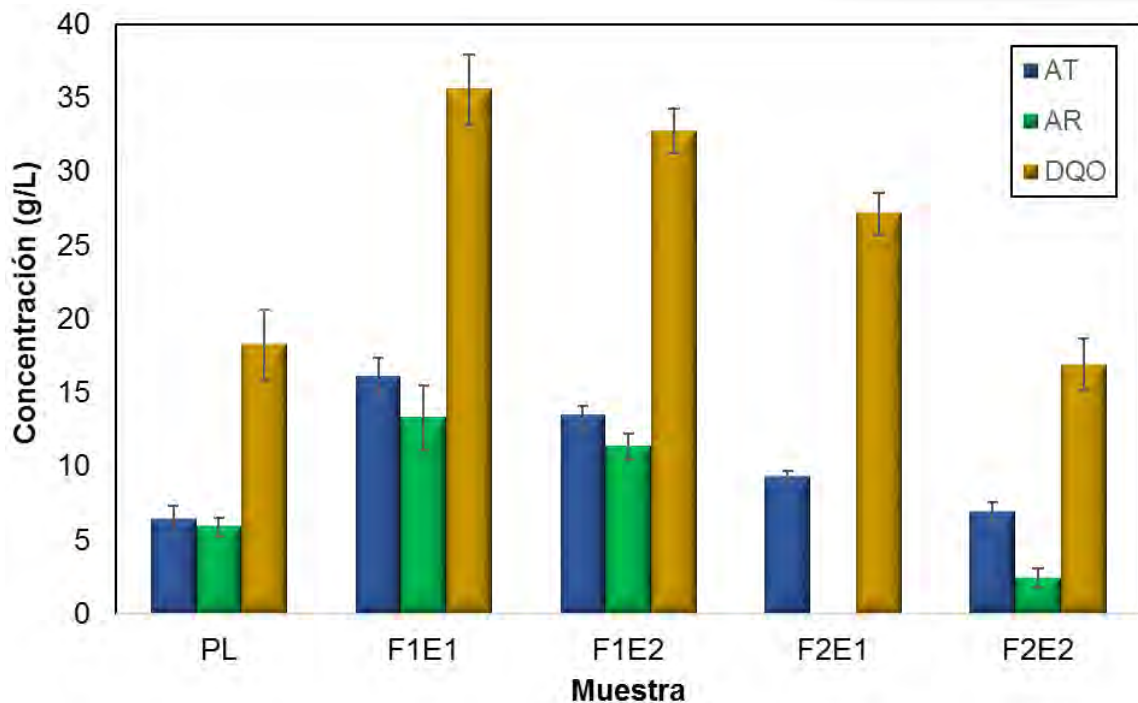


Fig. 3.26. Caracterización química de los hidrolizados enzimáticos.

Por otra parte, López Gutiérrez (2015) reportó concentraciones de 7.2 g AT/L, 6.9 g AR/L y 29.027 g DQO/L en hidrolizados enzimáticos del bagazo de *Agave tequilana* (BAT) que son cercanos a los obtenidos con la PL sin pretratamiento. Es importante resaltar que la fracción 1 de ambos experimentos es la fracción mayoritaria en peso de las tres fracciones (86.37% en peso), por lo que en un proceso industrial sería esta fracción la que se utilizaría como sustrato generador de monosacáridos.

Los sólidos remanentes de la hidrólisis enzimática se caracterizaron morfológica (SEM) y químicamente (TGA y XRD). En la Fig. 3.27 se observan las micrografías de la PL antes (Fig. 3.27-a) y después de la hidrólisis enzimática (Fig. 3.27-a'). Se puede observar que la penca tuvo pocos cambios morfológicos durante el hidrolizado enzimático. Comparando ambas micrografías se observa que el cambio morfológico principal consistió en el adelgazamiento del tejido de parénquima, el cual está constituido principalmente por hemicelulosa y pectinas y, en menor cantidad de celulosa. Esto indica que las enzimas solo lograron sacarificar los azúcares que estaban disponibles en la superficie.

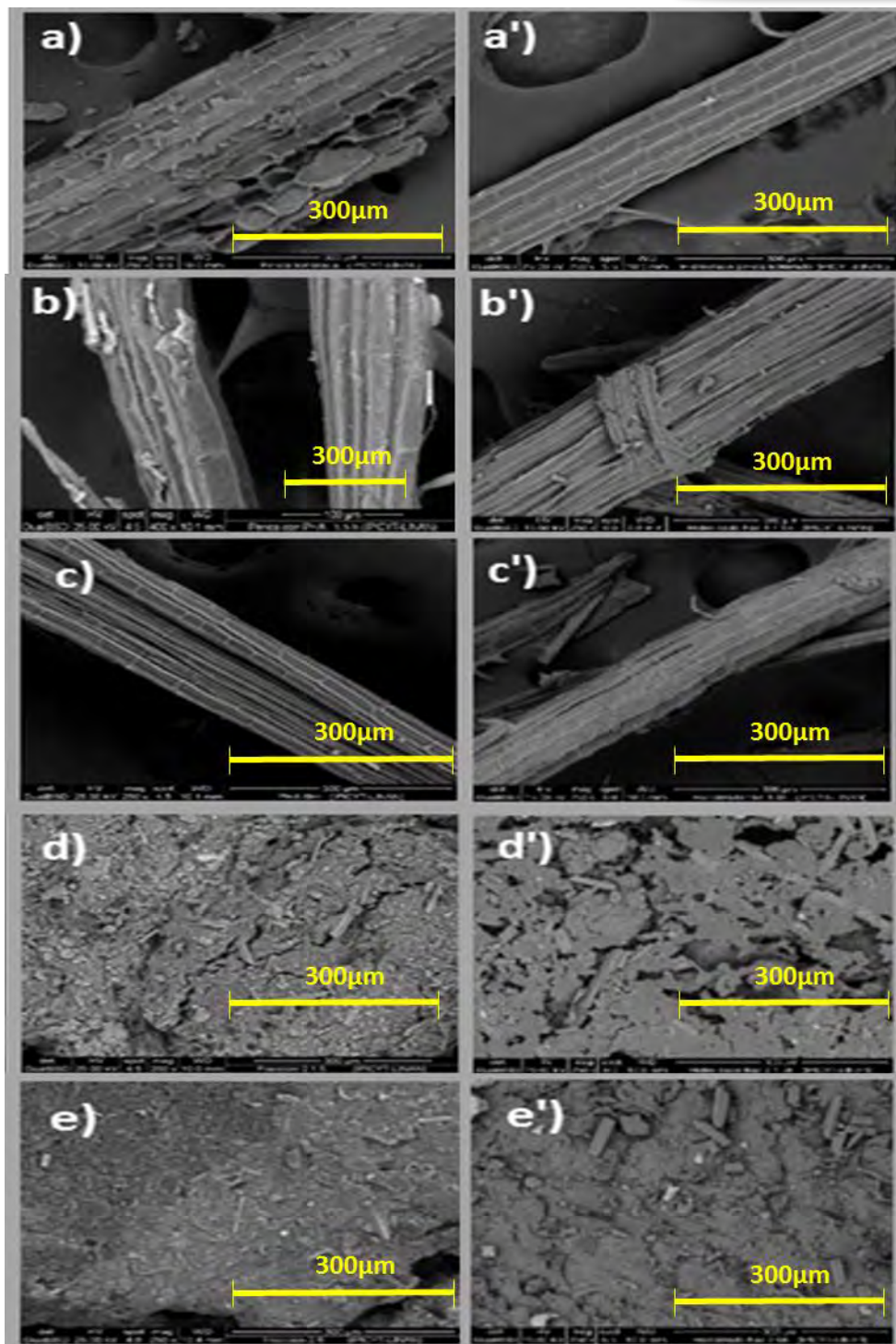


Fig. 3.27. Micrografías de la penca liofilizada sin ningún pretratamiento (a), penca liofilizada sometida a hidrólisis enzimática (a'), fracción 1 con PHA a 1.5 h sin hidrólisis enzimática (b) y con hidrólisis enzimática (b'), fracción 1 con PHA a 6 h sin hidrólisis (c) y con hidrólisis enzimática (c'), fracción 2 con PHA a 1.5 h sin hidrólisis enzimática (d) y con hidrólisis enzimática (d') y la fracción 2 con PHA a 6h sin hidrólisis enzimática (e) y con hidrólisis enzimática (e').

Las estructuras remanentes de la fracción 1 con PHA a 1.5 h (Fig. 3.27-b') fueron las que mostraron un cambio morfológico mayor, comparado con la fracción 1 con PHA a 1.5 h sin hidrolisis enzimática (Fig. 3.27-b), debido a que las enzimas lograron acceder a tejidos más cercanos al centro de la fibra. Esto probablemente se debe a que esta fracción fue la que tuvo un mayor grado de deslignificación, por lo que la disponibilidad de azúcares fue mayor. Por el contrario, en la Fig. 3.27-a', la fibra muestra menos cambios morfológicos ya que las enzimas tuvieron menor disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa debido a la presencia de lignina en la penca liofilizada sin pretratamiento.

En la Fig. 3.27 también se observan las micrografías de la fracción 2 a 1.5h sin hidrolizado enzimático (Fig. 3.27-d) y después del hidrolizado (Fig. 3.27-d'). Así mismo, también se muestran las micrografías de la fracción 2 del pretratamiento con PHA a 6 h antes (Fig. 3.27-e) y después (Fig. 3.27-e') del hidrolizado enzimático. Los cambios morfológicos de ambos experimentos (antes y después de la hidrolisis enzimática) no son tan evidentes como en la fracción 1. Sin embargo, se pueden observar cavidades mayores en la fracción 2 después de la hidrólisis. Esto posiblemente se deba al consumo de los tejidos de parénquima que estaban disponibles y que pudieron ser consumidos por las enzimas.

3.4.2.2. Producción de biohidrógeno de los hidrolizados

Los hidrolizados de la penca liofilizada (PL), la fracción 1 con PHA a 1.5 h (F1E1), la fracción 1 con PHA a 6 h (F1E2) y la fracción 2 con PHA a 6 h (F2F2), se sometieron a ensayos de producción de biohidrógeno en lote (Fig. 3.28). Cabe mencionar que la fracción 2 con PHA a 1.5 h no se sometió a este ensayo debido a que ya no había muestra suficiente. Los rendimientos molares de producción de biohidrógeno (RMPH) se muestran en la Tabla 3.10. En dicha tabla se puede observar que el RMPH de los hidrolizados obtenidos de F1E1, F1E2, y F2E2 fueron similares o mayores que el RMPH del control de glucosa y aproximadamente 2 veces mayores que el RMPH del hidrolizado de la penca liofilizada. Esto sugiere que el pretratamiento fue favorable para la producción de biohidrógeno, ya que se observó en este trabajo la disponibilidad de celulosa y hemicelulosa después de

este pretratamiento, lo cual se vio reflejado en la mejora de los rendimientos de sacarificación y finalmente, en la de producción de biohidrógeno. De la misma forma, los valores de VVPH alcanzados por los hidrolizados de las fracciones 1 y 2 fueron aproximadamente 2 veces más altas que las alcanzados por el hidrolizado de la penca liofilizada. Esto puede deberse a que las fracciones F1E1, F1E2 Y F2E2 mostraron la mayor deslignificación y enriquecimiento de celulosa en el pretratamiento con PHA. Así mismo, fueron las fracciones de donde se obtuvieron mayores rendimientos de sacarificación durante la hidrólisis enzimática.

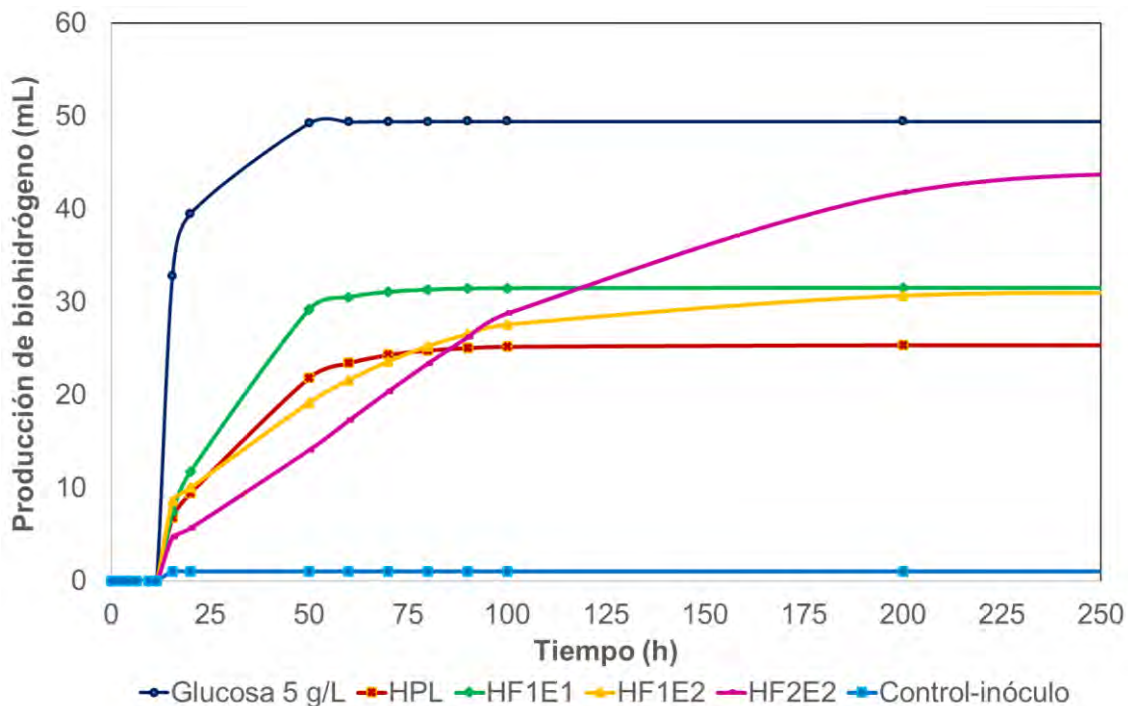


Fig. 3.28. Producción acumulada de biohidrógeno en lote de los hidrolizados de penca entera y fracciones 1 y 2 obtenidas del pretratamiento de la penca con PHA a 1.5 y 6h.

Los valores de RMPH de los hidrolizados de las fracciones 1 y 2 son mayores a los reportados para otros sustratos pretratados como el de la paja de trigo con un pretratamiento ácido, donde el rendimiento del hidrolizado ácido fue de 0.96 mol H₂/mol sustrato (Chang *et al.* 2011). Sin embargo, son semejantes a los reportados por Abreu-Sherrer (2.63 mol H₂/mol AT consumido), donde se realizó una hidrólisis ácida en bagazo de agave. Es importante mencionar que los RMPH reportados en este trabajo tienen una contribución debida a la producción de biohidrógeno a partir

de la preparación enzimática como ya fue reportado por Arreola-Vargas (2015). Debido a esto se evaluó la contribución de la preparación enzimática a la producción de hidrógeno y se corrigieron los valores de RMPH. Los valores corregidos se reportan también en la Tabla 3.10. Dichos rendimientos son menores que el control de glucosa, lo cual indica un posible efecto inhibitorio. Por otra parte, los rendimientos corregidos son semejantes a los reportados por López-Gutiérrez (2015) para hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana* sin ningún pretratamiento.

Tabla 3.9. Producción en lote de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de la penca liofilizada sin pretratamiento y de los hidrolizados de las fracciones obtenidas del pretratamiento con PHA.

Fracción de la penca	AT (g/L)	pH final	Hmax (mL·H ₂)	VVPH (mL H ₂ /L-h)	RMPH (mol H ₂ /mol AT consumido)	RMPH ^{CORR} (mol H ₂ /mol AT consumido)	RPH (mmolH ₂ /g fibra)
Penca liofilizada (HPL)	4.03	6.5±0.2	25.36±3.2	49.48±4.9	1.42±0.1	-	1.34
Fracción 1 con PHA a 1.5 h (HF1E1)	4.30	6.1±0.3	35.10±2.7	83.93±16.5	2.67±0.3	1.21±0.3	5.62
Fracción 1 con PHA a 6 h (HF1E2)	4.14	6.3±0.2	31.50±4.2	74.08±13.3	2.30±0.2	0.84±0.2	3.22
Fracción 2 con PHA a 6 h (HF2E2)	6.06	6.2±0.1	44.49±6.0	93.03±8.2	2.96±0.3	1.5±0.3	6.64
Control-glucosa 5 g/L	5.00	5.9±0.2	49.43±1.2	70.52±5.3	2.25±0.2	-	-
Control-Inóculo	-	6.5±0.3	3.21±0.2	2.75±0.2	0.09±0.3	-	-

RMPH^{CORR} se estimó eliminando la aportación del Celluclast 1.5L para la producción de biohidrógeno. **RPH** se estimó a partir del RMPH^{CORR} y expresándolo por gramo de fibra en la penca o en las fracciones 1 y 2. Hmax y **VVPH** se obtuvieron del ajuste del modelo de Gompertz.

Los rendimientos más altos de producción de biohidrógeno expresados por mol de AT (RMPH, Tabla 3.9) se obtuvieron con los hidrolizados de las fracciones 1 y 2, aunque en dichos rendimientos hay una contribución del biohidrógeno producido a partir de la enzima. Cuando esta contribución se corrige (RMPH^{CORR}, Tabla 3.9) los rendimientos molares son iguales o menores incluso que el obtenido con la penca entera liofilizada. Sin embargo, cuando los rendimientos de producción de biohidrógeno son expresados por gramo de fibra, en la penca sin tratar o en las fracciones obtenidas después del pretratamiento con PHA (RPH, Tabla 3.9) se puede observar que para el hidrolizado de la F1E1 el RPH fue mayor 4.19 veces comparado con el de la PL. En tanto que el RPH de F1E2 fue mayor 2.4 veces comparado con el de la PL. Incluso, el hidrolizado de la fracción 2 mostró un RPH

4.95 veces mayor que el hidrolizado de PL. Este incremento en el rendimiento de producción de biohidrógeno se debe a que las fibras presentes en las fracciones 1 y 2 están enriquecidas en celulosa y hemicelulosa en comparación con la fibra presente en la peca sin tratar. Por lo tanto, la deslignificación de la peca con el pretratamiento con PHA tuvo un efecto positivo en la mejora de los rendimientos de producción de biohidrógeno. Cabe mencionar que es necesario realizar una optimización del pretratamiento con el fin de obtener mejores rendimientos de producción de biohidrógeno.

La peca entera liofilizada sin ningún tratamiento (Tabla 3.8) tuvo un rendimiento de producción de biohidrógeno de 0.0574 mmol H₂/g de peca entera liofilizada, en tanto que las fracciones 1 pretratadas con PHA e hidrolizadas tuvieron un rendimiento de producción de biohidrógeno de 5.62 mmol H₂/ g de F1E1 y 3.22 mmol H₂/ g F1E2 (Tabla 3.9). Comparando los rendimientos de la peca entera liofilizada sin ningún pretratamiento y la F1E1, la producción de biohidrógeno incremento cerca de 98 veces. Por lo tanto, el efecto que tuvo la deslignificación con PHA produjo un mayor enriquecimiento de celulosa lo que permitió una mayor sacarificación y contribuyó a la mejora de los rendimientos de producción de biohidrógeno.

Comparando la cantidad de biohidrógeno acumulado (H_{max}) de la F1E1 (fracción con el mejor rendimiento respecto a las fracciones recuperadas en el pretratamiento con PHA) y el de la glucosa, la glucosa obtuvo una mayor cantidad debido a que este es un sustrato modelo. Sin embargo, los rendimientos de producción de biohidrógeno son mayores en la F1E1, lo que sugiere que este sustrato tiene potencial para la producción de biohidrógeno, aunque aún es necesario optimizar el proceso y tratar de obtener una cantidad de producción de biohidrógeno cercana a los rendimientos teóricos (4 mol H₂/mol de hexosa).

Capítulo 4.- Conclusiones y perspectivas

4.1. Conclusiones

1. De las tres fracciones en las que fue dividida la penca (cutícula, epidermis y fibra), la fibra es la fracción que contribuye mayormente a la producción de biohidrógeno debido a que es la fracción con mayor cantidad de celulosa y hemicelulosa. Por otra parte, la penca entera secada a 60°C y la penca entera liofilizada tuvieron rendimientos de producción de biohidrógeno similares, lo que indica que el proceso de liofilización no tiene un impacto severo sobre la estructura química de la penca.
2. Los resultados del pretratamiento con PHA de la penca entera liofilizada indicaron que, la mayor remoción de lignina, el enriquecimiento más alto de celulosa y la mayor sacarificación se obtuvieron cuando se utilizó peróxido de hidrógeno al 2%, con pH de 11.5, sin previo hinchamiento y a un tiempo de contacto de 1.5 h.
3. De acuerdo con los análisis de SEM, XRD y microscopía óptica, el pretratamiento con PHA contribuyó principalmente a la remoción del parénquima, xilema y vainas. Este tipo de estructuras se encuentran constituidas principalmente por hemicelulosa (parénquima) y lignina (xilema y vainas) los cuales son oxidados por el PHA. Las micrografías de las fibras remanentes después del pretratamiento, mostraron estructuras en las que están presentes la celulosa y hemicelulosa remanente. Estas estructuras corresponden a floema, parénquima y algunas estructuras lignificadas como vainas y xilema que no se logran oxidar. Por otra parte, en las micrografías de las fracciones remanentes de la hidrólisis enzimática aún quedó una fracción importante de esta fibra.
4. De acuerdo con los resultados de TGA, FT-IR y XRD la fracción 2 está enriquecida en hemicelulosa y la fracción 3, en lignina. Sin embargo, en la fracción 1 se recupera el mayor porcentaje de celulosa y hemicelulosa comparado con la fracción 2, por lo que la fracción 1 sería la más adecuada para un proceso de sacarificación a escala industria.

5. La mayor concentración de azúcares totales obtenida en la sacarificación enzimática se obtuvo de la fracción 1 del pretratamiento con PHA a 1.5 h, con un incremento de 5 veces mayor comparada con la sacarificación enzimática de la penca entera liofilizada sin ningún pretratamiento.
6. El rendimiento de producción de hidrógeno del hidrolizado enzimático de la fracción 1 del pretratamiento con PHA a 1.5 h (6.64 mmoles H₂/g de fracción 1) fue 4.57 veces mayor que el obtenido con el hidrolizado enzimático de la penca entera liofilizada sin pretratamiento.

4.2. Perspectivas

1. Es necesario determinar los factores que permitan obtener mejores rendimientos de deslignificación y de enriquecimiento de celulosa durante el pretratamiento con PHA de la penca, con el fin de lograr el mayor aprovechamiento del material lignocelulósico presente en la penca. Así como una optimización de la sacarificación con el fin de obtener la mayor cantidad de azúcares disponibles para la producción de biohidrógeno.
2. También es importante evaluar la producción de biohidrógeno en continuo a partir de penca previamente tratada con PHA y sometida a una hidrólisis enzimática.
3. Sería conveniente evaluar pretratamientos que ayude a la remoción de hemicelulosa (hidrólisis ácida o enzimáticas) previas al pretratamiento de la penca con PHA para determinar si se incrementa la remoción de lignina. Esto probablemente mejoraría la sacarificación enzimática.
4. Para entender mejor el mecanismo de oxidación llevado a cabo durante el pretratamiento con PHA, es necesario el análisis químico de los diferentes compuestos constituyentes de la lignina (siringaldehído, vainillina, entre otros).
5. La formación de compuestos fenólicos se lleva a cabo durante la oxidación de la lignina y estos pueden generar un efecto inhibitorio para la producción de biohidrógeno. Por lo que es necesario realizar un análisis de éstos componentes y determinar si son compuestos que afectan o no a la producción de biohidrógeno.

Fuentes de información

1. **Abreu Sherrer, J. S. (2013).** Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de biohidrógeno. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, A.C. SLP, México.
2. **Achyuthan K. E, Achyuthan A. M, Adams P. D, Dirk S. M, Harper J. C, Simmons B. A, Singh A. K. (2010).** Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. *Molecules* (15) 8641-8688.
3. **American Public Health Association (APHA) (1998).** Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a ed. Pag. 2-59
4. **American Public Health Association (APHA) (2005).** Standard methods for the examination of water and wastewater. 21a ed. Washington, D.C.
5. **Ammalahti, E., Brunow, G., Bardet, M., Robert, D., Kilpelainen, I., (1998).** Identification of side-chain structures in a poplar lignin using three-dimensional HMQC-HOHAHA NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5113–5117.
6. **Argun, H. & Kargi, F.(2011).** “Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview”. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 36, Issue 13, pp. 7443-7459.
7. **Aro, N., Pakula, T., Penttila, M. (2005).** Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 719–739.
8. **Arreola-Vargas, J., Celis, L. B., Buitrón, G., Razo-Flores, E., & Alatríste-Mondragón, F. (2013).** Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(32), 13884-13894.
9. **Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., Celis, L. B., & Alatríste-Mondragón, F. (2015).** Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: role of hydrolysates constituents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 10756-10765.
10. **Ayeni, A. O., Hymore, F. K., Mudliar, S. N., Deshmukh, S. C., Satpute, D. B., Omoleye, J. A., & Pandey, R. A. (2013).** Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: Process parameters optimization using response surface methodology. *Fuel*, 106, 187-194.
11. **Azzam, M. (1989).** Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health B.* 24 (4), 421–433.
12. **Baldrian, P. & Valaskova, V. (2008).** Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.
13. **Bedoya, A., Castrillón, J.C., Ramírez, J.E., Vásquez, J.E., y Zabala, M.A. (2007).** Biological production of hydrogen: a literature survey. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. *Dyna.*154:137-157.

14. **Blanco Londoño, S. A., & Rodríguez Chaparro, T. (2012).** Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 20, 398-411.
15. **Borchani, K. E., Carrot, C., and Jaziri, M. (2015).** Untreated and alkali treated fibers from Alfa stem: effect of alkali treatment on structural, morphological and thermal features, *Cellulose* 22, 1577-1589.
16. **Bradford M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* (72) 248-254.
17. **Cakir, A., Ozmihci, S. and Kargi, F. (2010).** Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35:13214-13218.
18. **Carrier, M., Loppinet-Serani, A., Denux, D., Lasnier, J. M., Ham-Pichavant, F., Cansell, F., & Aymonier, C. (2011).** Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 298-307.
19. **Cervantes, F. J., Pavlostathis, S. G., & Van Haandel, A. C. (Eds.). (2006).** Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters: principles and applications. IWA publishing.
20. **Chang, A. C., Tu, Y. H., Huang, M. H., Lay, C. H., & Lin, C. Y. (2011).** Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *International journal of hydrogen energy*, 36(21), 14280-14288.
21. **Chen, W., Tseng, Z., Lee, K. and Chang, J. (2005).** Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30:1063-1070.
22. **Cui, M., Zhuilang, Y., Xiaohua, Z., Liling, W. and Jianquan, S. (2010).** Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* .35: 4041-4047.
23. **Dubois, M., Gilles, K., A., Hamilton, J., K., Rebers, P., A, Smith, F., (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28:3:350-356.
24. **El Mansouri, N. E., & Salvadó, J. (2007).** Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 116-124.
25. **Esau, K. (1985).** Anatomía vegetal. Ed. Omega. Barcelona. 25-26.
26. **Fengel, D. y Wegener, G. Wood (1989).** Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Ed. Walter de Gruyter. Berlin, Germany. 1989. pp. 1-549.
27. **Ferry, L., Dorez, G., Taguet, A., Otazaghine, B., & Lopez-Cuesta, J. M. (2015).** Chemical modification of lignin by phosphorus molecules to improve the fire behavior of polybutylene succinate. *Polymer Degradation and Stability*, 113, 135-143.
28. **Fink, H., Krettek, A., & Sellborn, A. (2012).** *Molecular Understanding of Endothelial Cell and Blood Interactions with Bacterial Cellulose: Novel Opportunities for Artificial Blood Vessels*. INTECH Open Access Publisher.

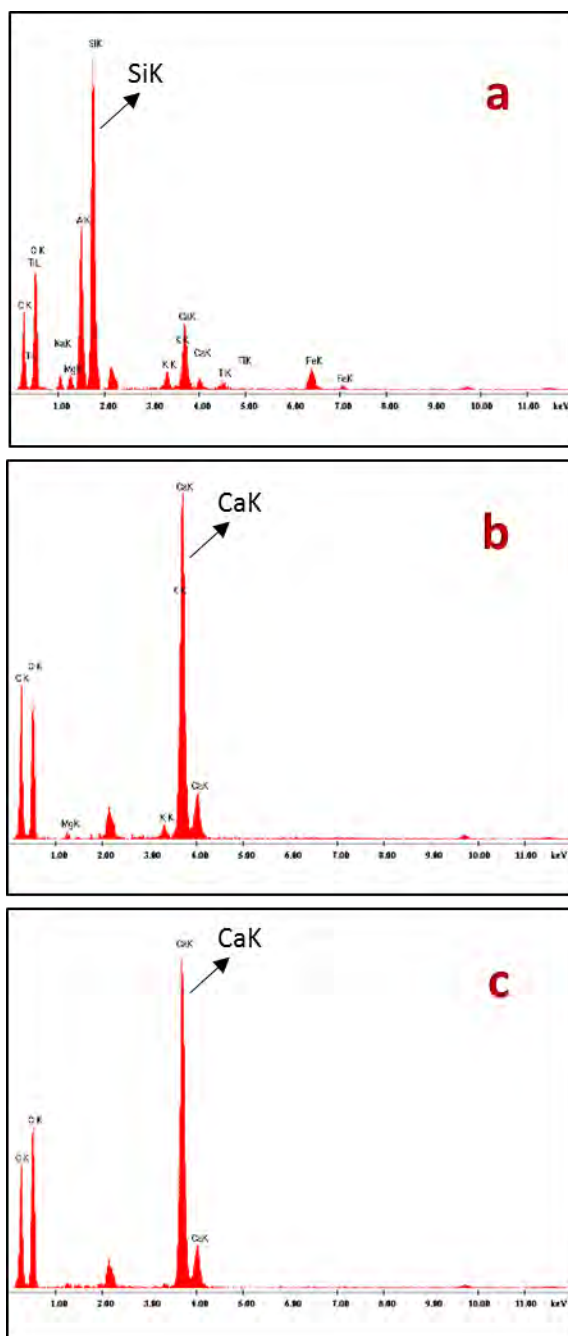
29. Gärtner, A., & Gellerstedt, G. (2000). Oxidation of residual lignin with alkaline hydrogen peroxide. Part I: Changes in hydrophilic groups. *Journal of pulp and paper science*, 26(12), 448-454.
30. González-García, Y., González-Reynoso, O., Nungaray-Arellano, J. (2005). Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *E-Gnosis* [online], 3, 14.
31. Gould, J.M., 1985. Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen-peroxide. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 893–896.
32. Guggenberger, G., Christensen, B. T., & Zech, W. (1994). Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. Lignin and carbohydrate signature. *European Journal of Soil Science*, 45(4), 449-458. doi: 10.1111/j.1365-2389.
33. Guilherme, A. A., Dantas, P. V. F., Santos, E. S., Fernandes, F. A. N., & Macedo, G. R. (2015). Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 23-33.
34. He, Z., Yang, Y., & Ni, Y. (2008). Comparison of oxalate formation in peroxide bleaching of softwood and hardwood mechanical pulps. *Journal of Pulp and Paper Science*, 34(3), 153.
35. Ibbett, R., Domvoglou, D. and Phillips, D., (2008). The Hydrolysis and Recrystallisation of Lyocell and Comparative Cellulosic Fibres in Solutions of Mineral Acid, *Cellulose* 15, 241-254.
36. Jáuregui-Zuñiga, D. A. V. I. D., & Moreno, A. (2004). La biomineralización del oxalato de calcio en plantas: retos y potencial. *REB*, 23(1), 18-23.
37. Keys, J.E., Van Soest, P.J. & Young, E.P. (1969). Comparative study of the digestibility of forage cellulose and hemicellulose ruminants' and nonruminants. *Journal of Animal Sciences*. 29,11-15.
38. Kim, T. H., Taylor, F., & Hicks, K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology*, 99(13), 5694-5702.
39. Klemm D, Schmauder H, Heinze T, (2002) **Cellulose**. In *Biopolymers: Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications*; Vandamme, E., DeBaets, S., Steinbchel, A., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 275.
40. Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res*; 48:3713-29.
41. Le Troedec, M., Sedan, D., Peyratout, C., Bonnet, J. P., Smith, A., Guinebriere, R., ... & Krausz, P. (2008). Influence of various chemical treatments on the composition and structure of hemp fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(3), 514-522.
42. 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. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, A.C. SLP, México.

43. **Martín, I., Sanz, J.L. & Amils, R. (2014).** *Biotecnología y medioambiente*. ISBN, Editorial Ephemera. 2: 215-232.
44. **Miller, G., L., (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
45. **Nath, K. and Das, D. (2004).** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:520-529.
46. **Oh SY, Yoo DI, Shin Y, Kim HC, Kim HY, Chung YS, Park WH, Youke JH (2005)** Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydr Res* 340:2376–2391.
47. **Perez-Pimienta J. A, López-Ortega M. G, Chavez-Carvayar J. A, Varanasi P, Stavila V, Cheng G, Singh S, Simmons B. A. (2015).** Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *Biomass and Bioenergy* (75) 180-88.
48. **Phitsuwan, P., Sakka, K., & Ratanakhanokchai, K. (2013).** Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy*, 58, 390-405.
49. **Popescua CM, Larsson PT, Olaru N, Vasile C (2012)** Spectroscopic study of acetylated kraft pulp fibers. *Carbohydr Polym* 88:530–536.
50. **Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J. and Gao L(2009).** Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnol Adv*; 27:1051-60.
51. **Rostro Alanís, M. D. J. (2014).** Obtención y caracterización química de arabinoxilooligosacáridos a partir de pericarpio de maíz nixtamalizado y determinación de la actividad prebiótica y actividad antioxidante (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
52. **Saha, B.C. & Cotta, M. A. (2008).** Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 32, 971–977.
53. **Shankar, S., Reddy, J. P., & Rhim, J. W. (2015).** Effect of lignin on water vapor barrier, mechanical, and structural properties of agar/lignin composite films. *International journal of biological macromolecules*, 81, 267-273.
54. **Sieminski, A. (2014).** *International Energy Outlook*.
55. **Silva, M. C., Lopes, O. R., Colodette, J. L., Porto, A. O., Rieumont, J., Chaussy, D., ... & Silva, G. G. (2008).** Characterization of three non-product materials from a bleached eucalyptus kraft pulp mill, in view of valorising them as a source of cellulose fibres. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 288-295.
56. **Sinha, P. & Pandey, A.(2011).** “An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production”. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36: 7460-7478.
57. **Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S. K., Boschung, J., ... & Midgley, B. M. (2013).** IPCC, 2013: climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
58. **Streffer, F.(2014).** Lignocellulose to Biogas and other Products. *JSM Biotechnol Bioeng* 2(1): 1023.

59. Su, Y., Du, R., Guo, H., Cao, M., Wu, Q., Su, R.,...He, Z. (2015). Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 322-330.
60. Sun, R. C., Sun, X. F., Fowler, P., & Tomkinson, J. (2002). Structural and physico-chemical characterization of lignins solubilized during alkaline peroxide treatment of barley straw. *European Polymer Journal*, 38(7), 1399-1407.
61. Sun, R. C., Fang, J. M., & Tomkinson, J. (2000). Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. *Industrial Crops and Products*, 12(2), 71-83.
62. Tafolla-Arellano, Julio C.; Tiznado-Hernández, Martín E.; González-León, Alberto; Báez-Sañudo, Reginaldo; Zacarías García, Lorenzo; (2013). COMPOSICIÓN, FISIOLÓGIA Y BIOSÍNTESIS DE LA CUTÍCULA EN PLANTAS. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 3-12.
63. Taherzadeh, M. y Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal Molecular Science*, 9, 1621-1651.
64. Terinte, N., Ibbett, R., & Schuster, K. C. (2011). Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques. *Lenzinger Berichte*, 89, 118-131.
65. Vázquez, G., Antorrena, G., González, J., Freire, S., (1997). The influencing of pulping conditions on the structure of acetosolv eucalyptus lignins. *J. Wood Chem. Technol.* 17 (1 and 2), 147–162.
66. Wattendorff, J. & P.J. Holloway. 1980. Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles: The cuticular membrane of *Agave Americana* L. in situ: *Ann. Bot.* 46:13-28.
67. Wilkinson, S., Smart, K. A., & Cook, D. J. (2014). Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 62, 219-227.
68. Xiang, Q., and Lee, Y. Y. (2000). Oxidative cracking of precipitated hardwood lignin by hydrogen peroxide, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84, 153-162.
69. Xu, Z., Wang, Q., Jiang, Z., Yang, X. X., & Ji, Y. (2007). Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. *Biomass and Bioenergy*, 31(2), 162-167.
70. Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12), 1781-1788.
71. Zhang, T., Liu, H. and Fang, H. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition". *Journal of Environmental Management*. 69: 149-156.

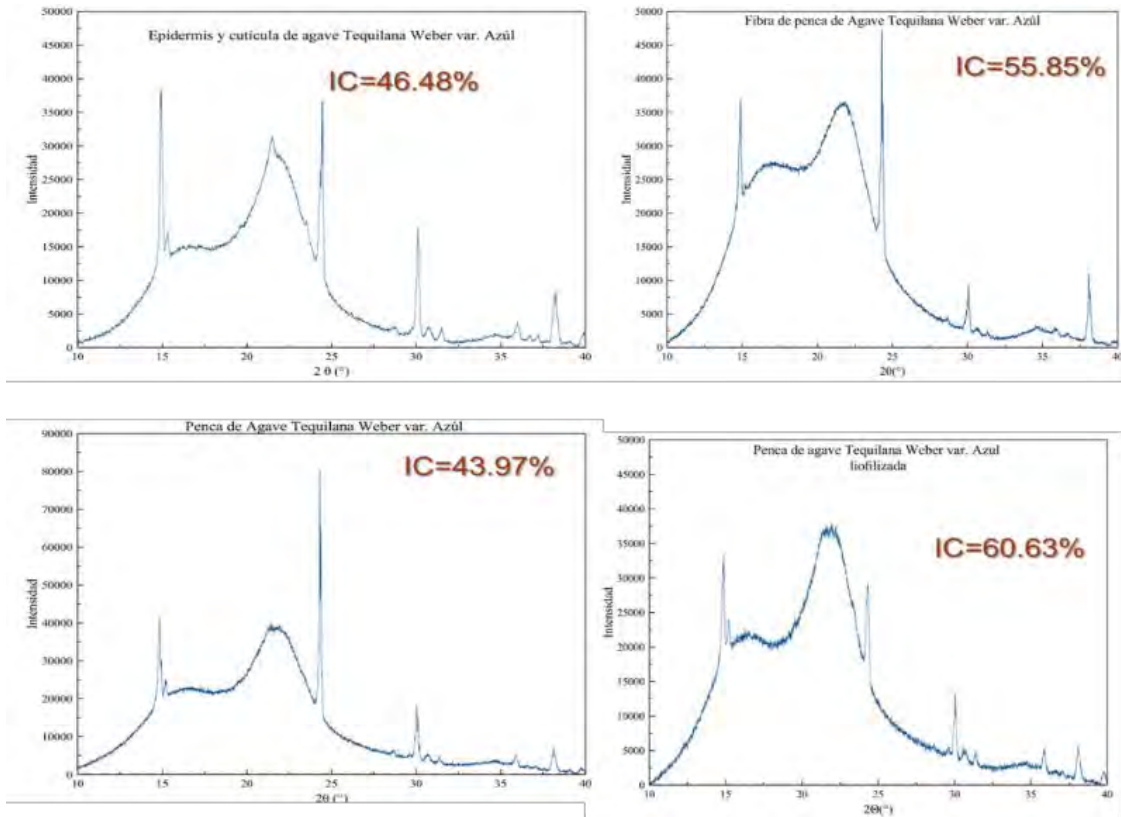
Anexos

Anexo A.- EDS correspondientes a las micrográficas de la Fig. 3.7.



a) EDS de los oxalatos de calcio monohidratados en forma de rafidios. b) EDS de oxalato de calcio monohidratado en forma de estiloide. c) EDS del silicato.

Anexo B.- Difractogramas de la penca entera y sus fracciones.



Anexo C.-Balance de masa para el pretratamiento de penca con PHA a 1.5 h (a) y PHA a 6h (b) en base al método de Van Soest.

a) Balance de masa de las fracciones recuperadas durante el pretratamiento con PHA 2% (1.5h)							
Penca liofilizada		Tratamiento con PHA	Sólidos recuperados del pretratamiento con PHA				
Composición química (g)			Fracción 1 (Masa recuperada: 105.85g)				
Compuestos solubles	99.75		Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Cenizas (g)	Compuestos solubles (g)
			48.88	7.64	9.76	0.39	38.90
Celulosa	34.85		Fracción 2 (12.12g)				
			Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Cenizas (g)	Compuestos solubles (g)
			0.60	2.14	0.06	0.04	9.25
Hemicelulosa	8.94		Fracción 3 (1.63g)				
			Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Cenizas (g)	Compuestos solubles (g)
			0.018	0.004	0.021	0.000	1.586
Lignina	5.61	Masa recuperada: 119.6 (g)		Masa perdida: 30.4 (g)			
Cenizas	0.42						
Toltal	150 g						

b) Balance de masa de las fracciones recuperadas durante el pretratamiento con PHA 2% (6h)							
Penca liofilizada		Tratamiento con PHA	Sólidos recuperados del pretratamiento con PHA				
Composición química (g)			Fracción 1 (121.47g)				
Compuestos solubles	99.75		Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Cenizas (g)	Compuestos solubles (g)
			51.36	11.99	16.9815	0.7653	40.04
Celulosa	34.85		Fracción 2 (16.92g)				
			Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Cenizas (g)	Compuestos solubles (g)
			0.499	2.680	0.056	0.046	13.590
Hemicelulosa	8.94		Fracción 3 (2.24g)				
			Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Cenizas (g)	Compuestos solubles (g)
			0.009	0.013	0.045	0.00024	2.173
Lignina	5.61	Masa recuperada: 140.63 (g)		Masa perdida: 9.37 (g)			
Cenizas	0.42						
Toltal	150 g						

Anexo D.- Balance de masa para el pretratamiento de pencea con PHA a 1.5 h (a) y a 6h (b) en base al análisis termogravimétrico.

a) Balance de masa de las fracciones recuperadas durante el pretratamiento con PHA 2% (1.5h)								
Pencea liofilizada		Tratamiento con PHA	Fracción 1					
Composición química (g)			Masa recuperada: 105.85g					
Humedad	5.17		Humedad (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Otros (g)	
			6.68	95.68	0.00	0.00	3.50	
Celulosa			45.49	Fracción 2				
Hemicelulosa			6.65	Masa recuperada: 12.12g				
Lignina			8.70	Humedad (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Otros (g)
				1.898	1.348	4.838	3.153	0.882
Otros			82.07	Fracción 3				
Total			150 g	Masa recuperada: 1.63g				
			Humedad (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Otros (g)	
			0.012	0.000	0.000	1.000	0.618	
			Total de masa recuperada:		119.6 (g)	Total masa perdida: 30.4 (g)		

b) Balance de masa de las fracciones recuperadas durante el pretratamiento con PHA 2% (6h)								
Pencea liofilizada		Tratamiento con PHA	Fracción 1					
Composición química (g)			Masa recuperada: 121.47 g					
Humedad	5.17		Humedad (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Otros (g)	
			3.34	70.41	2.81	0.21	44.71	
Celulosa			45.49	Fracción 2				
Hemicelulosa			6.65	Masa recuperada: 10.092 g				
Lignina			8.70	Humedad (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Otros (g)
				1.409	1.149	3.755	3.470	0.309
Otros			82.07	Fracción 3				
Total			150 g	Masa recuperada: 2.24 g				
			Humedad (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Lignina (g)	Otros (g)	
			0.019	0.000	0.000	1.502	0.720	
			Total de masa recuperada:		140.63 g	Total masa perdida: 9.37 g		

