



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SOBRE EL
BAGAZO DE LA PIÑA DE *AGAVE TEQUILANA* WEBER VAR.
AZUL PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ZAVALZA NAVARRETE LESLIE ELIZABETH



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Raúl Genaro Aguilar Caballero

VOCAL: Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: Mauricio Alberto Trujillo Roldán

1er.SUPLENTE: Maricarmen Quirasco Baruch

2do.SUPLENTE: Salgado Aguayo Alfonso Rafael

SITIO EN DONDE SE DERARROLLO EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas (Nueva sede), Unidad de Bioprocesos, Ciudad Universitaria, México, D.F.

Asesor del Tema:

Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán.

Sustentante:

Zavalza Navarrete Leslie Elizabeth

AGRADECIMIENTOS:

El presente proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. La dirección corrió a cargo del Dr, Mauricio Alberto Trujillio Roldán, contando con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528,181895 Y 104951-Z) y del Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT 209113, 210013).

Responsable de la UBP
Corresponsable de la UBP
Técnico
Técnico
Proyectos: CONACYT

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Unidad de Bioprocesos
Dr. Mauricio Alberto Trujillio Roldán
Ing. Abel Blancas Cabrera
M en C. Ramsés Ismael García Cabrera
P. M en B. Jesús Villegas Cruz
82533, 103393,181895 y 178528

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos. Porque su apoyo, consejos, regaños, cariño me hacen una mejor persona cada día. Catalina Navarrete Jiménez, Cesar Zavalza Ortiz, Jessica Miroslava Zavalza Navarrete y Carlos Miguel Zavalza Navarrete.

A mi familia. Por todo el apoyo que tengo de esos seres tan maravillosos que son todos ustedes: Tía Claudia, Cirilo, Yoceline, Jorge Luis, Tía Xochitl, Alfredo, Misael, Valentina, Tía Mariana, Jorge, Kevin, Sofía, Mariam, Raquel, Naim, Evelin, Javo, Tía Georgina, Luis, Sebastian, Claudia Xochitl, Abuelita Emma, Abuelito Amando, Tía Luisa, Tía Martha, Tía Cruz y familia, Tía María y familia, Tía Chavela, Karla, Cyntia, Gaby Domínguez, a mis sobrinos Sara y Yerick, Toño, Tía Laura, Andrea y Alfonso Álvarez, Tío Raymundo, Tía Graciela y Alejandro, Tío Alejandro, Rocío y Daniel, Tía Mayra, Toño, Cesar, Edgar y Fabiola Padrón, Tía Ileana, Tío Arturo, Kevin y Kare, Tía Alejandra, Tía Gaby, Tía Sonia, Prima Vanesa, Sobrina Ayelen, Abuelita Elizabeth y Abuelito Cesar.

A mis amigos. Gracias a todos por formar parte de mi vida por todo su apoyo en todos los momentos. Sin ustedes faltarían páginas en el libro de mi vida, los quiero mucho Leslie Cid, Gabriela Castillo, Paulina, Yanina y Brenda Arévalo, Victor Mendez, Carlos Bedoya, Alejandro Romero, Ixbalanque, Diego, Damaris, Caleb Estrada, Oscar Bautista, Ana, Fátima y Vicente Martínez, Mich y Omar Ocampo, Mario Valdespino, Jorge Rojas, Claudiss, Vicky y Victor Gordiano, Magali Sierra, Catalina, Julio, Carlos Robles, Jesús Antonio, Ulises, Armando, Cristina, Hilda, Fernanda Campos, Diana, Tortuga, Fatima, Bety, Alicia, Sughey, Jovani, Edmundo Palma, Stobac, Mota, Vianey, Brenda, Ixel, Sherezada, Sofia, Tania, Arochi, Sandra Ortega, Andrea Orozco, Andrea y Paula Romero, Tania Vázquez, Gabriela, Ivan, Adla Escobar, Mónica Morales, Roberto, Luis Angel, Roció Espinosa, Adrian Ayala, Pedro Duran, Jimena Contreras, Ludwig, Verence, Karla Elorza, Rodolfo Aguirre, Jaime Mancera y familia, Carlos de la Mora, Luis Gutiérrez, Adalid, Balam, Paulina, Gabriela, Eduardo Acevedo, Ing Abel Blancas, Jesús Villegas, Blanca, Christian Rico, Monserrate, Aurea Gutiérrez, Mikiztli Arias, Ulises, Daniel, Valeria, Deisy, Angeles, Irix, Andreita Castellanos, Andrea Bedoya, Ramses Gamboa, Ramses, Carlos Martínez, Arabia Leñero, Karen Carrasco, Pedro Navarro, Mafer.

Posdata: si falto tu nombre una disculpa pero sufro de pérdida de memoria a largo plazo así que no te preocupes porque seguro eres una persona muy importante para mí.

DEDICATORIA

Las horas se hacen largas sin tu presencia muchos momentos compartidos que nunca borrare de mi mente. En mi corazón se siembra cada día tú recuerdo esperando el momento de volver a estar contigo para darte muchos besos, abrazos y gracias por darme la oportunidad de aprender de ti.

Un día el universo me puso un reto muy grande en la vida como fue ver partir a una gran persona que amo siendo uno de los momentos más difíciles. En ese instante te hice una gran promesa “Nunca me voy a rendir, voy a luchar día con día para ser la mejor en cualquier cosa que realice en mi vida”. Después de sembrar con trabajo, esfuerzo y dedicación hoy cumplo una parte de esa promesa al concluir mi proyecto de tesis.

Si la muerte nos separo algún día nos volverá a unir gracias por todo lo que me dejaste, valores, amor, visión para crecer al lado de la gente que quiero y tantas cosas tan maravillosas que siempre están presentes en mi mente y acciones en mi vida.

En memoria de Alfonso Alvares Zavalza (primo), Edgar Padrón Zavalza (primo), Cesar Efrain Zavalza Ortega (abuelo), Carlos Chávez (amigo), Jovani (amigo), María (tía). Además dedico este trabajo a todas las personas que luchan y nunca se rinden que siempre salen adelante a pesar de las adversidades presentes en su camino.

Papá Cesar Zavalza Ortiz te amo mucho nunca me cansaría de decírtelo, eres mi templo, mi corazón, mi parte espiritual y formas parte de mi vida siempre.

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

ÍNDICE		Página
	Resumen.	1
	Introducción.	2
CAPÍTULO I	ANTECEDENTES	
1.1	Propiedades del <i>Agave tequilana</i> Weber var <i>Azul</i> .	3
1.2	El bagazo de piña de agave como material lignocelulósica para la producción de azúcares reductores.	5
	1.2.1 Usos del Bagazo de <i>agave tequilana</i> Weber var <i>Azul</i> .	5
1.3	Composición química de la biomasa lignocelulósica.	10
	1.3.1 Propiedades de la celulosa.	10
	1.3.2 Propiedades de la hemicelulosa.	11
	1.3.3 Propiedades de la lignina.	12
1.4	Pretratamiento del material lignocelulósico.	13
	1.4.1 Pretratamiento químico utilizando un catalizador ácido.	14
	1.4.2 Pretratamiento químico utilizando un catalizador alcalino.	15
	1.4.3 Compuestos inhibidores generados en los pretratamientos.	15
1.5	Hidrólisis enzimática.	16
	1.5.1 Mecanismo de acción del de las celulosas sobre enlaces β -glucosidicos.	17
	1.5.2 Interacción enzima-sustrato.	19
	1.5.3 Factores clave para una eficaz hidrólisis enzimática sobre material lignocelulósico.	19
	1.5.4 Microorganismos que degradan celulosa.	20
CAPÍTULO II	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
2.1	Hipótesis.	21
2.2	Objetivo general.	21
2.3	Objetivos particulares.	21
CAPÍTULO III	METODOLOGÍA	
3.1	Diagrama general.	22
3.2	Metodología descriptiva.	23
	3.2.1 Obtención del bagazo de agave.	23
	3.2.2 Determinación del contenido de humedad.	23
	3.2.3 Acondicionamiento de la materia prima.	23
	3.2.3.1 Lavado del bagazo de agave.	23
	3.2.3.2 Secado del bagazo de agave.	24
	3.2.3.3 Disminución del diámetro de partícula del bagazo de agave seco.	24
	3.2.4 Especificaciones para la hidrólisis enzimática.	24
	3.2.5 Especificaciones de los ensayos a evaluar.	25
	3.2.6 Evaluación de la temperatura en la hidrólisis enzimática.	27
	3.2.7 Evaluación del pH en la hidrólisis enzimática.	27
	3.2.8 Evaluación de diferentes diámetros de partícula en la hidrólisis enzimática.	29
	3.2.9 Evaluación de diferentes volúmenes del complejo enzimático en la hidrólisis enzimática.	29
	3.2.10 Evaluación para diferentes concentraciones de sustrato en la hidrólisis enzimática.	30
	3.2.11 Evaluación de la hidrólisis del bagazo de agave con pretratamiento para su posterior hidrólisis enzimática.	31
	3.2.12 Evaluación del pretratamiento con H ₂ SO ₄ diluido sobre el bagazo de agave.	33

3.2.13	Evaluación del pretratamiento con H ₂ SO ₄ concentrado sobre el bagazo de agave.	34
3.2.14	Evaluación del pretratamiento con NaOH diluido sobre el bagazo de agave.	35
3.2.15	Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) H ₂ SO ₄ .	36
3.2.16	Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) NaOH	37
3.2.17	Balance de materia para hidrólisis enzimática con pretratamiento (ácido y básico).	37
CAPÍTULO IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Determinación del contenido de humedad del bagazo de agave.	38
4.2	Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática.	38
4.3	Efecto del pH en la hidrólisis enzimática.	41
4.4	Efecto del diámetro de partícula en la hidrólisis enzimática.	43
4.5	Efecto de la adición de diferentes volúmenes del complejo enzimático en la hidrólisis enzimática.	45
4.6	Efecto de diferentes concentraciones de sustrato en la hidrólisis enzimática.	46
4.7	Pretratamiento con H ₂ SO ₄ para su posterior hidrólisis enzimática.	48
4.8	Balance de materia prima para el pretratamiento con 2.77% (v/v) de H ₂ SO ₄ .	52
4.9	Pretratamiento básico con NaOH para su posterior hidrólisis enzimática.	55
4.10	Balance de materia prima para el pretratamiento con 0.5% (p/v) de NaOH.	59
4.11	Efecto de la hidrólisis enzimática con pretratamiento H ₂ SO ₄ .	61
4.12	Balance de materia para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) de H ₂ SO ₄ .	63
4.13	Efecto de la hidrólisis enzimática con pretratamiento NaOH.	66
4.14	Balance de materia para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) de NaOH.	67
CAPÍTULO V	CONCLUSIONES	70
CAPÍTULO VI	PERSPECTIVAS	72
CAPÍTULO VII	ANEXO	73
7.1	Determinación de proteína para el complejo enzimático (Accellerase 1500).	73
7.2	Cuantificación de azúcares reductores con el método del ácido 3,5-dinitrolacílico.	73
7.3	Cuantificación de azúcares totales método Fenol-Sulfúrico.	74
7.4	Cálculo de la productividad volumétrica.	74
	Bibliografía.	75

**RESUMEN**

En México, en el territorio de denominación de origen del tequila, se generan grandes volúmenes de residuos en forma de bagazo y pencas de agave, desafortunadamente las posibilidades para su aprovechamiento son limitadas. Por ejemplo, se depositan en los campos de cultivo o se incineran, lo que conlleva su disposición final en problemas ecológicos. Este trabajo presenta un estudio cinético de hidrólisis enzimática sobre el desecho de la industria del tequila en forma de bagazo de agave, utilizando un complejo enzimático comercial (Accellerase® 1500 de Genencor) obtenido a partir de una cepa modificada genéticamente de *Trichoderma reesei*. El complejo degrada material lignocelulósico con actividad de *Endo-glucanasa* (2200-2800 CMC U/g) y *β-Glucosidasa* (525 -775 pNPG U/g).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de la piña de *Agave tequilana* Weber var. *Azul* para determinar las condiciones donde se obtiene la mayor productividad volumétrica a través de la utilización de dos estrategias: a) hidrólisis enzimática sin pretratamiento, b) hidrólisis enzimática con pretratamiento evaluando los catalizadores H₂SO₄ y NaOH. La mayor productividad volumétrica que se obtuvo para la primer estrategia experimental fue de 0.31 g/L h con un rendimiento de hidrólisis enzimática sin pretratamiento de 15.02%, bajo las condiciones del ensayo para la hidrólisis de 50°C, 96h, diámetro de partícula malla/ tamaño en pulgadas 40/ 0.0165 in, pH 4.8, buffer de acetatos 100 ml/ 0.05 M, dosificación del complejo enzimático 0.1 ml/g de bagazo seco, 150 rpm, 15 g de sustrato.

De acuerdo a la segunda estrategia experimental para la evaluación de los catalizadores H₂SO₄ y NaOH los resultados sugieren que la mayor productividad volumétrica se obtiene con la hidrólisis enzimática a 2.77% (v/v) de H₂SO₄ 0.31 g/L h con un rendimiento de hidrólisis enzimática con pretratamiento de 21.77%, bajo las condiciones de ensayo del pretratamiento a 121°C, 1h, 1.05Kg/cm², 2.77% (v/v) de H₂SO₄, seguido de la hidrólisis enzimática a 50°C, 96h, 0.1 (ml/g de bagazo) de complejo enzimático, 10g de sustrato, buffer de acetatos 100 ml/ 0.05 M



INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la superficie dedicada al cultivo del *Agave tequilana* Weber var. *Azul* destinada para la producción de tequila se encuentra delimitada por la denominación de origen en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Tamaulipas y Guanajuato. La continua y creciente demanda del tequila da lugar a la producción de 261 millones de litros anuales de esta bebida (González, 2005; Pinal, *et al.*, 2009; Consejo Regulador del Tequila., 2011). Aunado a este proceso de elaboración del tequila, se encuentra también la generación de residuos, estimada en 1.12×10^6 toneladas anualmente de bagazo de agave, siendo esta la fibra residual que queda después de cocinar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña de agave. Se considera que el 40% del peso total del agave consumido corresponde al bagazo residual (Saucedo, *et al.*, 2010; Iñiguez, *et al.*, 2001).

Hoy en día, se genera una mayor conciencia sobre temas ambientales principalmente una preocupación por el calentamiento global del planeta, por lo que, se promueve fuertemente el uso de recursos renovables. A nivel mundial se hacen diferentes convenciones referente al cambio climático, por ejemplo, el protocolo de Kioto creado en 1997 con el objetivo de estabilizar las emisiones de gases con efecto invernadero (CO_2 , CH_4 , N_2O , HFC, PFC, SF_6) (González., 2008). Uno de los recursos renovables que se genera en el planeta es el material lignocelulósico con una amplia variedad de usos potenciales para la obtención de metabolitos de interés por ejemplo; alcoholes, ácidos orgánicos, compostas, papel, combustible, hongos comestibles y alimento para animales (González, 2005).

La industria del tequila resolvería problemas de eliminación y confinamiento de residuos, al darle un valor agregado al bagazo de agave, brindando un sustrato de bajo costo, abundante y de naturaleza renovable (Saucedo, *et al.*, 2010). Es necesario crear un método de transformación sobre el bagazo de agave, que logre compensar las necesidades de la industria misma y de otras. Para lograrlo, es preciso evaluar las posibilidades de utilizar el bagazo de agave como una fuente de azúcares reductores para su posterior estudio en la fermentación y elaboración de etanol como producto de interés.

La modificación de parámetros fisicoquímicos y/o el uso de pretratamientos facilitan la hidrólisis del bagazo de la piña de agave que resulta del proceso de obtención del tequila permitiendo un aumento de la liberación de azúcares reductores. En esta tesis sólo se evaluaron los procesos de transformación del bagazo en la etapa de hidrólisis enzimática y no en las etapas posteriores para la obtención del etanol como metabolito de interés.



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Propiedades del *Agave tequilana* Weber var. *Azul*.

Las especies de *Agave* presentan una enorme importancia ecológica, económica y cultural en Norteamérica, especialmente en México donde existe una mayor diversidad de especies de este género (Valenzuela, 2003). Taxonómicamente, el género *Agave tequilana* Weber var *Azul* es clasificado como un miembro del grupo Rigidiae dentro del género *Agave* de la familia Agavaceae. En cuanto a las características físicas de este género sabemos que las pencas son de color verde azulado, llegando a medir más de 1 metro de largo (en plantas adultas) y terminan en una afilada espina de color marrón. En la Figura 1 se encuentran dos fotografías donde se aprecia una planta de agave y un campo de cultivo.



Figura 1. *Agave tequilana* Weber var *Azul* (Consejo Regulador del Tequila, 2009).

Las bebidas producidas con agave se pueden dividir en dos grandes grupos: las que se derivan del escurrimiento de azúcares luego del raspado de la piña; por ejemplo, el aguamiel y pulque, y aquellas que provienen del cocimiento de “cabezas o piña”, tallos y hojas del agave, para obtener destilados como el mezcal y el tequila (Valenzuela, 2003). Este agave es apropiado para la elaboración del tequila debido a la concentración de azúcares, bajo contenido de fibra y compuestos químicos que contribuyen al sabor final de la bebida alcohólica. El *Agave tequilana* Weber var *Azul* utilizado para elaborar el tequila se encuentra protegido por una denominación de origen y se siembra en los estados mencionados anteriormente. El Consejo Regulador del Tequila que es una institución de la Iniciativa Privada se encarga de controlar, estandarizar y modernizar la producción del tequila, así como salvaguardar su integridad y denominación de origen ante el mundo (Consejo Regulador del Tequila, 2012). Se describe brevemente en la Figura 2 el proceso de elaboración del tequila.

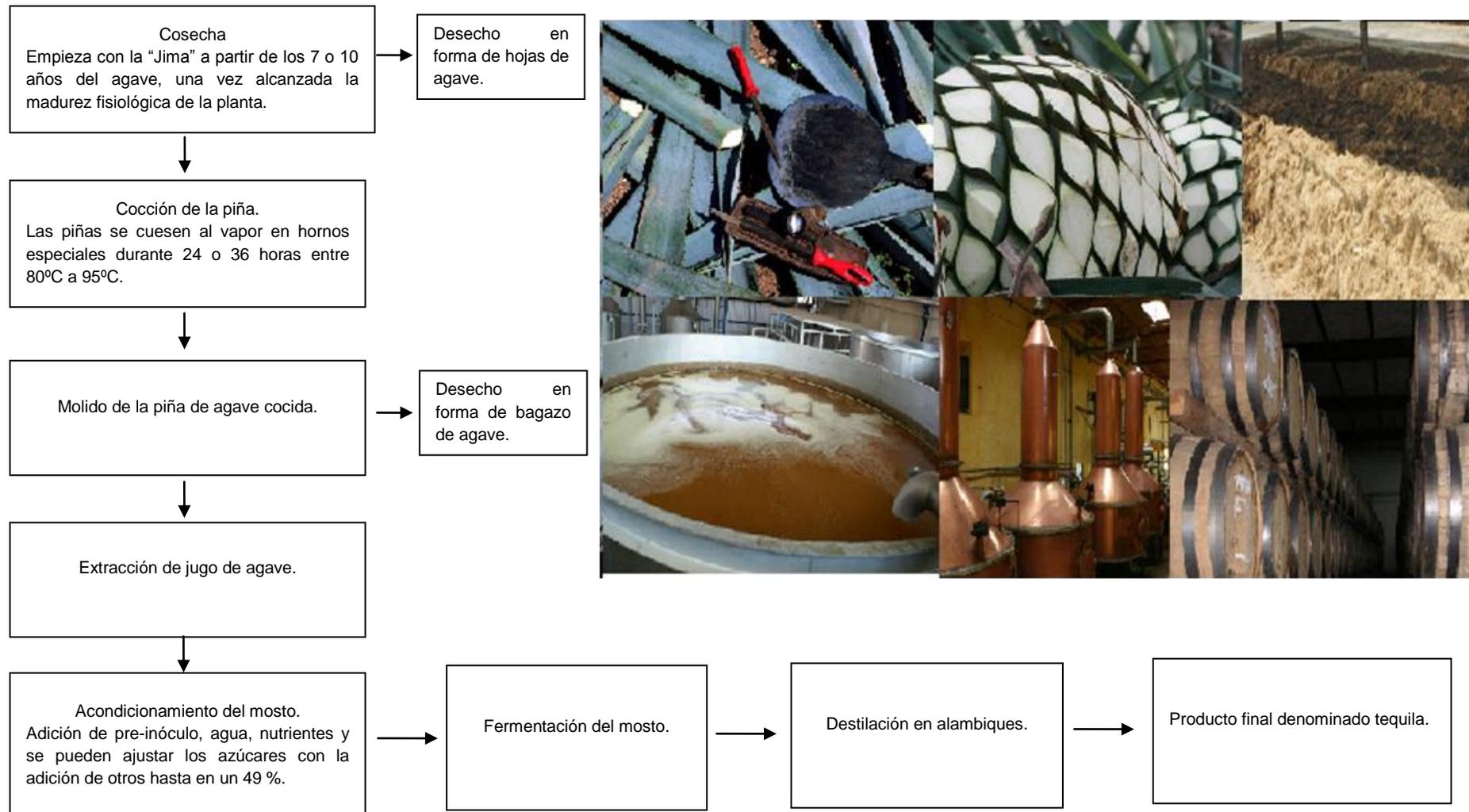


Figura 2. Proceso de elaboración del tequila (Concejo Regulador del Tequila, 2012).



1.2 El bagazo de agave como material lignocelulósica para la producción de azúcares reductores.

El bagazo de agave tequilero es la fibra residual que queda después de cocinar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña de agave (Iñiguez, *et al.*, 2001) con una composición en base seca: 42% de celulosa, 20% hemicelulosa, 15% lignina, nitrógeno total 3%, azúcares residuales 10% y otros compuestos 9%. (Saucedo, *et al.*, 2010). Se caracteriza por tener fibras gruesas de 10 a 12 cm de largo. En la Figura 3 se muestra el bagazo de agave después del proceso de extracción del jugo fermentable. El bagazo tiene una proporción de producción de 1.2 Kg de bagazo de agave por 1 L de tequila (Rosete, 2009).



Figura 3. Bagazo de *Agave tequilana* Weber var *Azul* (Tomado de Saucedo, *et al.*, 2011; Rosete, 2009).

De acuerdo a la empresa de donde se obtenga el bagazo de agave, éste presentará diferentes variaciones, por ejemplo: la concentración de azúcares residuales cambia de empresa a empresa, la forma en como se desecha el bagazo de la empresa, en algunas ocasiones, con una temperatura muy elevada por que la cocción fue el último de los procesos que aplicaron a la piña del agave, también puede salir con grandes cantidades de humedad, muy exprimido y/o enjuagado, ya que el último proceso por el cual pasó, fue un molino de rodillos que tritura los últimos residuos de la piña de agave para extraerle la mayor cantidad de jugos (Rosete, 2009).

1.2.1 Usos del bagazo de *Agave tequilana* Weber var *Azul*.

Los residuos lignocelulósicos representan una importante fuente de energía y productos químicos para la humanidad ver Figura 4. En general la mayor parte de estos residuos se disponen por incineración o a cielo abierto, provocando su acumulación excesiva y la proliferación de algunos animales indeseables como roedores, moscas, mosquitos entre otros. Representan además una fuente para el crecimiento de hongos y bacterias contribuyendo a un desequilibrio ecológico (Arroyo, 2010).

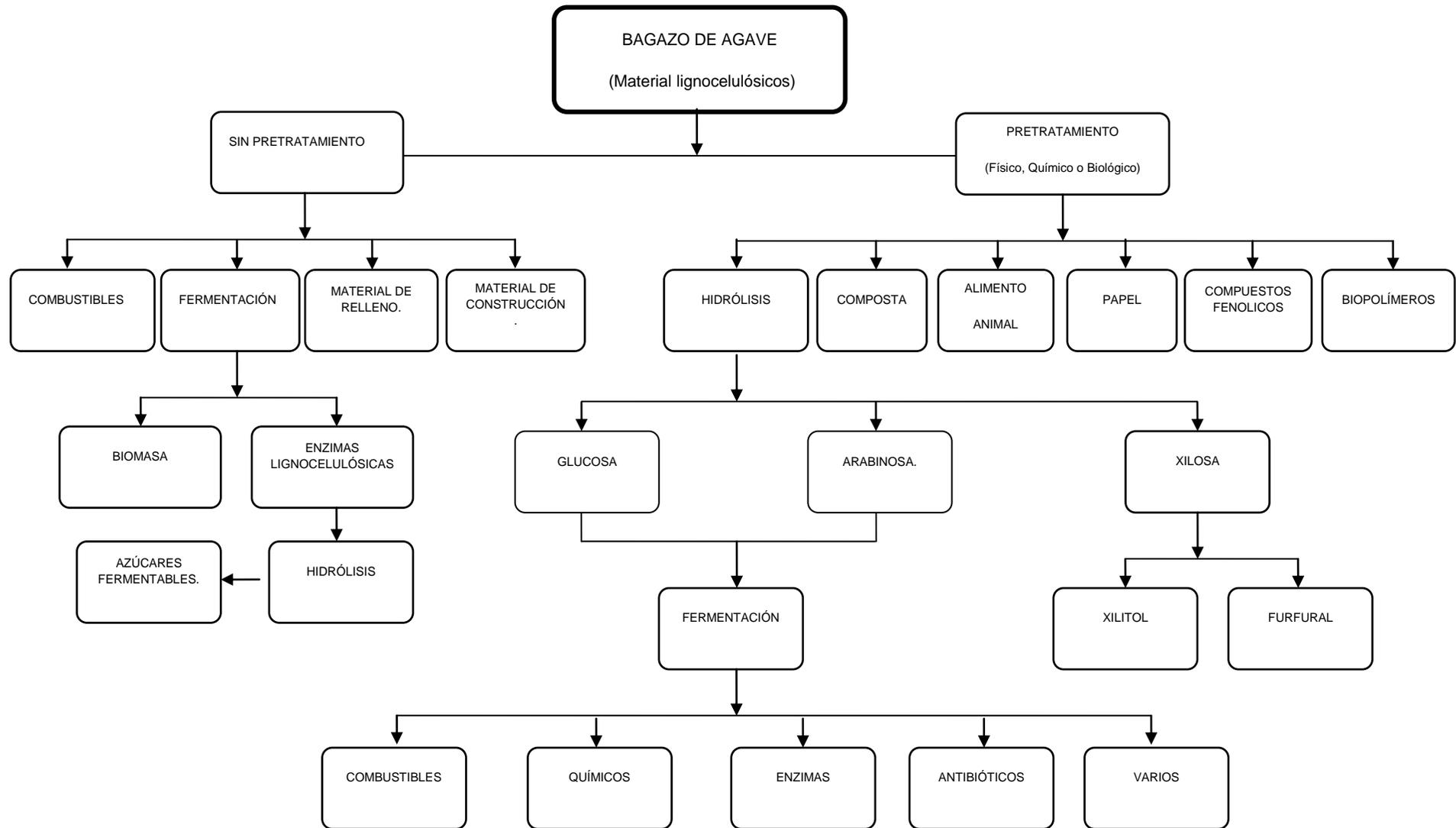


Figura 4. Usos comunes y potenciales del bagazo de agave (Modificado de González, 2005).



Tradicionalmente el bagazo de agave ha sido utilizado para la fabricación de ladrillos, muebles y colchones, pero para los grandes volúmenes que se genera de dicho residuo, este aprovechamiento no representa un gran impacto para solucionar los problemas de eliminación del residuo y confinamiento que tiene la industria del tequila. Sin embargo, la producción de una variedad de enzimas (hemicelulasas, celulasas, pectinasas, lacasas, peroxidasas) obtenidas a partir de la excreción de microorganismos capaces de metabolizar el material lignocelulósico, tienen numerosas aplicaciones y potencial biotecnológico en la industria de alimentos, en la producción de papel, medicamentos, industrial textil y la industria de producción de detergentes (González, 2005).

Por otra parte, la obtención de compuestos fenólicos a partir de la lignina presente en el bagazo de agave genera compuestos de interés a través de la obtención por medios físicos, químicos o biológicos para separarla de los demás componentes. Los compuestos fenólicos se pueden transformar en productos de interés, por ejemplo en aromatizantes, fármacos e incluso en polímeros sintéticos (resinas de fenolformaldehído), así mismo, se puede obtener vainillina, utilizado a nivel mundial como saborizante (González, 2005).

Hoy en día, se conocen diferentes tipos de energía obtenida a partir de fuentes renovables, una de ellas son los biocombustibles (Oliva, 2003). El término biocombustible engloba a todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal. Se trata por tanto, de recursos energéticos procesados por el ser humano diferenciados como combustibles líquidos, sólidos o gaseosos que pueden ser utilizados en la generación de calor y energía (Campus, 2008). Por ejemplo; el etanol puede ser empleado directamente como combustible, pues es considerado un excelente sustituto para la gasolina, y en algunos países se prefiere utilizar mezclas de etanol con gasolina después de transformar el etanol en ETBE, producto principal de la reacción en la que interviene una molécula de etanol y otra de isobuteno. El ETBE es una alternativa al MTBE (metil-terbutil éter) que se utiliza para mejorar el índice de octano (Sun, 2002). El ETBE tiene un índice de octano y un poder calorífico ligeramente superior al MTBE (Oliva, 2003).

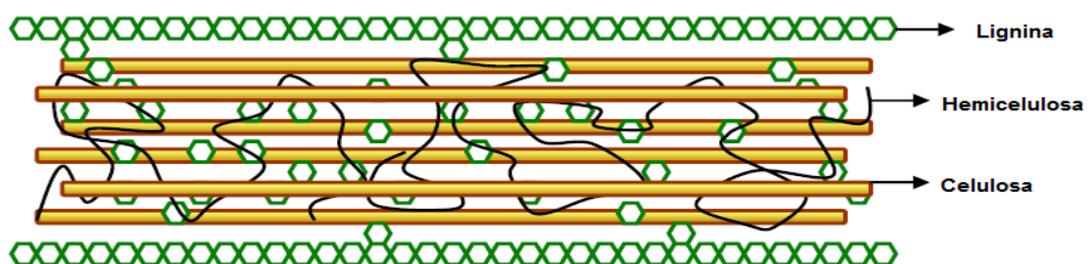
Dependiendo del tipo de fuente a partir de la cual es producido el biocombustible, puede clasificarse en cuatro generaciones. En la Tabla 1 se describe brevemente algunas propiedades de las generaciones de los biocombustibles elaborados a partir de materiales lignocelulósicos.

**Tabla 1.** Clasificación de los biocombustibles por medio de generaciones (Vázquez, 2012).

Generación	Insumos de procedencia	Propiedades de los insumos	Ejemplo
Primera	Agrícola	Con un alto contenido de almidón, azúcares y aceites.	Jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de algodón, aceites de la semilla de girasol entre otros.
Segunda	Residuos agrícolas y forestales	Principalmente material con un alto contenido de celulosa.	El bagazo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas, ramas secas etcétera.
Tercera	Cultivos energéticos	Vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos.	Pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, algas verdes y verde-azules.
Cuarta	Bacterias genéticamente modificadas	La bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.	Actualmente esta generación se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de anhídrido carbónico.

1.3 Composición química de la biomasa lignocelulósica.

Bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico denominado fotosíntesis, gracias al cual se generan moléculas de alto contenido energético en forma de energía química. El material lignocelulósico presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones como los polisacáridos celulosa y hemicelulosa al igual que lignina (Dias, *et al.*, 2009). La celulosa se encuentra rodeada por el polímero de hemicelulosa y lignina como se muestra en la Figura 5.

**Figura 5.** Representación de la estructura de lignocelulosa que muestra las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina (Modificado de Mussatto, 2010).

1.3.1 Propiedades de la celulosa.

La celulosa es el componente orgánico más simple y esencial encontrado en el material lignocelulósico que provee fuerza mecánica y resistencia a la degradación química y biológica, es la fuente renovable más abundante en el planeta. Es un homopolímero no ramificado formado por moléculas de D-glucosa, unidas entre sí por enlaces glucosídicos β -(1,4) para formar unidades repetitivas de celobiosa (ver Figura 6) (Mathews, *et al.*, 2002).



Debido a su estructura, las cadenas de celulosa se unen por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares formando agregados llamados microfibrillas. La celulosa posee regiones cristalinas resistentes a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Sun, 2002). Su estructura es altamente cristalina debido a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares que influyen en su morfología, rigidez, orientación, resistencia y reactividad (Ovando, 2005). Las zonas de alta cristalinidad son difíciles de hidrolizar en sus unidades monoméricas, mientras que las zonas de menor cristalinidad, es decir amorfas, son accesibles y susceptibles a las reacciones químicas. Durante la hidrólisis del polisacárido se libera una molécula de agua por la ruptura de cada enlace glucosa-glucosa (Hamelinck, *et al.*, 2005; Latorre, 2008).

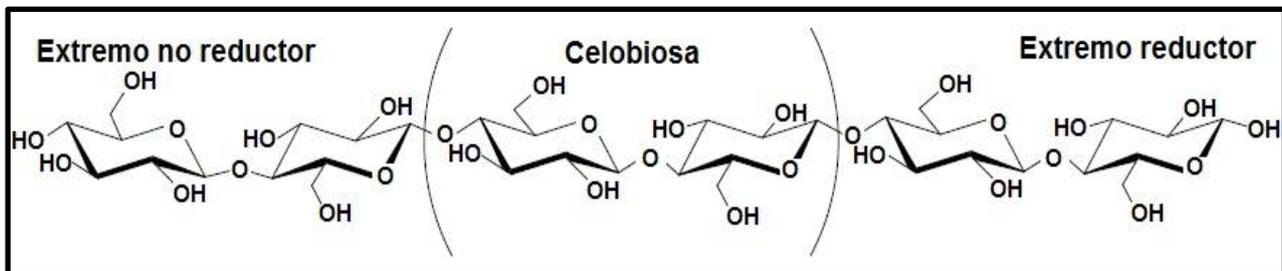


Figura 6. Representación de la estructura primaria de la celulosa (Vázquez, 2012).

1.3.2 Propiedades de la hemicelulosa.

Polímero que permite la unión entre lignina y celulosa en la biomasa, es heterogéneo, pues contiene tanto hexosas (azúcares de 6 carbonos como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y pentosas (azúcares de 5 carbonos como D-xilosa y D-arabinosa) mediante enlaces β (1,4) y ocasionalmente por enlaces β (1,3) (Pérez, *et al.*, 2002) como se presenta en la Figura 7. La cantidad y el tipo de azúcar o la combinación presente puede determinar algunas características del material lignocelulósico (Oliva, 2003). Además se caracteriza por tener una configuración estructural amorfa y muy hidrofílica, por consiguiente, es más accesible y fácil de hidrolizar que la celulosa (Howard, *et al.*, 2003). En su estado natural la hemicelulosa existe amorfa, se dice que son polidispersas (lo que significa que tienen un grado de polimerización variable) y altamente ramificadas, con constituyentes de diferentes tipos. La frecuencia y composición de las cadenas depende de cada especie vegetal (Oliva, 2003).

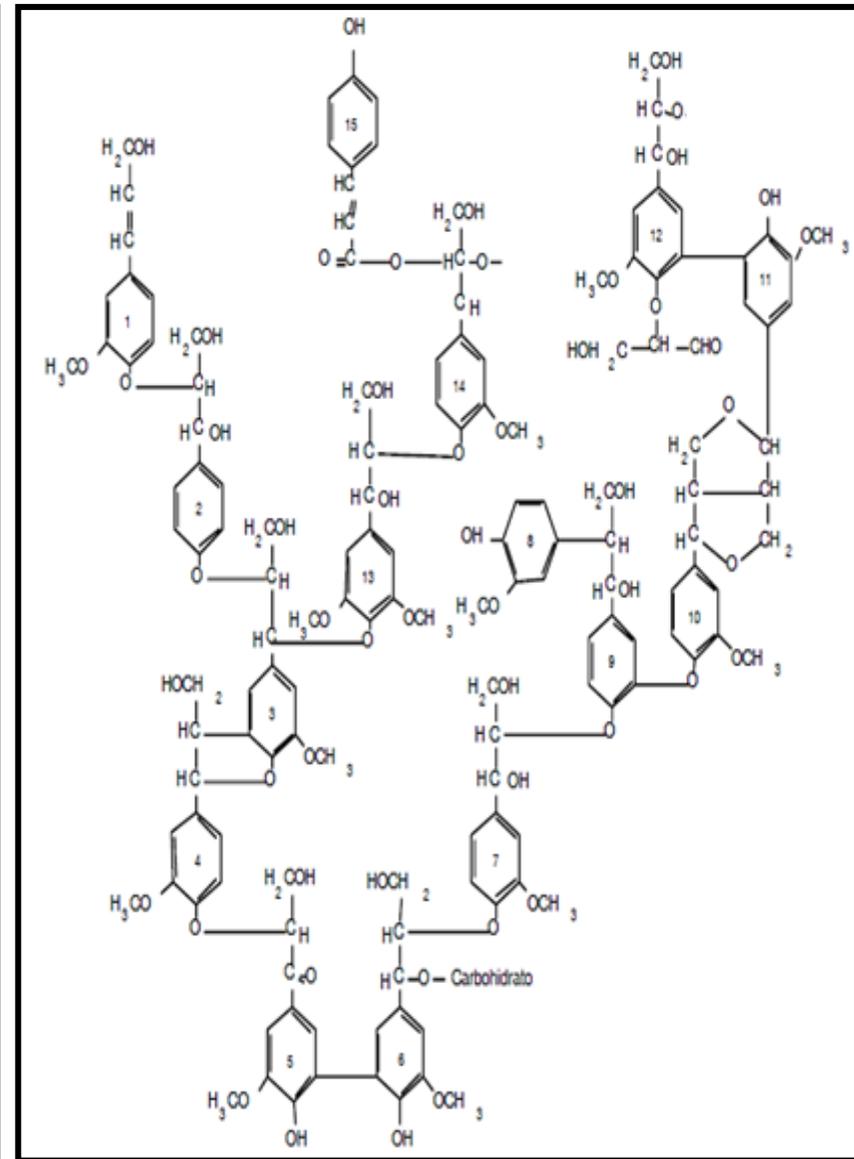
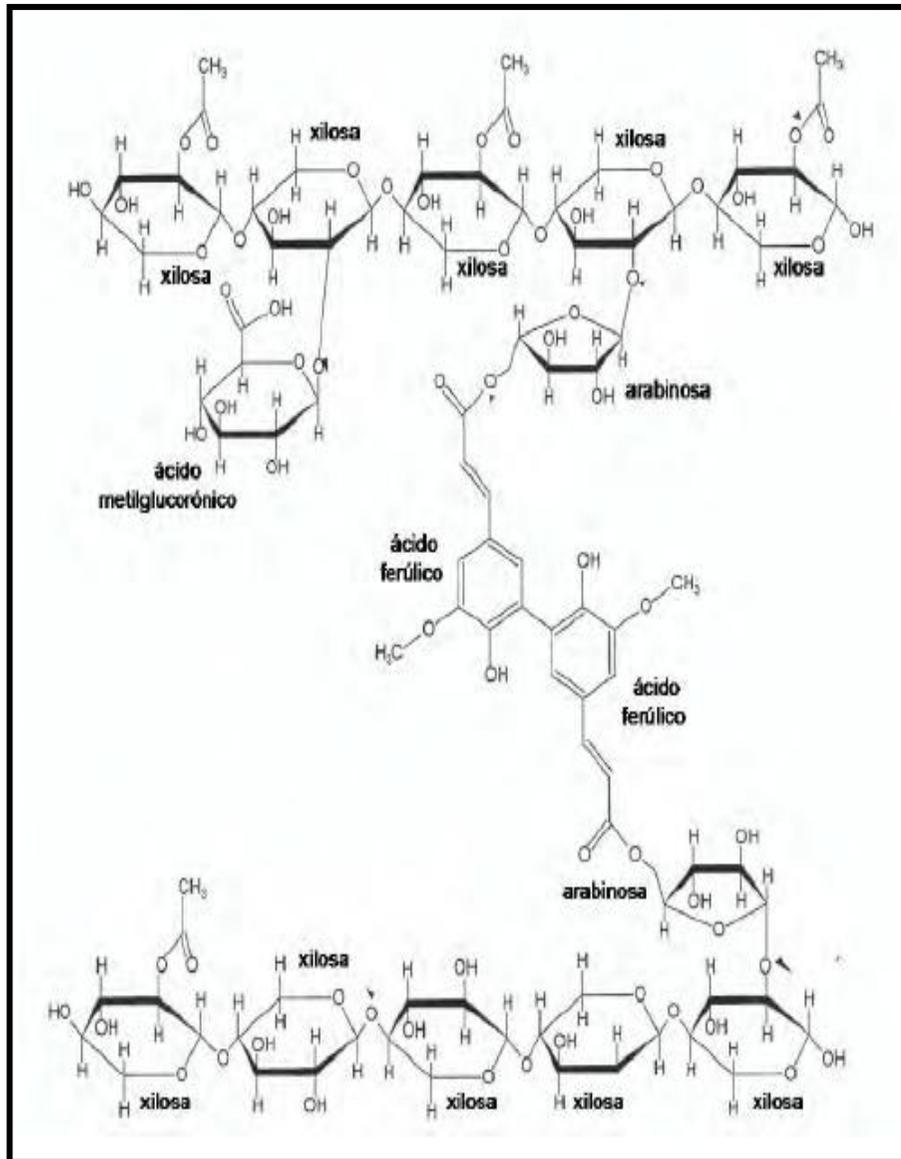


Figura 7. Estructura química de la hemicelulosa (Modificado de Wyman, *et al.*, 2005).

Figura 8. Estructura de la lignina (Tomado de Oliva, 2003).



1.3.3 Propiedades de la lignina.

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional, insoluble y ramificado, constituido por unidades monoméricas denominadas alcoholes aromáticos Figura 8, identificados entre sí por las diferentes sustituciones de las unidades de fenilpropano (Howard, *et al.*, 2003) que se unen entre sí por enlaces alquil-aril-éter o carbono-carbono como se muestra en la Figura 9.

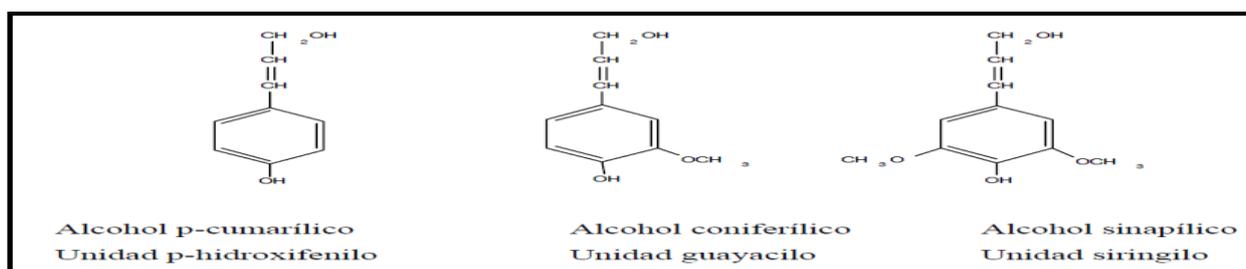


Figura 9. Alcoholes cinamilicos precursores de la lignina (Oliva, 2003).

El tipo de alcohol que se encuentra en la estructura de la lignina depende del tipo de biomasa lignocelulósica y de la proporción que se encuentre de este polímero. Se ha encontrado que este compuesto está asociado a la hemicelulosa mediante enlaces covalentes de dos sitios, carbono α en C-4 del anillo del benceno, dicha asociación se llama complejo lignina-carbohidrato. La lignina protege a la celulosa de la hidrólisis enzimática y fermentación.

La proporción de los principales componentes químicos para los materiales lignocelulósicos varía. En la Tabla 2 se encuentran algunos ejemplos de diferentes sustratos y la cantidad de sus principales componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) incluyendo al bagazo de agave (Mussatto, 2010; Saucedo, *et al.*, 2010).

Tabla 2. Comparación de los principales componentes de algunos residuos lignocelulósicos (Modificado de Mussatto, 2010; Saucedo, *et al.*, 2010).

Material lignocelulosico	Celulosa (% peso)	Hemicelulosa (% peso)	Lignina (% peso)
Paja de cebada	33.8	21.9	13.8
Mazorcas de maíz	33.7	31.9	6.1
Tallos de maíz	35.0	16.8	7.0
Tallos de algodón	58.5	14.4	21.5
Paja de avena	39.4	27.1	17.5
Paja de arroz	36.2	19.0	9.9
Paja de centeno	37.6	30.5	19.0
Soja	34.5	24.8	19.8
Bagazo de caña	40.0	27.0	10.0
Tallos de girasol	42.1	29.1	13.4
Paja de trigo	32.9	24.0	8.9
Bagazo de agave	43	19	15



1.4 Pretratamiento del material lignocelulósico.

Los pretratamientos tienen por objetivo modificar la estructura macroscópica y microscópica del material lignocelulósico de tal manera que todos los componentes como la hemicelulosa y la lignina sean separados, por lo tanto, la celulosa queda accesible para la posterior hidrólisis ya sea ácida y/o enzimática (Sun, 2002). Este efecto se muestra en la Figura 10. Por otra parte, los efectos sobre el material lignocelulósico sometido a un pretratamiento son variados por lo que pueden: incrementar el área superficial de la celulosa, disminuir la cristalización de la celulosa, remover la hemicelulosa o modificar la estructura química de la lignina (Sun, 2002). Por su naturaleza se pueden clasificar los pretratamientos en físicos, químicos y biológicos (Tabla 3 y 4).

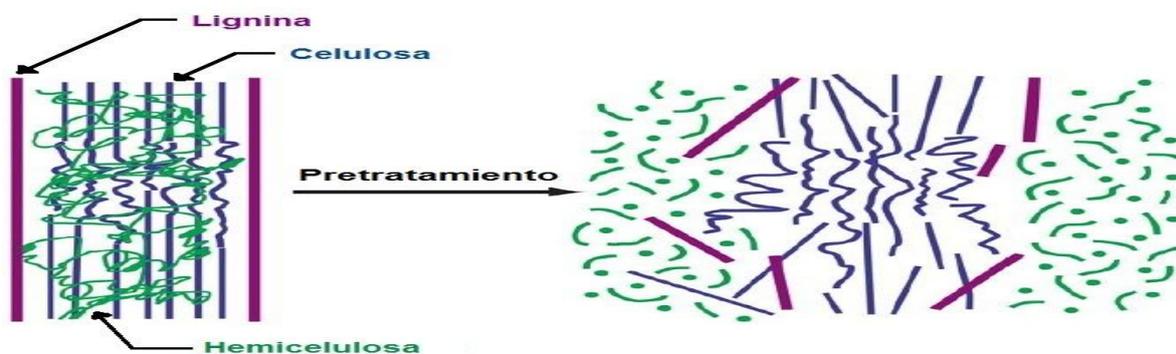


Figura 10. Cambio estructural de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento (Tomado de McCutchen, 2006).

Tabla 3. Ejemplos de pretratamientos para biomasa lignocelulósica.

Método	Técnica
Pretratamientos físicos	
Pirólisis	Es un proceso de transformación termoquímica que utiliza temperaturas superiores a 300° C provocando que la celulosa se descomponga, produzca gas y se carbonice (Caballero, 2010). Hay estudios que establecen que puede existir un proceso de conversión de celulosa a azúcares simples (glucosa) de un 80-85% (Caballero, 2010).
Trituración mecánica	La trituración de los materiales lignocelulósicos mediante la molienda, reduce el estado cristalino de la celulosa y aumenta la superficie específica, facilitando la hidrólisis posterior (Caballero, 2010). Este pretratamiento tienen el inconveniente de su alto consumo energético, que depende del tamaño de partícula final y del material lignocelulósico que se utilice (Sun, 2002).
Pretratamientos biológicos	
Microorganismos	Se emplean microorganismos tales como hongos de putrefacción blanca (basidiomicetos) para degradar la lignina y la hemicelulosa de los materiales de desecho. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático (Sun, 2002).

**Tabla 4.** Ejemplos de pretratamientos para biomasa lignocelulósica.

Pretratamientos químicos	
Hidrólisis ácida	Los catalizadores más comunes empleados son H_2SO_4 , HCl para la hidrólisis de la biomasa. Hay dos tipos de tratamientos: empleando catalizadores concentrados o diluidos. Hay que neutralizar después de la hidrólisis, ocurre una despolimerización de celulosa y la lignina no se solubiliza. El proceso es caro, sin embargo para que sea económicamente viable el ácido concentrado debe ser recuperado (Sun, 2002).
Deslignificación oxidativa	La biodegradación de la lignina puede realizarse por la peroxidasa en presencia de H_2O_2 . Ocurre una solubilización de 50% y casi el total de hemicelulosa (Sun, 2002).
Hidrólisis alcalina	El tratamiento con NaOH diluido produce un hinchamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso del nivel de cristalización, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, y una ruptura de la lignina (Sun, 2002).
Organosolv	Se utiliza para la ruptura de estructura interna de lignina y hemicelulosa empleando disolventes orgánicos (etanol, metanol, acetona, etilenglicol, etc). Temperatura cercana a 185°C (Caballero, 2010). La solubilización es casi total de lignina, hidrólisis casi total de hemicelulosa. Es necesario la eliminación de los disolventes ya que son inhibidores de los procesos posteriores (Sun, 2002).
Pretratamientos fisicoquímicos	
Explosión por vapor	El material lignocelulósico se somete a temperaturas entre 190-230°C, mediante la inyección directa de vapor saturado, durante un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Tras el tiempo de tratamiento se somete el material a una rápida despresurización. El efecto del pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas y químicas. Los factores que afectan en este pretratamiento son: tiempo de residencia, temperatura, tamaño de partícula y humedad de la muestra (Sun, 2002).
Explosión por vapor con amoníaco (AFEX)	El material lignocelulósico es impregnado con amoníaco líquido (1 a 2Kg amoníaco/Kg biomasa seca) a una temperatura 90°C/ 30 minutos. Transcurrido el tiempo, el material es sometido a una rápida descompresión (Sun, 2002).
Explosión con vapor adicionando: H_2SO_4 o CO_2	Es un proceso similar a la exposición por vapor o al proceso AFEX. Este proceso se basa en el hecho que el CO_2 forma ácido carbónico, lo que aumenta la tasa de hidrólisis.

En este proyecto se utilizaron dos pretratamientos, un pretratamiento ácido (como catalizador se utilizó el H_2SO_4) y un pretratamiento básico (como catalizador se usó el NaOH).

1.4.1 Pretratamiento químico utilizando un catalizador ácido.

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que utiliza catalizadores ácidos, para transforma las cadenas de polisacáridos que forman parte de la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales y la lignina no se solubiliza. Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Oliva, 2003). Los procesos industriales de hidrólisis ácida pueden agruparse en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y los que utilizan ácidos diluidos.



El pretratamiento que usa ácidos concentrados emplea temperatura baja, logrando obtener altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90% de la glucosa potencial). Sin embargo, se presentan desventajas en el uso de este proceso, una de ellas son los altos requerimientos del catalizador lo cual provoca problemas de corrosión en los equipos empleados. Además se requiere de una etapa de utilización de sustancias para aumentar el pH del medio antes de la fermentación de los azúcares lo que influye directamente a que los costos del proceso se eleven. En la actualidad este proceso ha ganado un interés como consecuencia de nuevos métodos que mejoran la economía de recuperación de los ácidos (Sun, 2002).

Los procesos que emplean ácidos diluidos se utiliza generalmente como un pretratamiento que precede a la hidrólisis enzimática más que como método para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Taherzadeh, 2007). La principal ventaja de este proceso es el consumo relativamente bajo de ácidos. Sin embargo, se requieren temperaturas relativamente altas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa.

1.4.2 Pretratamiento químico utilizando un catalizador alcalino.

En este proceso se han empleado catalizadores como el hidróxido de sodio de potasio o de calcio. Se sabe que la eficacia de estos agentes depende del contenido de lignina del material. Las condiciones del pretratamiento alcalino son usualmente menos severas que las de otros pretratamientos. Cuando la biomasa es tratada con una solución alcalina diluida, el área superficial interna del material se incrementa por hinchazón, lo cual provoca la separación de los vínculos estructurales entre lignina y carbohidratos, la alteración de la estructura de lignina y la disminución de la cristalinidad y del grado de polimerización de la celulosa. Así, por ejemplo, se ha conseguido aumentar la digestibilidad de sustratos como paja con un contenido de lignina del 18 %, y de maderas duras, pero no de maderas blandas con un contenido de lignina superior al 26 % (Sun, 2002).

1.4.3 Compuestos inhibidores generados en los pretratamientos.

Durante el pretratamiento del material lignocelulósico no sólo se obtienen los azúcares provenientes de la hidrólisis, sino que, debido a las altas temperaturas y condiciones del pretratamiento, se originan una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de biomasa, del pretratamiento utilizado, las condiciones de proceso y la utilización o no de catalizadores químicos. Los productos de degradación que se generan



durante los pretratamientos pueden dividirse en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular, y derivados fenólicos (Oliva, 2003).

En la Figura 11 se esquematiza la formación de los compuestos que inhiben la fermentación de los azúcares reductores. Se toma en cuenta la cantidad de los principales componentes de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), por lo que se dividen los productos de acuerdo al precursor del que parte, y en algunos casos hay la posibilidad de generar subproductos.

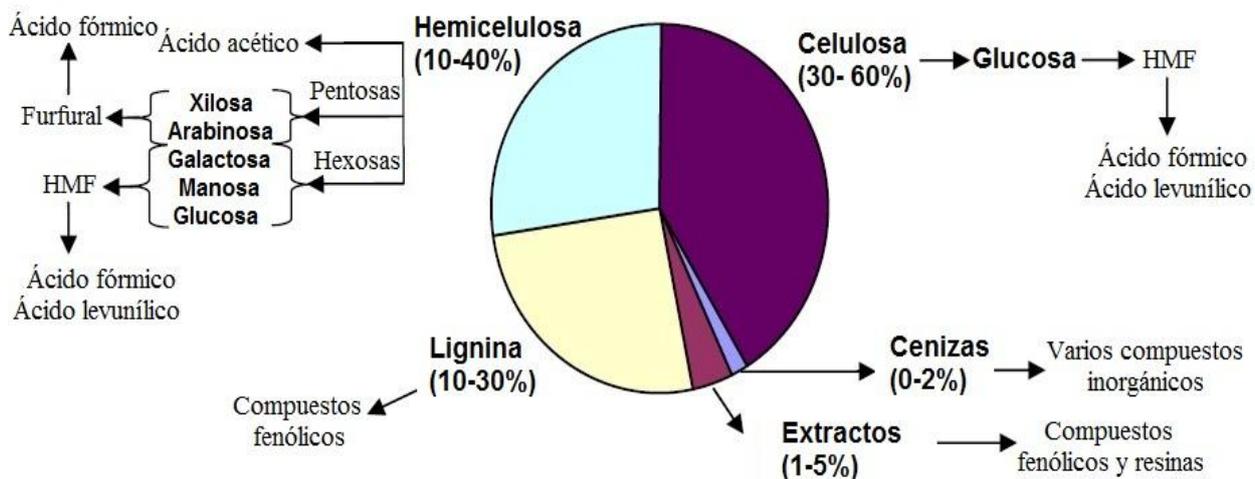


Figura 11. Composición del material lignocelulósico y los productos potenciales de su hidrólisis (Modificado, Taherzadeh, 2007).

1.5 Hidrólisis enzimática.

Las enzimas son macromoléculas de naturaleza esencialmente proteica que actúan como catalizadores para una reacción biológica. Las enzimas no afectan la constante de equilibrio de una reacción ya que sólo actúan para disminuir la energía de activación de la reacción, y por lo tanto, hacen que está ocurra con una mayor rapidez. (McMurry, 2006). Las características más sobresalientes de las enzimas son su poder catalítico y su especificidad. Se han agrupado en seis clases o grupos, de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan:

- 1) *Oxidoreductasas*: Catalizan reacciones de oxido-reducción, las que implican la ganancia (reducción) o pérdida de electrones (oxidación). Las más importantes son las deshidrogenasas y las oxidasas (Lehninger, 2005).
- 2) *Transferasas*: Transfieren grupos funcionales de una molécula a otra. Ejemplo: quinasas; transfieren fosfatos del ATP a otra molécula. Muchas de estas enzimas requieren de la existencia de coenzimas (Lehninger, 2005).



- 3) *Hidrolasas*: Rompen varios tipos de enlaces introduciendo radicales -H y -OH. La hidrólisis puede ser de un grupo éster, fosfato o amida (McMurry, 2006).
- 4) *Liasas*: Adicionan grupos funcionales a los dobles enlaces. Puede haber pérdida de un CO₂ o H₂O (McMurry, 2006).
- 5) *Isomerasas*: Convierten los sustratos isómeros unos en otros (McMurry, 2006).
- 6) *Ligasas*: Forman diversos tipos de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N, mediante reacciones de condensación acopladas a la ruptura del ATP (Lehninger, 2005).

La hidrólisis enzimática de la celulosa para formar glucosa se realiza por un grupo de enzimas llamadas celulasas, son un grupo de enzimas que actúan en distintas etapas por acción secuencial y sinérgica hidrolizando los enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato o una unidad química diferente. Las tres enzimas que forman parte de las celulasas son: Endo- β -1,4-glucanasas (EC.3.2.1.4), Exo- β -1,4-glucanasas (EC.3.2.1.91) o celobiohidrolasas, β -1-4-glucosidasas (EC.3.2.1.21).

- **Endo- β -1,4-glucanasas (EC.3.2.1.4)**: Rompe al azar los enlaces internos β -glucosídicos de la celulosa en las regiones amorfas, produciendo nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas. Como resultado, hay una rápida disminución en el largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores. La celulosa cristalina no es atacada de manera efectiva por esta enzima (Criquet, 2002).
- **Exo- β -1,4-glucanasas (EC.3.2.1.91) o celobiohidrolasas**: Atacan gradualmente las moléculas de celulosa en los extremos terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa y en algunas ocasiones liberan una pequeña cantidad de glucosa. Exhiben acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas (Criquet, 2002).
- **β -1-4-glucosidasas (EC.3.2.1.21)**: Hidroliza celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) para liberar glucosa (Criquet, 2002).

1.5.1 Mecanismo de acción de las celulasas sobre enlaces β -glucosídicos.

Aunque el mecanismo exacto de las celulasas sobre los enlaces β -glucosídicos no se comprende completamente, se han establecido modelos para tratar de explicar dicho mecanismo. El primer modelo que trató de explicar el mecanismo de la hidrólisis enzimática sobre la celulosa, fue propuesto por Reese en 1950 (Macarron, 1992); según este modelo, la celulosa sería activada por un factor de hinchamiento o activador, enzima no hidrolítica C₁; a continuación actuaría una enzima hidrolítica C_X; la celobiosa y otros



oligosacáridos producidos, serían hidrolizados hasta glucosa por β -glucosidasa como se muestra en la Figura 12 (Macarron, 1992).

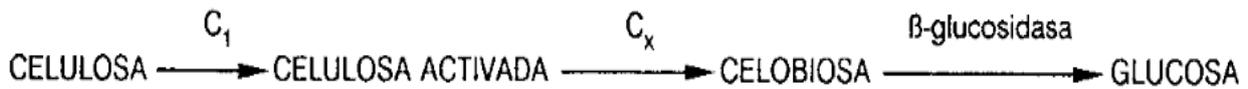


Figura 12. Mecanismo de acción de las celulasas según el modelo de Reese y col., 1950. (Macarron, 1992).

Pocos años después, Gilligan y Reese en 1984 (Macarron, 1992) describieron por primera vez el sinergismo (la actividad exhibida por mezclas de componentes es mayor que la suma de las actividades por separado) entre las enzimas celulolíticas en la digestión de la celulosa por medio de evidencia experimental del fenómeno utilizando mezclas de celulasas de hongos y cuantificando los azúcares reductores, producto de la hidrólisis de la celulosa (Macarron, 1992). A partir de los estudios antes mencionados, se crea un mayor interés para encontrar el mecanismo de acción de las celulasas. El esquema de la hidrólisis enzimática general describe la acción de las celulasas disminuyendo el polímero de celulosa y finalizando la acción en la obtención del producto de interés en forma de moléculas de glucosa (ver la Figura 13).

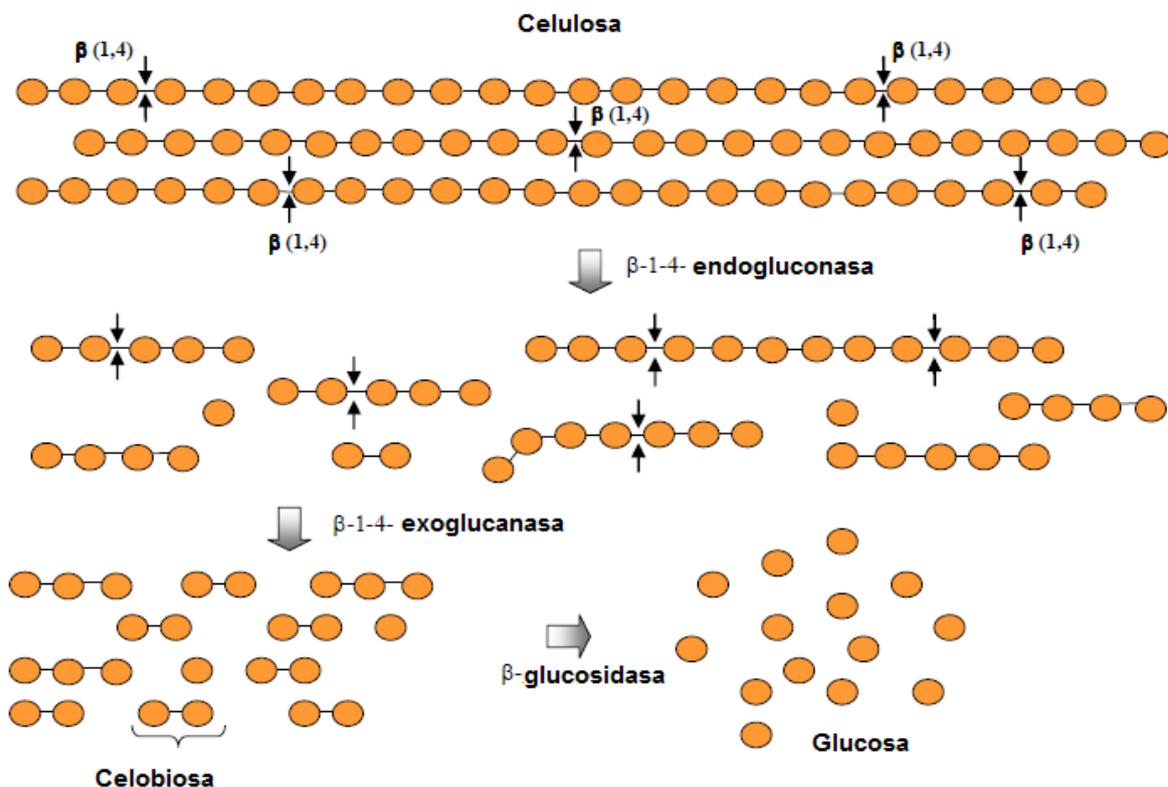


Figura 13. Esquema de la hidrólisis enzimática de la celulosa (Mussatto, 2010).



1.5.2 Interacción enzima-sustrato.

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. En este caso, la hidrólisis enzimática se produce en medio heterogéneo y envuelve las siguientes etapas (Bansal, *et al.*, 2009):

- a) Transferencia de las moléculas de enzima (E) de la solución acuosa a la superficie de sustrato de celulosa (S).
- b) Formación del complejo enzima-sustrato (ES), previa adsorción de las moléculas de enzima sobre la celulosa. La capacidad de adsorción varía de una enzima a otra, y también es distinta la afinidad de cada celulasa por las distintas regiones presentes en el sustrato. La adsorción debe jugar un papel importante en los fenómenos de sinergismo.
- c) Transferencia de las moléculas de agua hacia los centros activos del complejo.
- d) Reacción en la superficie del sustrato y transferencia de los productos solubles (P), glucosa y celobiosa, desde la superficie de la celulosa hasta el medio acuoso.
- e) Descomposición de las cadenas de celobiosa en glucosa por medio de las β -glucosidasas.

En la literatura se ha encontrado que una catálisis en medio heterogéneo se puede modelar tomando en cuenta la isoterma de Langmuir-Hinshelwood y el modelo para una catálisis en medio homogéneo de Michaelis-Menten entre otras consideraciones, mientras que una catálisis en medio homogéneo sólo se modela por la cinética de Michaelis-Menten (Bansal, *et al.*, 2009).

1.5.3 Factores clave para una eficaz hidrólisis enzimática sobre material lignocelulósico.

A pesar de que se piensa que romper el enlace glucosídico β (1,4) es relativamente sencillo, esto en realidad no es cierto, puesto que la disposición espacial que la celulosa toma lo hace complejo, en gran medida esto se debe por que la celulosa presenta dos regiones, una cristalina y otra amorfa. Por su parte, en las zonas cristalinas de la celulosa los puentes de hidrógeno configuran cristales con una disposición tan comprimida que ni el agua ni las enzimas pueden penetrar en ellos provocando que sea insoluble este polímero y que la eficiencia en su hidrólisis disminuya (Figura 14).

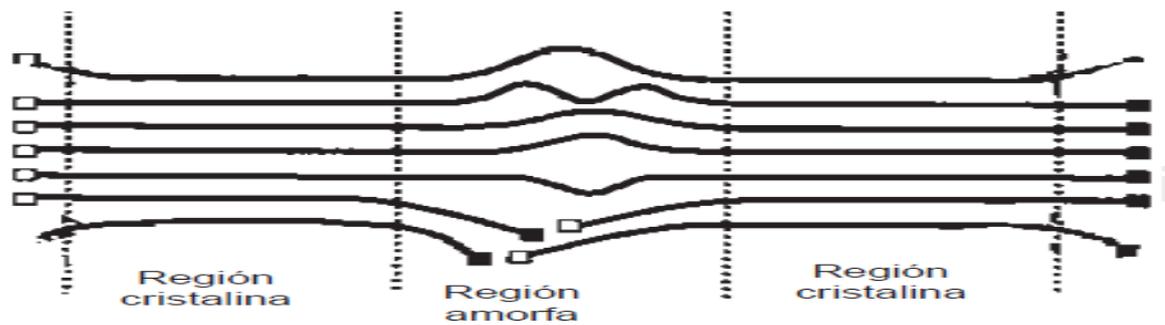


Figura 14. Los diferentes tipos de organización de las fibras de celulosa generan dos conformaciones diferentes: ordenadas, que comprenden la región cristalina, y desordenadas, que forman la región amorfa (García, *et al.*, 2003).

En la literatura se establece que la ineficiencia de la hidrólisis también es causada por la presencia de lignina y hemicelulosa, ya que actúan como barreras para las celulasas que hidrolizan el enlace β (1,4) presente en la celulosa. Además altas proporciones de celulosa cristalina, estructura capilar de las fibras de celulosa y área superficial son algunos de los factores que contribuyen a una disminución en la eficiencia de la hidrólisis enzimática (Alvira, 2010; Bansal, *et al.*, 2009).

De acuerdo a Bansal, *et al.*, 2009 la adsorción, la reactividad del sustrato y la accesibilidad pueden cambiar a lo largo de la hidrólisis enzimática. Las mejoras en este tipo de hidrólisis se han dado gracias a la ingeniería genética que ha ayudado a la producción de una mayor cantidad de enzimas derivadas de los microorganismos (Bansal, *et al.*, 2009).

1.5.4 Microorganismos que degradan celulosa.

La celulosa constituye una fuente generosa de glucosa que muy pocos seres vivos logran aprovechar. Sin embargo, existe un conjunto de diversos organismos capaces de degradarla con el fin de metabolizarla y cumplir así con funciones vitales. Los rumiantes logran aprovechar la glucosa presente en la celulosa de los pastos gracias a las bacterias simbiotas que habitan sus aparatos digestivos; las termitas, debido a que sus intestinos albergan protozoos capaces de degradar la celulosa; las setas que crecen en troncos caídos, en función de sus propias enzimas que secretan al exterior (Mathews, *et al.*, 2002).

Los microorganismos celulolíticos (que degradan celulosa) desempeñan un papel importante en la biosfera reciclando este polímero al producir principalmente tres tipos de celulasas conocidas como endo-glucanasas, exo-glucanasa y β -glucosidasa, las cuales son excretadas extracelularmente por los microorganismos que poseen celulosomas que funcionan como estructuras exocelulares especializadas, que catalizan la hidrólisis de



celulosa y hemicelulosa. Algunos ejemplos de microorganismos que degradan celulosa se presentan en la Tabla 5. (Bhatands, 1997).

Tabla 5. La degradación de la celulosa es llevada a cabo por algunos microorganismos celulolíticos como bacterias y hongos (Arroyo, 2010).

Grupo	Especie
Hongos aerobios	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma koningii</i> .
Hongos aerobios termófilos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i> .
Hongos aerobios mesófilos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i>
Bacterias mesófilos y termófilos aerobios	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> , <i>Thermomonospora sp.</i>
Bacterias mesófilos y termófilos anaerobios	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Clostridium thermocellum</i> .



CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis.

La modificación de parámetros fisicoquímicos y/o el uso de pretratamientos, facilitan la hidrólisis enzimática del bagazo de agave que resulta del proceso de producción del tequila, permitiendo un aumento de la liberación de azúcares reductores.

2.2 Objetivo general

Evaluar la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de la piña de *Agave tequilana* Weber var. *Azul* para determinar las condiciones donde se obtiene la mayor productividad volumétrica con la utilización de dos estrategias: hidrólisis enzimática e hidrólisis enzimática con pretratamiento, evaluando los catalizadores H_2SO_4 y $NaOH$.

2.3 Objetivos particulares.

- Evaluar la hidrólisis enzimática del bagazo de agave sin pretratamiento modificando las variables: pH, temperatura, diámetro de partícula, adición de diferentes volúmenes del complejo enzimático, concentración de sustrato.
- Evaluar los pretratamientos con H_2SO_4 y $NaOH$ modificando las concentraciones de los catalizadores y diámetro de partícula del bagazo de agave.
- Evaluar la hidrólisis enzimática con pretratamiento. Realizar un balance de materia prima sobre el bagazo y el medio acuoso.

En el capítulo III se muestra un esquema de trabajo general que contiene la metodología experimental que se siguió en la tesis. Se establecen las dos estrategias de trabajo: a) hidrólisis enzimática (bagazo sin pretratamiento) y b) hidrólisis enzimática con pretratamiento (bagazo con pretratamiento ácido o básico ver Figura 15). Posteriormente, se señala el equipo y reactivos utilizados así como la metodología de cada estrategia experimental mediante la descripción de cada una de las etapas.



CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Diagrama general.

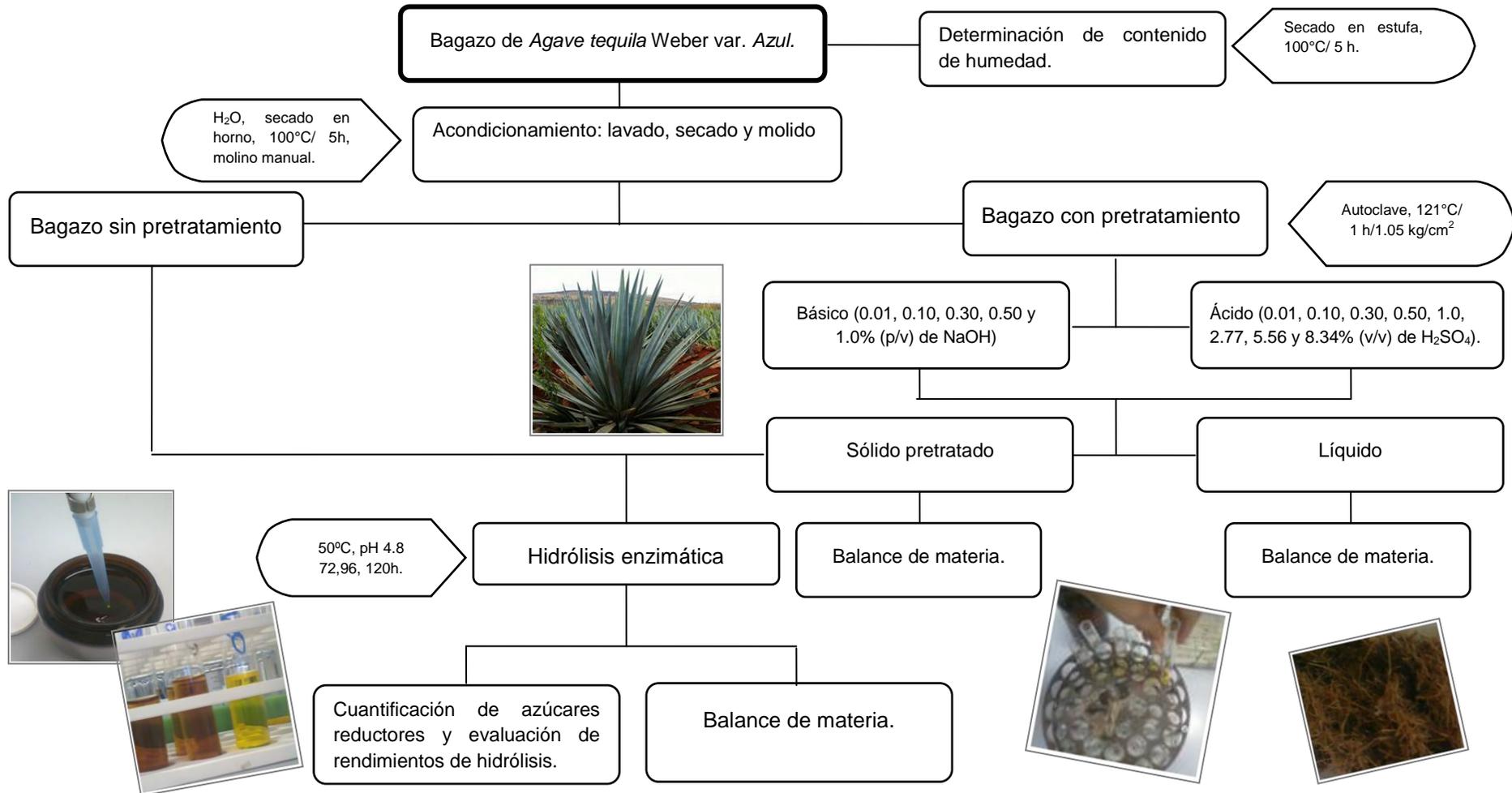


Figura15. Esquema general de trabajo.



3.2 Metodología descriptiva.

3.2.1 Obtención del bagazo de agave.

El material lignocelulósico con el que se trabajó es el residuo que se genera de la producción del tequila suministrado por una empresa, ubicada en el estado de Jalisco, México. El bagazo de la piña de *Agave tequilana* Weber var *Azul* fue enviado al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (nueva sede). La cantidad que se recibió de bagazo de agave fue aproximadamente 20 Kg húmedo.

Una vez en el laboratorio, el bagazo se separó en dos porciones, una destinada para la determinación del contenido de humedad de aproximadamente 200 g y el resto fue sometido a un acondicionamiento que se describirá posteriormente.

3.2.2 Determinación del contenido de humedad.

Se tomó una muestra de 30g de bagazo para determinar el contenido de humedad promedio, este parámetro se determinó por el método de secado en estufa (felisa/131-A). Por triplicado se pesaron 10 gramos de bagazo en él pesa filtros a peso constante (secado en estufa a 100°C durante 5 horas y después enfriado en él desecador 2 horas). Los pesa filtros con la muestra de bagazo se trataron con la metodología explicada antes para los pesa filtros vacíos. Se registró el peso de la muestra del bagazo de agave y de los pesa filtros antes y después de aplicar la metodología anterior (Nollet, 1996).

El contenido de humedad del bagazo se determinó calculando la diferencia de peso en porcentaje como se muestra en la ecuación de la Figura 16 registrando el promedio de las muestras evaluadas.

$$\% \text{ humedad} = \frac{(\text{masa inicial} - \text{masa final})}{\text{masa inicial}} \times 100$$

Figura 16. Ecuación para calcular el % de humedad del bagazo de agave.

3.2.3 Acondicionamiento de la materia prima

Tomando en cuenta la naturaleza de nuestra materia prima se decidió que era necesario realizar un acondicionamiento para poder estandarizar las muestras, conservar en condiciones adecuadas y partir de un lote homogéneo. El acondicionamiento previo consiste en el lavado, secado y disminución del diámetro de partícula del bagazo de agave.

3.2.3.1 Lavado del bagazo de la piña de agave.

En charolas de metal 65 x 45 x 45 cm se depositó una cama con bagazo de agave distribuyéndolo de manera homogénea para cubrir la mitad de la capacidad de la charola.



Se agregó agua corriente hasta cubrir por completo toda la superficie del bagazo de agave y se mezcló, hasta observar una coloración café en el agua. Posteriormente, se realizó un recambio de agua con la finalidad de liberar la mayor cantidad de azúcares solubles presentes en la muestra y se eliminó la mayor cantidad de agua del bagazo de agave mediante un prensado. Finalmente se almacenó en el cuarto frío a 4°C en charolas cubiertas con bolsas.

3.2.3.2 Secado del bagazo de agave.

Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Química con la colaboración del estudiante de Ingeniería Química, Eduardo Valentino Acevedo Sánchez. El bagazo de agave lavado se trasladó en bolsas de polietileno por lotes de 6 Kg. En el horno (felisa) se colocaron 6 charolas lisas rectangulares de metal de 45 x 65 cm con 1 kg de bagazo húmedo, se hizo una distribución homogénea en cada charola de bagazo. Las variables de operación fueron: 100°C y un tiempo de residencia de 5 a 6 horas. A las 2 horas del proceso se movió el bagazo con el objetivo de que el secado fuera homogéneo. Se pesó el bagazo después del proceso para registrar la pérdida de humedad del lote. Los lotes se almacenaron en bolsas tipo Ziploc a temperatura ambiente en un lugar seco para su posterior empleo.

3.2.3.3 Disminución del diámetro de partícula sobre el bagazo de agave seco.

Este proceso se llevó a cabo en un molino manual para maíz (estrella/NA) fabricado en hierro vaciado con discos de molienda en hierro aleado de alta resistencia al desgaste. El molido del bagazo de agave seco, se realizó en lotes de 10 a 15 gramos, se recolectó en charolas lisas de metal y se pasó a tamices (WS TYLER/ NA) para realizar la separación por diámetros de partícula del número de malla/tamaño en pulgadas (12/0.0601in, 25/0.0278in y 40 /0.0165 in). Se almacenó en bolsas tipo Ziploc a temperatura ambiente para su uso posterior de acuerdo al diámetro de partícula obtenido.

3.2.4 Especificaciones para la hidrólisis enzimática.

La enzima utilizada corresponde a un preparado comercial de celulasas, suministrado por GENENCOR, con la denominación comercial de Accellerase® 1500. Es un preparado líquido producido de una cepa modificada genéticamente de *Trichoderma reesei*.

La actividad de endo-glucanasa es 2200-2800 CMC U/g y está normalizada en base de su actividad en el sustrato, carboximetilcelulosa (CMC). Una unidad de CMC de actividad libera 1 mol de azúcares reductores (expresado como glucosa equivalentes) en un minuto, utilizando una temperatura de 50°C y un pH de 4.8 (Genencor, 2012).



La actividad de la β -glucosidasa es 525 a 775 PNPG U /g y está normalizada en base a la determinación colorimétrica del p-nitrofenol (pNP) liberado por acción catalítica de la enzima sobre un sustrato, el p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG). Una unidad de (pNPG) denota 1 mol de nitrofenol liberado de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido por minuto, utilizando una temperatura de 50°C y un pH de 4.8 (Genencor, 2012).

3.2.5 Especificaciones de los ensayos a evaluar.

Se presenta en un diagrama la metodología que se utilizó en la estrategia **a) hidrólisis enzimática (bagazo sin pretratamiento)**, ver Figura 17. En la Figura 18 se esquematiza la metodología para la estrategia **b) hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido (H_2SO_4) o básico (NaOH)**. Los ensayos se hicieron con un sistema de trabajo por medio de sacrificio de matraces (cada 24 horas) por duplicado.

El bagazo acondicionado se peso en una balanza analítica con un matraz Erlenmeyer (Carls-Ohaus/Explorer) se adiciono buffer de acetatos (ácido acético glacial y acetato de sodio anhídrido de J.T Baker) se agito en una parrilla con agitación magnética (Corning/PC-353) el valor de pH se midió con un potenciómetro (Corning/430). La adición del complejo enzimático se realizó en una campana de flujo laminar (Esco/N/A), la toma de muestra se hizo con micropipeta (Gilson/ 1 ml), los experimentos se llevaron a cabo en una incubadora (IKA/ KS 4000IC) ver metodología Figura 17.

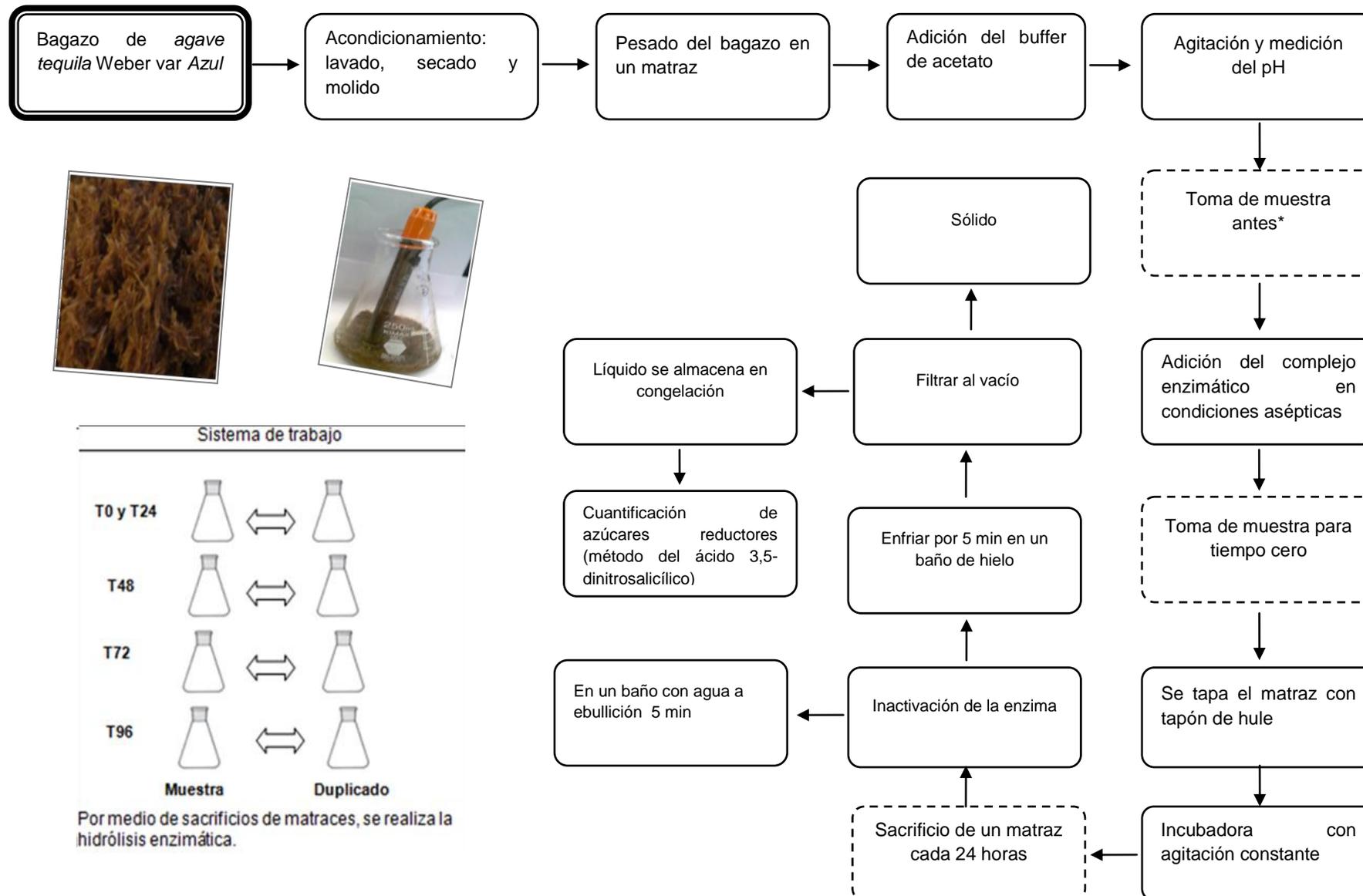


Figura 17. Metodología para las evaluaciones de la estrategia a) hidrólisis enzimática (bagazo sin pretratamiento). *Toma de muestra antes, es la muestra que se toma antes de adicionar el complejo enzimático con el objetivo de generar un delta de concentración, para estandarizar las muestras.



3.2.6 Evaluación de la temperatura en la hidrólisis enzimática.

En la Tabla 6 se encuentran las variables de operación para la evaluación de la temperatura en la hidrólisis enzimática. La tabla se divide para tres experimentos utilizando un control negativo resaltando en negritas la variable modificada 50°C, 55°C y 60°C los otros parámetros de operación permanecen constantes. La metodología del ensayo se encuentra en la Figura 17 (página 26).

Tabla 6. Especificaciones de los experimentos con bagazo de agave sin pretratamiento.

Parámetros	Experimento (por duplicado)			
Número del experimento	1	2	3	Control
Bagazo de agave acondicionado g	10	10	10	10
Temperatura de incubación (°C)	50	55	60	Un control por cada temperatura.
Diámetro de partícula malla 40/ in	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
Valor de pH	4.8	4.8	4.8	4.8
Buffer de acetatos 0.2M/ ml	100	100	100	100
Volumen del complejo enzimático (ml /g de bagazo)	0.1	0.1	0.1	S/C
Agitación constante (rpm).	150	150	150	150
Tiempo de reacción (h)	96	96	96	96
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	100	100	100	100

S/C: Sin complejo enzimático.

3.2.7 Evaluación del pH en la hidrólisis enzimática.

En la evaluación de la estabilidad del complejo enzimático sobre el bagazo de agave en la hidrólisis enzimática, se usaron dos estrategias. Primero a) Valores de pH 4.2, 4.8, 5.0 y control negativo identificados en la Tabla 7 en negritas. Posteriormente, b) Concentración del buffer de acetatos 0.05M, 0.1M, 0.2 M, y control negativo identificados en la Tabla 8 en negritas y la metodología en la Figura 17 (página 26).

**Tabla 7.** Especificaciones de los experimentos para a) Valores de pH (4.2, 4.8, 5.0 y control negativo).

Parámetros	Experimento (por duplicado)			
Número del experimento	1	2	3	Control
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10
Temperatura de incubación (°C)	50	50	50	50
Diámetro de partícula (in), malla 40	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
Valor de pH	4.2	4.8	5.0	4.8
Buffer de acetatos 0.2 M/ ml	100	100	100	100
Volumen del complejo enzimático (ml /g de bagazo)	0.1	0.1	0.1	S/C
Agitación constante (rpm)	150	150	150	150
Tiempo de reacción (h)	96	96	96	96
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	100	100	100	100

S/C: Sin complejo enzimático.

Tabla 8. Especificaciones de los experimentos para b) Concentración del buffer de acetatos (0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, y control negativo).

Parámetros	Experimentos (por duplicado)			
Número de experimento	1	2	3	Control.
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10
Temperatura de incubación (°C)	50	50	50	50
Diámetro de partícula malla 40/in	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
Valor de pH	4.8	4.8	4.8	4.8
Concentración del buffer M	0.05	0.1	0.2	0.2
Buffer de acetatos ml	100	100	100	100
Volumen del complejo enzimático (ml /g de biomasa)	0.1	0.1	0.1	S/C
Agitación constante (rpm)	150	150	150	150
Tiempo de reacción (h)	96	96	96	96
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	100	100	100	100

S/C: Sin complejo enzimático.



3.2.8 Evaluación de diferentes diámetros de partícula en la hidrólisis enzimática.

A partir de la preparación de cuatro experimentos con diferentes diámetros de partícula se llevó a cabo la evaluación sobre el bagazo de agave con la metodología de la Figura 17 (página 26). Los diámetros de partícula de bagazo de agave seco recolectados después del proceso de molienda del bagazo y separados por tamices con número de malla/tamaño en pulgadas 12/0.0601 in, 25/0.0278 in, 40/0.0165 in y un control negativo, se identifican en la Tabla 9 en negritas.

Tabla 9. Especificaciones de los experimentos con bagazo de agave acondicionado para diferentes diámetros de partícula.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)				
Número del experimento	1	2	3	4	Control
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10	10
Temperatura de incubación (°C)	50	50	50	50	50
Diámetro de partícula malla 12/ in, malla 25/ in y malla 40/ in	S/R	0.0601	0.0278	0.0165	S/R
Valor de pH	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Buffer de acetatos 0.05 M/ ml	100	100	100	100	100
Volumen del complejo enzimático (ml /g de bagazo)	0.1	0.1	0.1	0.1	S/C
Agitación constante (rpm)	150	150	150	150	150
Tiempo de reacción (h)	96	96	96	96	96
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	100	100	100	100	100

S/C: Sin complejo enzimático; S/R: Sin reducción del diámetro de partícula

3.2.9 Evaluación de diferentes volúmenes del complejo enzimático.

Tomando en cuenta la recomendación del fabricante del complejo enzimático se evaluaron diferentes dosificaciones de este sobre el bagazo de agave en la hidrólisis enzimática evaluando cinco experimentos con los volúmenes del complejo enzimático de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml/g de biomasa y un control negativo ver Tabla 10 identificados en negritas y la metodología en la Figura 17 (página 26).



Tabla 10. Especificaciones de los experimentos con bagazo de agave sin pretratamiento para diferentes concentraciones del complejo enzimático.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)					
Número del experimento	1	2	3	4	5	Control.
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10	10	10
Temperatura de incubación (°C)	50	50	50	50	50	50
Diámetro de partícula (in), malla 40	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
Valor de pH	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Buffer de acetatos 0.05 M/ ml	100	100	100	100	100	100
Volumen del complejo enzimático (ml /g de bagazo)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	S/C
Agitación constante (rpm)	150	150	150	150	150	150
Tiempo de reacción (h)	120	120	120	120	120	120
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	100	100	100	100	100	100

S/C: Sin complejo enzimático.

3.2.10 Evaluación para diferentes concentraciones de sustrato.

La evaluación a diferentes concentraciones de sustrato se realizó para cuatro distintos experimentos con 30, 50, 100 y 150 g/L de bagazo y control negativo, sometidos a la hidrólisis enzimática con las variables de operación que se encuentran en la Tabla 11 identificados en negritas. La metodología se establece en la Figura 17 (página 26).

**Tabla 11.** Especificaciones de los experimentos para diferentes concentraciones del sustrato en la hidrólisis enzimática con bagazo sin pretratamiento.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)				
Número del experimento	1	2	3	4	Control.
Temperatura de incubación (°C)	50	50	50	50	50
Diámetro de partícula malla 40/in	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
Valor de pH	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Buffer de acetatos 0.05 M (ml)	100	100	100	100	100
Volumen del complejo enzimático (ml /g de bagazo)	0.1	0.1	0.1	0.1	S/C
Agitación constante (rpm)	150	150	150	150	150
Tiempo de reacción (h)	96	96	96	96	96
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	30	50	100	150	30

S/C: Sin complejo enzimático.

3.2 11 Evaluación de la hidrólisis del bagazo con pretratamiento para su posterior hidrólisis enzimática.

La estrategia experimental **b) hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido (H₂SO₄) o básico (NaOH)** se llevó a cabo con la metodología que se especifica en la Figura 18 y como ya se había mencionado en tablas posteriores se colocan las variables de operación y se resalta en letras negritas las modificaciones de cada experimento. Primero se evalúan los experimentos con pretratamiento y posteriormente los ensayos con la hidrólisis enzimática utilizando un sistema de trabajo por medio de sacrificio de matraces (cada 24 horas) por duplicado. El pretratamiento se realizó en autoclave (Tomy /ES-315), los catalizadores son (H₂SO₄ con 97.9% de pureza J. Baker.) y (NaOH de J. Baker).

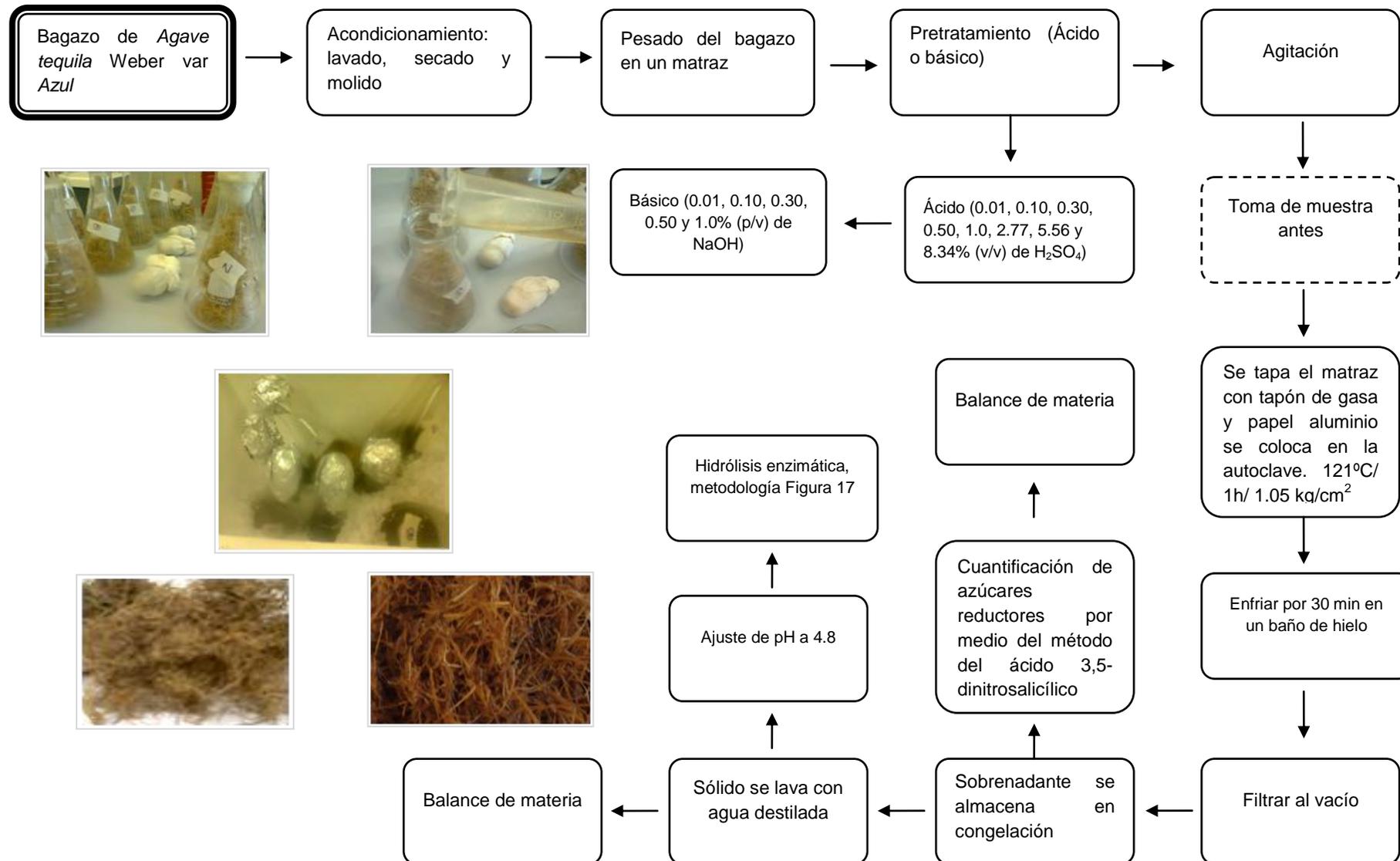


Figura 18. Esquema con la metodología para el pretreatmento y su posterior hidrólisis enzimática.

**3.2.12 Evaluación del pretratamiento con H₂SO₄ diluido sobre el bagazo de agave.**

Tomando en cuenta la metodología anterior (Figura 18) se realizó la evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido con la finalidad de establecer una concentración donde se obtenga la mayor productividad volumétrica sobre el bagazo de agave. Se evaluaron las concentraciones del ácido de 0.01, 0.10, 0.30, 0.50, 1.0 % (v/v) y un control negativo, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Especificaciones de los experimentos del bagazo de agave con pretratamiento ácido diluido.

Parámetro	Experimentos (por duplicado)					
Número del experimento	1	2	3	4	5	Control.
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10	10	10
Temperatura del autoclave (°C)	121	121	121	121	121	121
Presión kg/cm ²	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Diámetro de partícula (in)	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R
Medio acuoso H₂SO₄ % (v/v)	0.01	0.10	0.30	0.50	1.0	Agua
Volumen de medio acuoso (ml)	250	250	250	250	250	250
Tiempo de reacción (h)	1	1	1	1	1	1
Concentración inicial g/L, en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	40	40	40	40	40	40

S/R: Sin reducción del diámetro de partícula.

**3.2.13 Evaluación del pretratamiento con H₂SO₄ concentrado sobre el bagazo de agave.**

Después de evaluar concentraciones de ácido sulfúrico diluido, los resultados sugieren que se puede mejorar el proceso aumentando la concentración del catalizador con valores de 2.77, 5.56, 8.34 %(v/v) y un control negativo. Además, se evaluaron diferentes diámetros de partícula (separados por tamices con número de malla/tamaño en pulgadas (12/0.0601 in, 25/0.0278 in, 40 /0.0165 in y un control negativo). La metodología que se utilizó se establece en la Figura 18 (página 32). Se dividió en dos partes los experimentos por fines prácticos, en la Tabla 13 y 14 las especificaciones de los experimentos evaluados.

Tabla 13. Especificaciones de los experimentos del bagazo de agave con pretratamiento de ácido concentrado parte 1.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)					
Número del experimento	1	2	3	4	5	6
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10	10	10
Temperatura de autoclave(°C)	121	121	121	121	121	121
Presión kg/cm ²	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Diámetro de partícula malla/in 12, 25 y 40	S/R	0.0601	0.0278	0.0165	S/R	0.0601
Medio acuoso H₂SO₄ % (v/v)	2.77	2.77	2.77	2.77	5.56	5.56
Medio acuoso (ml)	250	250	250	250	250	250
Tiempo de reacción (h)	1	1	1	1	1	1
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	40	40	40	40	40	40

S/R: Sin reducción del diámetro de partícula

**Tabla 14.** Especificaciones de las muestras del bagazo de agave con pretratamiento de ácido concentrado parte 2.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)						
Número del experimento	7	8	9	10	11	12	Control.
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10	10	10	10
Temperatura de autoclave (°C)	121	121	121	121	121	121	121
Presión kg/cm ²	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Diámetro de partícula malla/ in 12, 25 y 40	0.0278	0.0165	S/R	0.0601	0.0278	0.0165	S/R
Medio acuoso H₂SO₄ % (v/v)	5.56	5.56	8.34	8.34	8.34	8.34	agua
Medio acuoso (ml)	250	250	250	250	250	250	250
Tiempo de reacción (h)	1	1	1	1	1	1	1
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	40	40	40	40	40	40	40

S/R: Sin reducción del diámetro de partícula

3.2.14 Evaluación del pretratamiento con NaOH diluido sobre el bagazo de agave.

El pretratamiento con el catalizador básico se realizó por medio de la metodología de la Figura 18 (página 32) en la Tabla 15 se encuentran las especificaciones de cada experimento a diferentes concentraciones de NaOH evaluando 0.01, 0.10, 0.30, 0.50, 1.0 % (p/v) y un control negativo.

**Tabla 15.** Especificaciones de los experimentos del bagazo de agave con pretratamiento básico diluido.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)					
Número del experimento	1	2	3	4	5	Control.
Bagazo de agave acondicionado (g)	10	10	10	10	10	10
Temperatura del autoclave (°C)	121	121	121	121	121	121
Presión kg/cm ²	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Diámetro de partícula.	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R
Medio acuoso NaOH % (p/v)	0.01	0.10	0.30	0.50	1.0	Agua
Medio acuoso (ml)	250	250	250	250	250	250
Tiempo de reacción (h)	1	1	1	1	1	1
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	40	40	40	40	40	40

S/R: Sin reducción del diámetro de partícula

3.2.15 Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) H₂SO₄.

La evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) de H₂SO₄ se llevó a cabo con las especificaciones de la Tabla 16.

Tabla 16. Especificaciones de los experimentos de hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)	
Número del experimento	1	Control.
Concentración del H₂SO₄ % (v/v) del pretratamiento	2.77	Agua
Condiciones de la hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido		
Bagazo de agave húmedo pretratado (g)	40	40
Temperatura de incubación (°C)	50	50
Diámetro de partícula	S/R	S/R
Valor de pH	4.8	4.8
Buffer de acetatos 0.05 M /ml	100	100
Tiempo de reacción (h)	96	96
Agitación (rpm)	150	150
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	400	400

S/R: Sin reducción del diámetro de partícula.



3.2.16 Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) NaOH.

En la Tabla 17 se presentan las especificaciones del ensayo sobre el bagazo pretratado con 0.5% (p/v) de NaOH y sometido a hidrólisis enzimática.

Tabla 17. Especificaciones de los experimentos de hidrólisis enzimática con pretratamiento básico.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)	
Número del experimento	1	Control.
Concentración del NaOH % (p/v) del pretratamiento	0.5	Agua
Condiciones de la hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido		
Bagazo de agave húmedo pretratado (g)	40	40
Temperatura de incubación (°C)	50	50
Diámetro de partícula	S/R	S/R
Valor de pH	4.8	4.8
Buffer de acetatos 05 M /ml	100	100
Tiempo de reacción (h)	96	96
Agitación (rpm)	150	150
Concentración inicial g/L en relación al sustrato y medio acuoso adicionado	400	400

S/R: Sin reducción del diámetro de partícula.

3.2.17 Balance de materia para la hidrólisis enzimática con pretratamiento (ácido y básico).

El balance de materia se realizó sobre el bagazo y el medio acuoso. Por lo tanto, se identifica a) Medio acuoso recolectado (ml) y b) Bagazo residual (g) expresado como peso seco.

Parte uno, a) Medio acuoso recolectado (ml), a partir del sobrenadante recuperado de la filtración al vacío que se hizo de acuerdo a las metodologías ya explicadas (Figura 17 y 18), se midió el volumen recolectado con una probeta y se registró el dato. Con el sólido recuperado de la misma operación unitaria se utilizó para la parte b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco. El bagazo se secó en estufa a 60°C por 24 horas y se realizó la metodología explicada anteriormente para la determinación de humedad en la página 23, los experimentos son por duplicado.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Determinación del contenido de humedad del bagazo de agave.

A partir de la recopilación de datos experimentales y del uso de la ecuación establecida en la Figura 16 (página 23) se elabora la Tabla 18. En promedio 10 g de bagazo de *Agave tequilana* Weber var. *Azul* tiene un contenido de humedad de 76.03% según el método de secado en estufa Nollet (1996). Por otra parte, en la literatura se reporta un valor de humedad de bagazo de *Agave tequilana* Weber var. *Azul* de 71 % (Arroyo, 2010; González, *et al.*, 2005).

Tabla 18. Contenido de humedad en el bagazo de agave.

Parámetros	Experimentos (por duplicado)			Promedio
	1	2	3	
Número del experimento				
Pesafiltros vacío (g)	0.87±0.02	0.89±0.10	0.75±0.40	0.83±0.17
Pesafiltros + muestra antes de secado (g)	10.87±0.10	10.88±0.30	10.76±0.20	10.83±0.2
Pesafiltros + muestra después de secado (g)	2.71±0.30	2.65±0.01	2.43±0.03	2.59±0.11
Contenido de humedad (%)	75.06	75.64	77.41	76.03

4.2 Efecto de la temperatura en la hidrólisis enzimática.

La primer parte de los resultados son para el método a) hidrólisis enzimática (bagazo sin pretratamiento).

El efecto de la temperatura se manifiesta al observar un cambio en la liberación de azúcares reductores. Se presenta el promedio de las muestras obtenidas de la cuantificación del sobrenadante obtenido a partir de la hidrólisis enzimática a diferentes temperaturas de incubación 50°C, 55°C y 60°C en la Figura 19, bajo las condiciones establecidas de ensayo sobre bagazo de agave. En la Tabla 19 se presentan los valores que se obtuvieron para la productividad volumétrica de los experimentos y el rendimiento de hidrólisis.

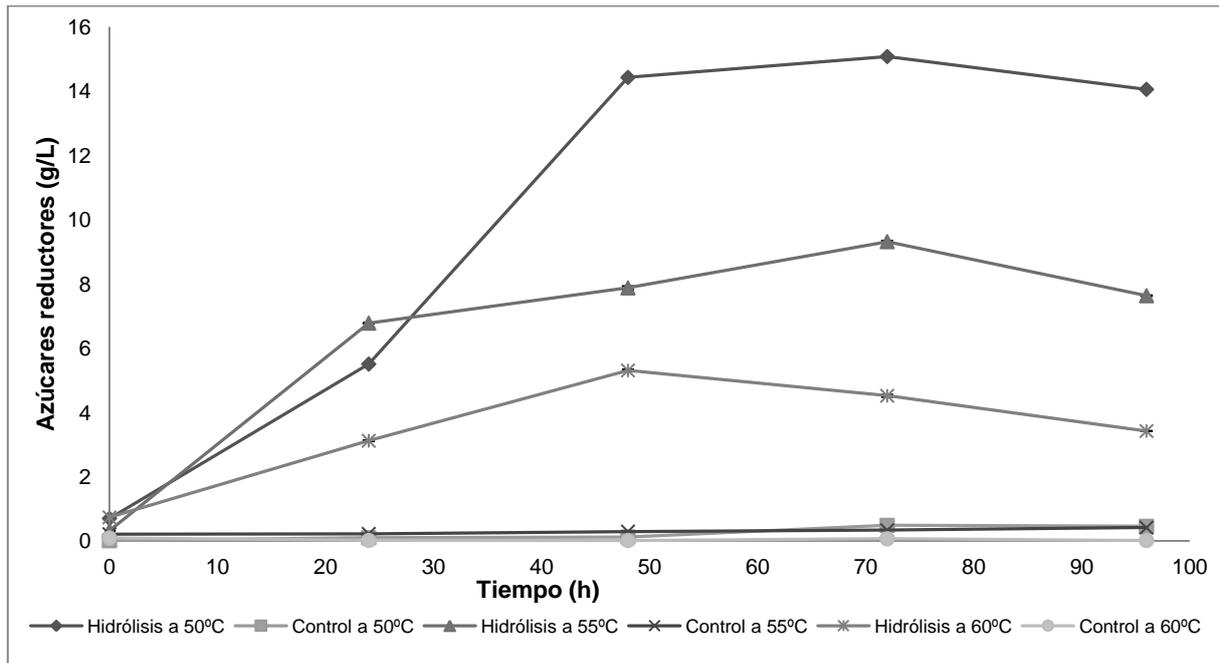


Figura 19. Comparación a diferentes temperaturas 50°C, 55°C y 60°C en la hidrólisis enzimática sin pretratamiento sobre el bagazo de agave. Condiciones: 10% sólidos, pH 4.8, volumen del complejo enzimático 0.1 ml/ g bagazo, 150 rpm, 96 h, diámetro de partícula malla 40/0.0165 in, concentración inicial 100 g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con el marcador de cada punto.

Tabla 19. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de hidrólisis de 72 horas con la finalidad de observar el efecto de la temperatura.

Experimento (por duplicado)	Temperatura	Azúcares reductores (g/L)	P_v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	50°C	15.07±0.03	0.21	15.07
2	55°C	9.31±0.001	0.13	9.31
3	60°C	4.51±0.04	0.06	4.51
Control negativo.	50°C	0.48±0.006	6.66×10^{-3}	0.48
Control negativo.	55°C	0.33±0.003	4.58×10^{-3}	0.33
Control negativo.	60°C	0.06±0.007	8.33×10^{-4}	0.06

*Productividad volumétrica (P_v).

De acuerdo a los resultados, se obtiene la mayor productividad volumétrica para la temperatura de 50°C, con un valor de 0.21 g/L h. Cuando se aumenta 5°C la temperatura, se observa que disminuye la productividad volumétrica en un 38.1% respecto al mayor valor de productividad volumétrica. Por otra parte, observamos una disminución del 71.42% en la productividad volumétrica cuando la temperatura aumenta 10°C. El efecto de la temperatura es un parámetro importante de acuerdo a las condiciones de operación



establecidas, que afecta la actividad del complejo enzimático, aumentando o disminuyendo la liberación de azúcares reductores. Verificamos que la temperatura de 50°C que el fabricante (Genencor, 2012) establece como óptima, es la misma temperatura en la que obtuvimos la mayor productividad volumétrica.

En la literatura se sabe que la hidrólisis enzimática sobre biomasa lignocelulósica normalmente se lleva a cabo por enzimas denominadas celulasas, con una alta especificidad. Dicha hidrólisis se lleva a cabo bajo condiciones de temperatura de 45-50°C y un valor de pH de 4.8 (Sun, 2002).

En la Figura 20 se muestran los resultados de la cuantificación de los azúcares totales de acuerdo al método de fenol-sulfúrico y para los azúcares reductores con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico cuantificados a partir del sobrenadante obtenido de la hidrólisis enzimática para un tiempo de 72 horas de hidrólisis. Con los datos se elabora la gráfica (Figura 20) a partir de las muestras de los experimentos a diferente temperatura 50°C, 55°C, 60°C.

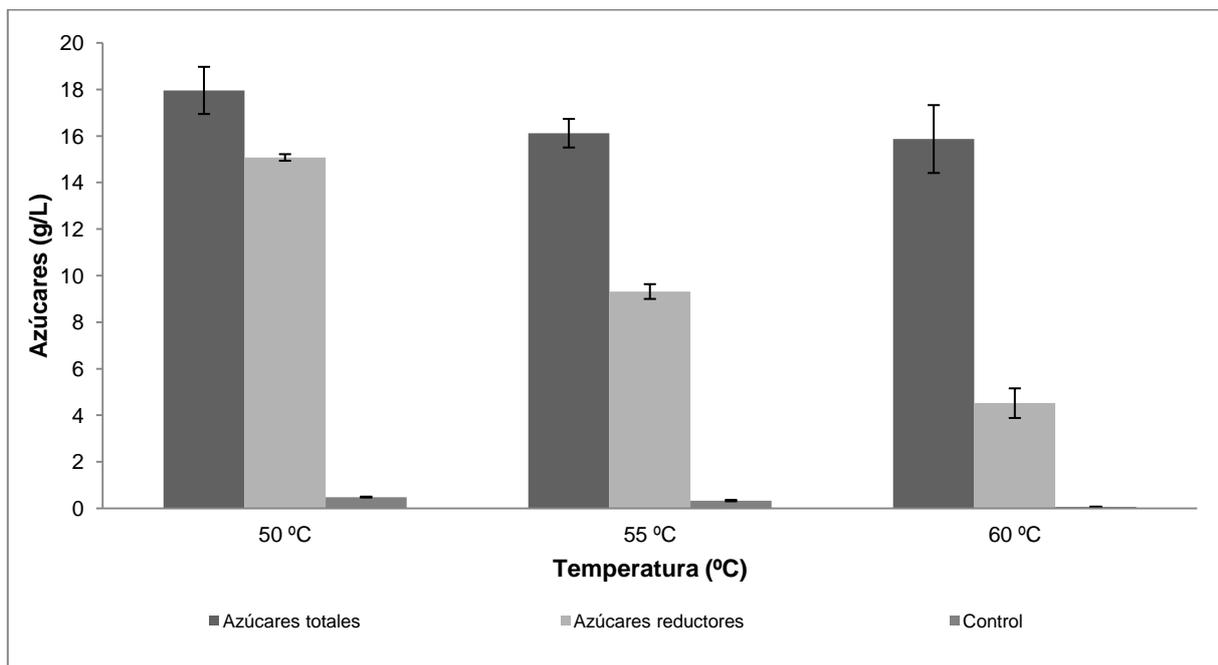


Figura 20. Comparación de azúcares totales y azúcares reductores a diferente temperaturas 50,55 y 60°C la cuantificación es para la muestra tomada después de la hidrólisis enzimática sin pretratamiento sobre el bagazo de agave en el tiempo de 72 horas. Condiciones: 10% sólidos, pH 4.8, volumen del complejo enzimático 0.1 ml/ g bagazo, 150 rpm, 96 h, diámetro de partícula malla 40/0.0165in, concentración inicial 100g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar.



Probablemente, en la Figura 20 se obtenga sólo a los azúcares solubles y no es un ensayo que represente la mayor cantidad de azúcares totales presentes en el bagazo de agave. Creemos que esta evaluación no es representativa, ya que la mayor parte de azúcares se encuentran en la parte insoluble en forma de bagazo residual que no hidrolizado formando parte de los polímeros de celulosa y hemicelulosa. Tomando en cuenta los resultados experimentales y lo reportado en la literatura, se consideró que para los ensayos posteriores se usara la temperatura de 50°C.

4.3 Efecto del pH en la hidrólisis enzimática.

El efecto del pH se dividió en dos partes, primero se evaluó el efecto al modificar el valor del pH (Figura 21). Posteriormente se evaluó el efecto en la concentración del buffer de acetatos ver (Figura 22). La productividad volumétrica se presenta en la Tabla 20 y 21 respectivamente.

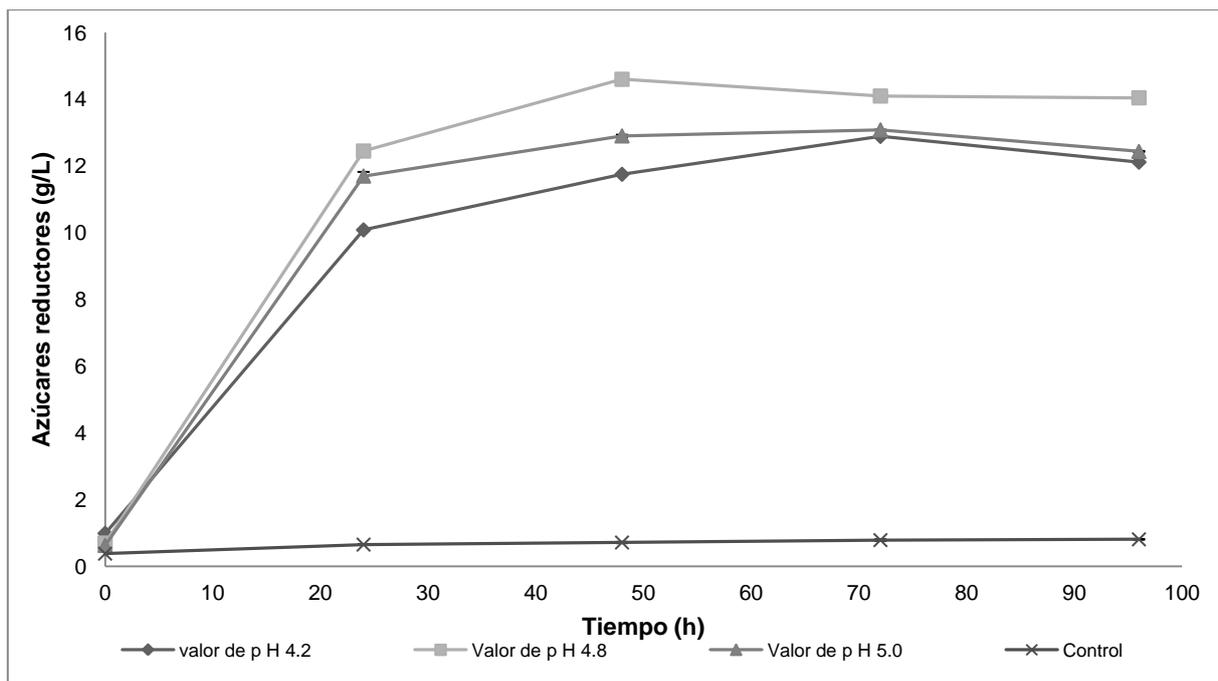


Figura 21. Hidrólisis enzimática sobre el bagazo de agave con diferentes valores de pH (4.2, 4.8 y 5.0). Condiciones: 10% de sólidos, volumen del complejo enzimático 0.1 ml/ g bagazo, 50 °C, 150 rpm, 96 h, diámetro de partícula malla 40/0.0165 in, concentración inicial 100 g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con el marcador de cada punto.

Los resultados establecen que la mayor productividad volumétrica es para el valor de pH de 4.8 con un valor de 0.17 g/L h. El experimento con un valor de pH de 4.2, es diferente en un 10.52 % respecto al valor mayor obtenido, y cuando se utiliza un valor de pH de 5.0 la diferencia disminuye y se obtiene un valor de 5.26%. Probablemente, si utilizáramos un



valor de pH menor a 4.2 la productividad volumétrica disminuiría, por lo tanto, para ensayos posteriores se utilizará un valor de pH de 4.8 o cercano a 5.0. Se verifico el valor de pH de cuerdo al fabricante (Genencor, 2012) con un valor de 4.8, bajo las condiciones de ensayo establecidas.

Tabla 20. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de hidrólisis de 72 horas.

Experimento (por duplicado)	Valor de pH	Azúcares reductores (g/L)	P _v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	4.2	12.88 ±0.01	0.17	12.88
2	4.8	14.09 ±0.01	0.19	14.09
3	5.0	13.08 ±0.001	0.18	13.08
Control negativo	4.8	0.81 ± 0.02	0.01	0.81

*Productividad volumétrica (P_v).

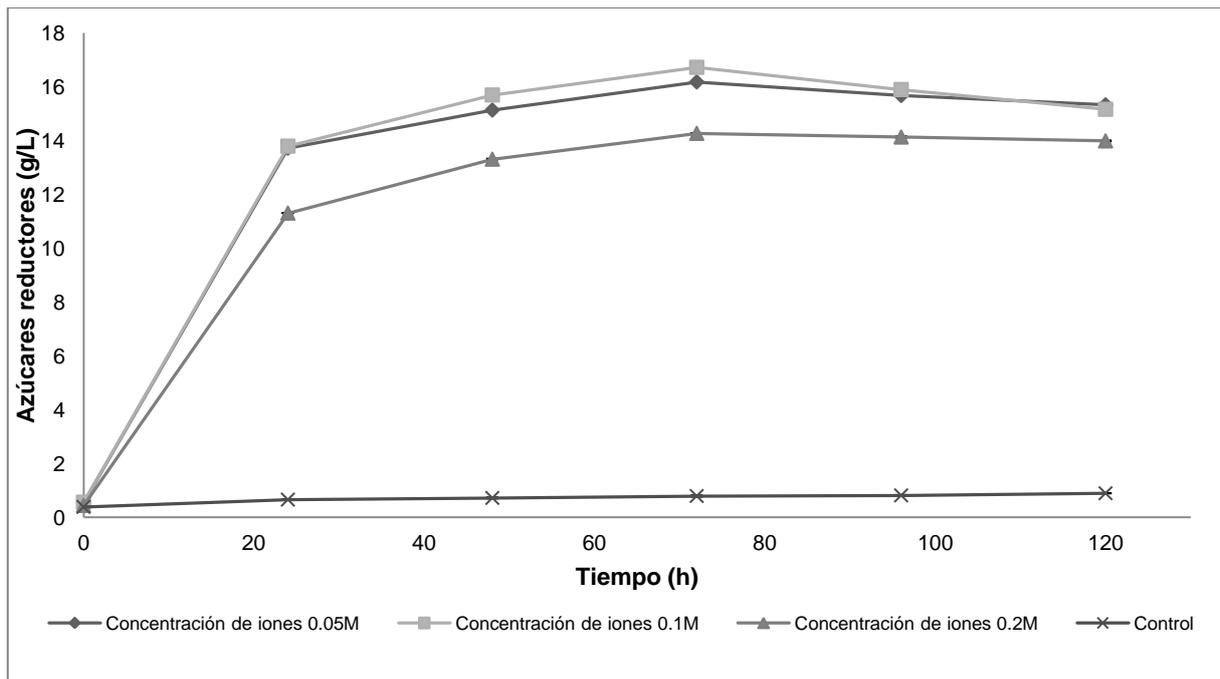


Figura 22. Hidrólisis enzimática sobre el bagazo de agave con diferentes concentraciones del buffer de acetatos (0.05 M, 0.1 M y 0.2 M). Condiciones: 10% de sólidos, volumen del complejo enzimático 0.1 ml/ g bagazo, pH 4.8, 50 °C, 150 rpm, 96 h, diámetro de partícula malla 40/ 0.0165 in, concentración inicial 100 g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con el marcador de cada punto.

El efecto de la concentración del buffer de acetatos afecta la productividad volumétrica, la mayor productividad se muestra cuando tenemos una concentración del buffer de acetatos de 0.1 M con un valor de 0.23 g/L h (ver Tabla 21); sin embargo cuando se



disminuye esta concentración a la mitad se obtiene un valor de 0.22 g/L h y una diferencia respecto a la mayor de 4.34%. Pero si se aumenta la concentración al doble, se obtienen una menor productividad volumétrica con una diferencia respecto a la mayor de 17.39%. En este caso se decidió que por costos de producción se utilizará una concentración de 0.05 M.

Tabla 21. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de hidrólisis de 72 horas. Efecto a diferentes concentraciones del buffer de acetatos.

Experimento (por duplicado)	Concentración del buffer de acetatos M	Azúcares reductores (g/L)	P _v (g/L h).	Rendimiento de hidrólisis %
1	0.05	16.18±0.02	0.22	16.18
2	0.1	16.72±0.01	0.23	16.72
3	0.2	14.26±0.01	0.19	14.26
Control negativo	0.2	0.84±0.02	0.01	0.84

*Productividad volumétrica (P_v).

4.4 Efecto del diámetro de partícula en la hidrólisis enzimática.

La accesibilidad de las enzimas celulolíticas sobre un sustrato lignocelulósico influye en el proceso de hidrólisis. Por lo tanto, uno de los principales objetivos con la disminución del diámetro de la partícula, es aumentar el área superficial disponible para la adsorción de las enzimas y así hidrolizar el sustrato (Alvira, *et al.*, 2010). En la evaluación a diferentes diámetros de partícula, se muestran los resultados en la Figura 23, y en la Tabla 22 se presenta la productividad volumétrica.

Tabla 22. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de hidrólisis de 72 horas. Efecto a diferentes diámetros de partícula.

Experimento (por duplicado)	Diámetro de partícula (malla/tamaño en pulgadas)	Azúcares reductores (g/L).	P _v (g/L h).	Rendimiento de hidrólisis %
1	*S/R	8.18±0.006	0.11	8.18
2	12/0.0601 in	9.54±0.01	0.13	9.54
3	25/0.0278 in	10.51 ±0.03	0.14	10.51
4	40/0.0165 in	13.78 ±0.007	0.19	13.78
Control negativo	*S/R	0.31±0.02	4.3 x 10 ⁻³	0.31

*Productividad volumétrica (P_v); *Sin reducción (S/R).

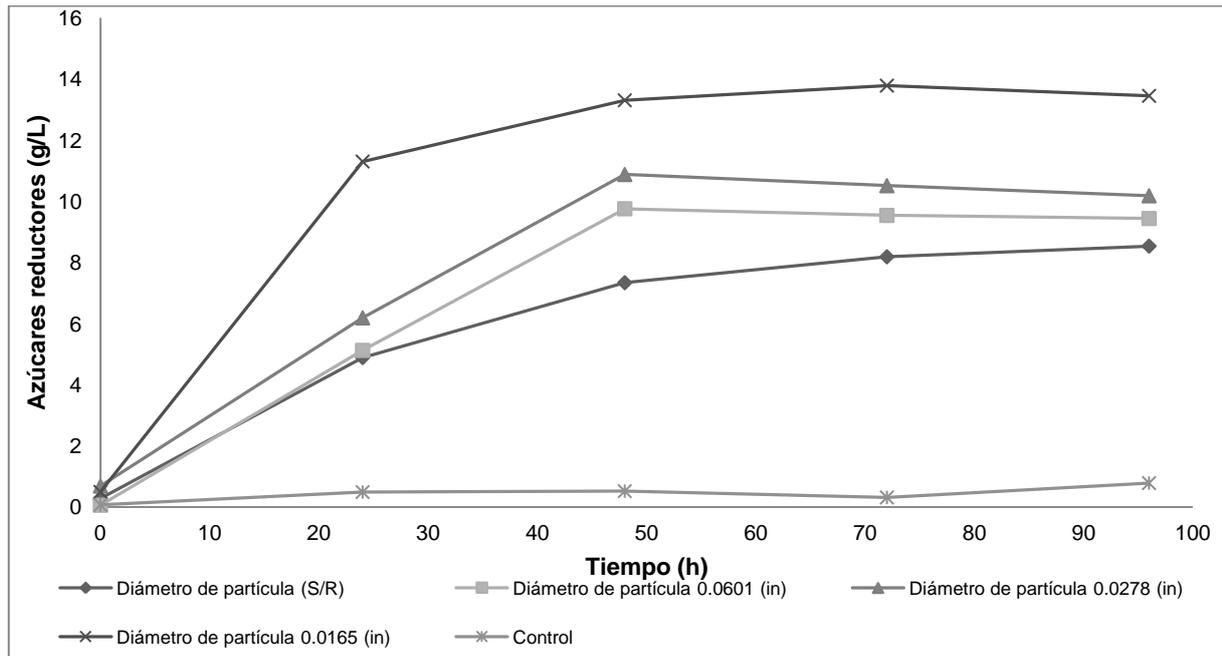


Figura 23. Evaluación de la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de agave con distintos diámetros de partícula (S/R, malla 12/ 0.0601in, malla 25/0.0278 in y malla 40/0.0165 in). Condiciones: 10% sólidos, pH 4.8, volumen del complejo enzimático 0.1 ml/ g bagazo, 50° C, 150 rpm, 96 h. Concentración inicial 100 g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con el marcador de cada punto.

Cuando se utilizó un diámetro de partícula de malla/tamaño en pulgadas 40/0.0165 in se obtuvo la mayor productividad con un valor de 0.19 g/L h. Para los diferentes experimentos, las productividades volumétricas se muestran en la tabla 25, respecto a la mayor productividad volumétrica, se presenta una diferencia en los experimentos de 42.10% con diámetro de partícula (S/R sin reducción), 31.57% con diámetro de partícula/tamaño en pulgadas 12/0.0601 in y 26.31% con diámetro de partícula/ tamaño en pulgadas 25/0.0278 in todas respecto a la mayor productividad volumétrica.

En la Tabla 23 se presenta una referencia experimental de la evaluación que realiza Soares, *et al.*, (2011) sobre el bagazo de caña de azúcar y concluye que la molienda de bagazo de caña de azúcar no influyó significativamente en la producción de glucosa por hidrólisis enzimática.

El material lignocelulósico puede someterse a una disminución del diámetro de partícula por medio de una trituración mecánica para reducir la cristalinidad de la celulosa. Por ejemplo, en residuos provenientes de la madera se han obtenido mejores rendimientos en la hidrólisis enzimática por efecto de la disminución de la cristalinidad de la celulosa (Sun, 2002).



Tabla 23. Valoración de los resultados experimentales de hidrólisis enzimática sobre el bagazo de agave con respecto a valores reportados en la literatura bajo condiciones de tratamientos similares y/o diferentes.

Sustrato	Variable de operación del pretratamiento	Referencia
Bagazo de caña de azúcar.	Matraz Erlenmeyer (50°C/ 200 rpm/ pH 4.8/mezcla de dos complejos comerciales Celluclast 1.5L y Novozym 188). Determinaciones de azúcares por HPLC.	(Soares, et al., 2011).
Bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber.	Matraz Erlenmeyer (50°C/ 150rpm/ pH 4.8/Complejo enzimático comercial accellerse 1500 de Genencor). Determinación de azúcares reductores por el método de (DNS).	Este trabajo

4.5 Efecto de la adición de diferentes volúmenes del complejo enzimático en la hidrólisis enzimática.

La adición de diferentes volúmenes del complejo enzimático para los experimentos a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml/g de bagazo sobre el bagazo de agave en la hidrólisis enzimática se realizó bajo la consideración de que la actividad de las dos enzimas que forman parte del complejo enzimático permanece constante, con los valores establecidos por el fabricante de Endo-glucanasa 2200-2800 CMC U/g y β -glucosidasa 525 a 775 PNPG U /g (Genencor, 2012). Los resultados se presentan en la gráfica de la Figura 24 y las productividades volumétricas en la Tabla 24.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la productividad volumétrica, el valor mayor es de 0.21 g/L h, cuando se utiliza un volumen de 0.5 (ml/g de bagazo). Se presenta una diferencia con los demás experimentos de 14.28% con 0.1 (ml/ g de bagazo); 9.52 % con 0.2 (ml/ g de bagazo); 4.76% para dos volúmenes 0.3 (ml/ g de bagazo) y 0.4 (ml/ g de bagazo). A pesar de que hay un diferencia de 14.28% con 0.1 (ml/ g de bagazo), se decidió tomar este volumen para el resto de las hidrolisis enzimáticas, por costos. La velocidad de respuesta en la producción de azúcares reductores refleja la velocidad de la actividad del complejo enzimático a diferentes volúmenes de dosificación como se aprecia en la Figura 24.

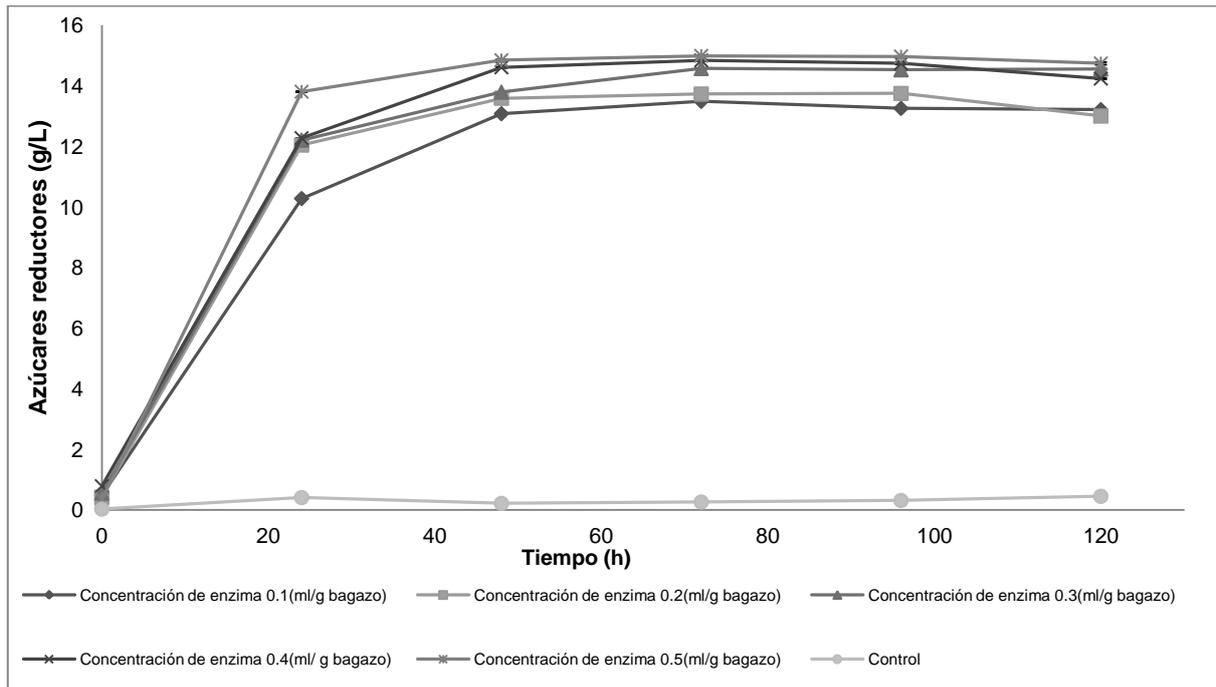


Figura 24. Diferentes volúmenes del complejo enzimático 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml/g de bagazo para la hidrólisis enzimática sobre bagazo de agave. Condiciones 10% sólidos, pH 4.8, 50°C, 150 rpm, 120 h, diámetro de partícula malla 40/0.0165 in. Concentración inicial 100 g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con el marcador de cada punto.

Tabla 24. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de hidrólisis de 72 horas. Efecto a diferentes volúmenes.

Experimento (por duplicado)	Volumen del complejo enzimático (ml/g bagazo)	Azúcares reductores (g/L)	P_v (g/L h).	Rendimiento de hidrólisis %
1	0.1	13.48±0.02	0.18	13.48
2	0.2	13.47±0.007	0.19	13.47
3	0.3	14.57 ±0.01	0.20	14.57
4	0.4	14.84 ±0.001	0.20	14.84
5	0.5	14.99 ±0.03	0.21	14.99
Control negativo	0.1	0.26±0.009	3.61×10^{-3}	0.26

*Productividad volumétrica (P_v).

4.6 Efecto de diferentes concentraciones de sustrato en la hidrólisis enzimática.

La evaluación a diferentes concentraciones de sustrato en la hidrólisis enzimática a través del monitoreo cada 24 horas se muestra en la Figura 25. Se presenta en la Tabla 25 la productividad volumétrica para cada experimento.

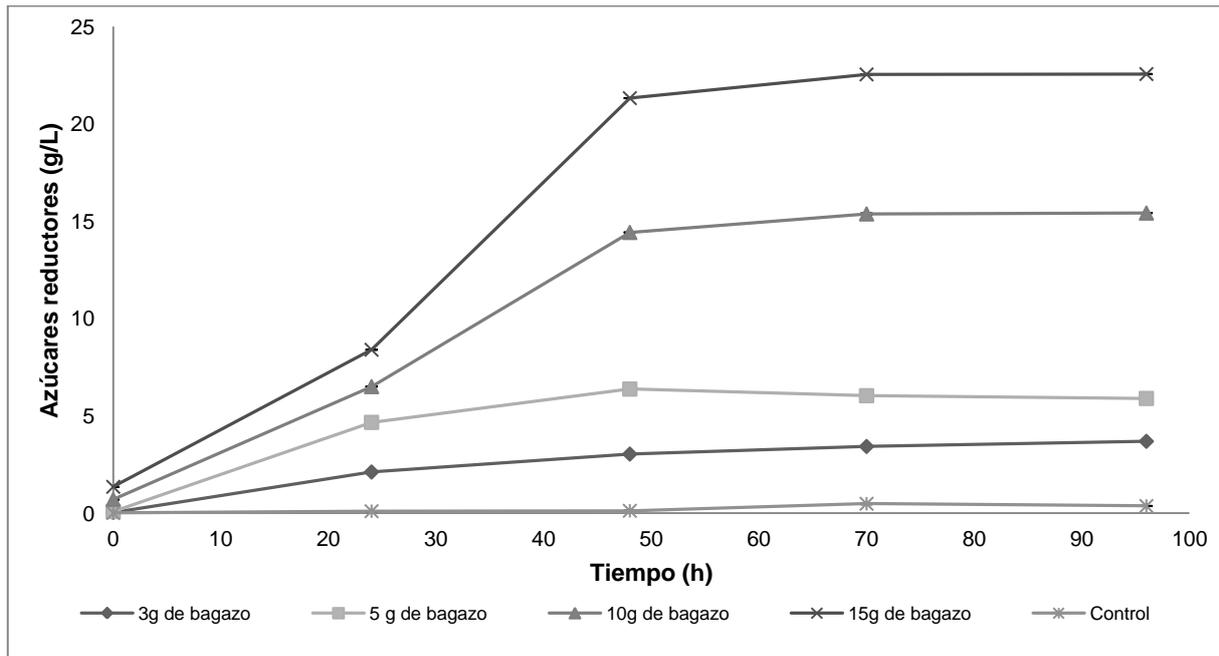


Figura 25. Comparación de diferentes concentraciones de sustrato durante la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de agave. Condiciones: 10% de sólidos, pH 4.8, (30, 50, 100 y 150 g/L de bagazo), volumen del complejo enzimático 0.1 ml/ g bagazo, 50 °C, 150 rpm, 96 h, diámetro de partícula malla 40/ 0.0165 in, concentración inicial 100 g/L. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con el marcador de cada punto.

La mayor productividad volumétrica se obtuvo con 150 g/L de bagazo con un valor de 0.31 g/L h (Tabla 25). Para los experimentos posteriores, se obtuvo una diferencia en la productividad volumétrica respecto al valor mayor de 87.09% con 30 g/L de bagazo; 74.19% para 50 g/L de bagazo; 32.25% con 100 g/L de bagazo. Sin embargo, para hidrólisis enzimáticas posteriores se decidió utilizar 100 g/L de bagazo en lugar de 150 g/L de bagazo. Un aumento de la concentración de sustrato normalmente resulta en un aumento de rendimiento y de la velocidad de la hidrólisis (Sun, 2002).

Tabla 25. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de hidrólisis de 72 horas. Efecto a diferentes concentraciones de sustrato.

Experimento (por duplicado)	Sustrato (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	P_v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	30	3.42±0.006	0.04	1.02
2	50	6.03±0.01	0.08	3.01
3	100	15.37 ±0.03	0.21	15.37
4	150	22.54 ±0.01	0.31	33.81
Control negativo	30	0.48±0.03	6.66 x 10 ⁻³	1.6

*Productividad volumétrica (P_v).



4.7 Pretratamiento con ácido sulfúrico para su posterior hidrólisis enzimática.

El pretratamiento con H_2SO_4 se dividió en dos etapas, primero se utilizó ácido con las concentraciones 0.01, 0.10, 0.30, 0.50, 1.0 % (v/v) H_2SO_4 (los resultados se muestran en la Figura 26). Posteriormente, se evaluarón las concentraciones de 2.77, 5.56 y 8.34% (v/v) H_2SO_4 y diámetros de partícula de S/R (sin reducción), malla/tamaño en pulgadas 12/ 0.0601 in, malla/tamaño en pulgadas 25/0.0278 in y malla/tamaño en pulgadas 40/0.0165 in (ver Figura 27). Las productividades volumétricas de las dos partes se presentan en las Tablas 26, 27 y 28 respectivamente.

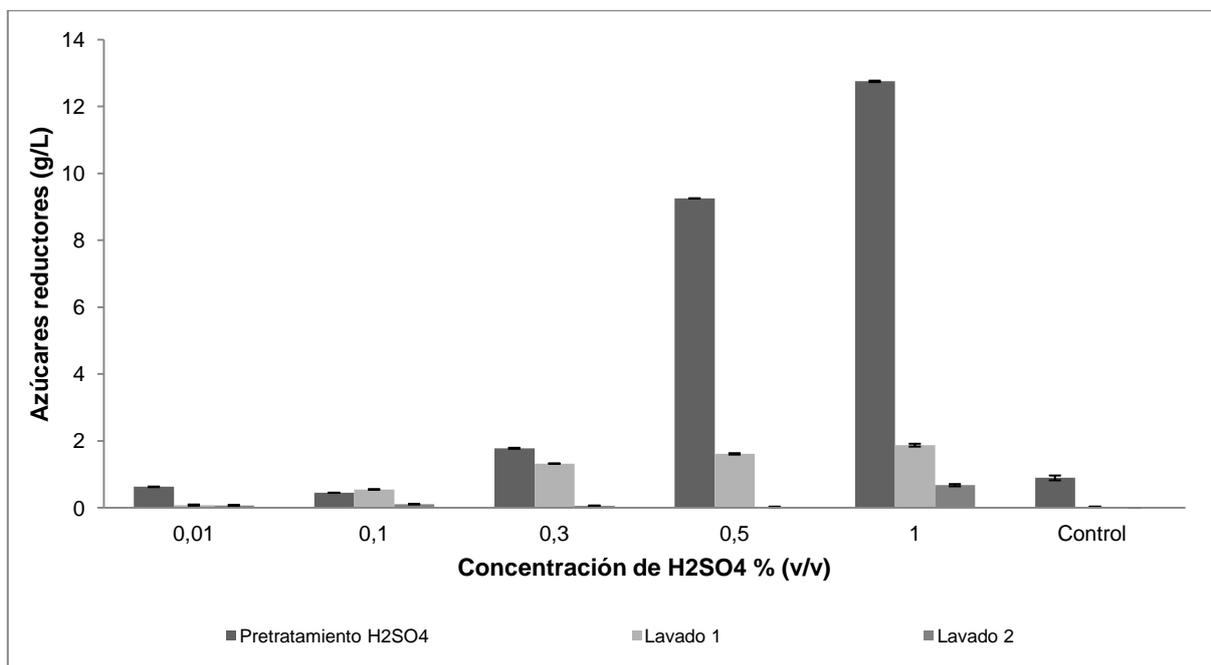


Figura 26. Pretratamiento con H_2SO_4 a diferentes concentraciones 0.01, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0% (v/v), diámetro de partícula S/R (sin reducción). Condiciones: 10% de sólidos, tiempo de residencia 1 hora en autoclave a $121^{\circ}C$ $1.05kg/cm^3$, concentración inicial 40 g/L de bagazo. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar en todas las barras.

La mayor productividad volumétrica se obtiene al utilizar una concentración de 1.0% (v/v) de H_2SO_4 , con un valor de 12.75 g/L h. La diferencia de los demás experimentos, respecto al valor mayor de la productividad volumétrica es de 95.13% con 0.01% (v/v) de H_2SO_4 ; 96.47 % con 0.10 % (v/v) de H_2SO_4 ; 86.03% con 0.30 % (v/v) de H_2SO_4 ; 27.45% con 0.50 % (v/v) de H_2SO_4 . Por lo tanto, entre menor es la concentración de H_2SO_4 la productividad volumétrica disminuye. Se decidió aumentar la concentración del H_2SO_4 para determinar si se lograba aumentar la productividad volumétrica.

**Tabla 26** Productividad volumétrica expresada para un tiempo de pretratamiento de 1 hora en autoclave.

Experimento (por duplicado)	Concentración de H ₂ SO ₄ % (v/v)	Azúcares reductores (g/L)	P _v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	0.01	0.62±0.006	0.62	0.24
2	0.10	0.45±0.01	0.45	0.18
3	0.30	1.78 ±0.02	1.78	0.71
4	0.50	9.25 ±0.003	9.25	3.7
5	1.0	12.75±0.03	12.75	5.1
Control negativo	Agua destilada.	0.89±0.05	0.89	0.35

*Productividad volumétrica (P_v). S/R (sin reducción)**Tabla 27.** Productividad volumétrica expresada para el pretratamiento con H₂SO₄ a 1 hora, parte 1.

Parámetro	Experimento (por duplicado)					
Diámetro de partícula	*S/R			12/0.0601 in		
Concentración de H ₂ SO ₄	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %
2.77% (v/v)	15.99±0.003	15.99	6.39	15.91±0.006	15.91	6.36
5.56% (v/v)	10.46±0.014	10.46	4.18	11.46±0.005	11.46	4.58
8.34% (v/v)	7.45±0.01	7.45	2.98	6.89±0.01	6.89	2.95
Control negativo	0.89±0.03	0.89	0.35			

*Productividad volumétrica (P_v); *Azúcares reductores (AR).

**Tabla 28.** Productividad volumétrica expresada para el pretratamiento con H₂SO₄ de 1 hora, parte 2.

Parámetro	Experimento (por duplicado)					
Diámetro de partícula	25/0.0278 in			40/0.0165 in		
Concentración de H ₂ SO ₄	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %
2.77% (v/v)	15.99±0.008	15.99	6.39	16.45±0.009	16.45	6.58
5.56% (v/v)	11.31±0.006	11.31	4.52	5.45±0.004	15.45	6.18
8.34% (v/v)	9.24±0.01	9.24	3.81	15.39±0.01	15.39	6.15

*Productividad volumétrica (P_v); *Azúcares reductores (AR).

Los resultados de la Tabla 27 y 28 indican que de acuerdo a las condiciones de operación y a las evaluaciones realizadas, se obtiene la mayor productividad volumétrica al utilizar una concentración de 2.77% (v/v) de H₂SO₄ con un diámetro de partícula de malla/tamaño en pulgadas 40/0.0165in con un valor de 16.45 (g/L h) y un rendimiento de hidrólisis de 41.12 %.

En la Tabla 29 se muestra las diferencias en porcentaje de todos los experimentos evaluados para el pretratamiento con H₂SO₄ a diferentes concentraciones y diámetros de partícula respecto al experimento donde se obtuvo la mayor productividad volumétrica. Además se establece que no es necesario la disminución del diámetro de partícula al utilizar una concentración de 2.77% (v/v) de H₂SO₄. Si se disminuye el diámetro de partícula, hay mayor gasto de energía que productividad volumétrica, siendo la diferencia de menos del 5% respecto a la mayor productividad volumétrica. Para la concentración de 5.56% (v/v) con H₂SO₄, se observa que la menor diferencia respecto a la mayor productividad es cuando se obtiene un diámetro partícula de (40/0.0165 in) con un porcentaje de 6.07%. Para la concentración 8.34% (v/v) con H₂SO₄, se obtiene algo muy similar con un porcentaje de 6.44%. Sin embargo, al comparar estas dos concentraciones respecto a 2.77% (v/v) con H₂SO₄ donde se obtiene la mayor productividad se observa un mayor gasto de energía, de reactivos y una menor productividad volumétrica. Para posteriores pretratamientos con H₂SO₄, se sugiere emplear la concentración de 2.77% (v/v) H₂SO₄ sin reducción del diámetro de partícula.



Tabla 29. Comparación de las productividades volumétricas de los ensayos con pretratamiento con H₂SO₄ a diferentes concentraciones y diámetros de partícula.

Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de H ₂ SO ₄ 2.77% (v/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	2.79	3.28	2.79	100
Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de H ₂ SO ₄ 5.56% (v/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	36.41	30.33	31.24	6.07
Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de H ₂ SO ₄ 8.34% (v/v)			
Diámetro de partícula.	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	54.71	58.11	43.82	6.44

*A: Es la diferencia en porcentaje que se obtienen al tomar como 100% el valor mayor de productividad volumétrica de acuerdo a los experimentos evaluados. La mayor productividad volumétrica se obtiene al utilizar una concentración de 2.77% (v/v) de H₂SO₄ con un diámetro de partícula de malla 40/0.0165in, con un valor de 16.45 g/L h. *S/R (sin reducción).

En la Figura 27 se muestra el pretratamiento con H₂SO₄ a diferentes concentraciones 2.77, 5.56 y 8.34% (v/v) y diferentes diámetros de partícula como se mencionó anteriormente. Así como los azúcares reductores cuantificados en los lavados que se le realizó al bagazo de agave después del proceso de filtración que se especifica en la metodología (Figura 18 página 32).

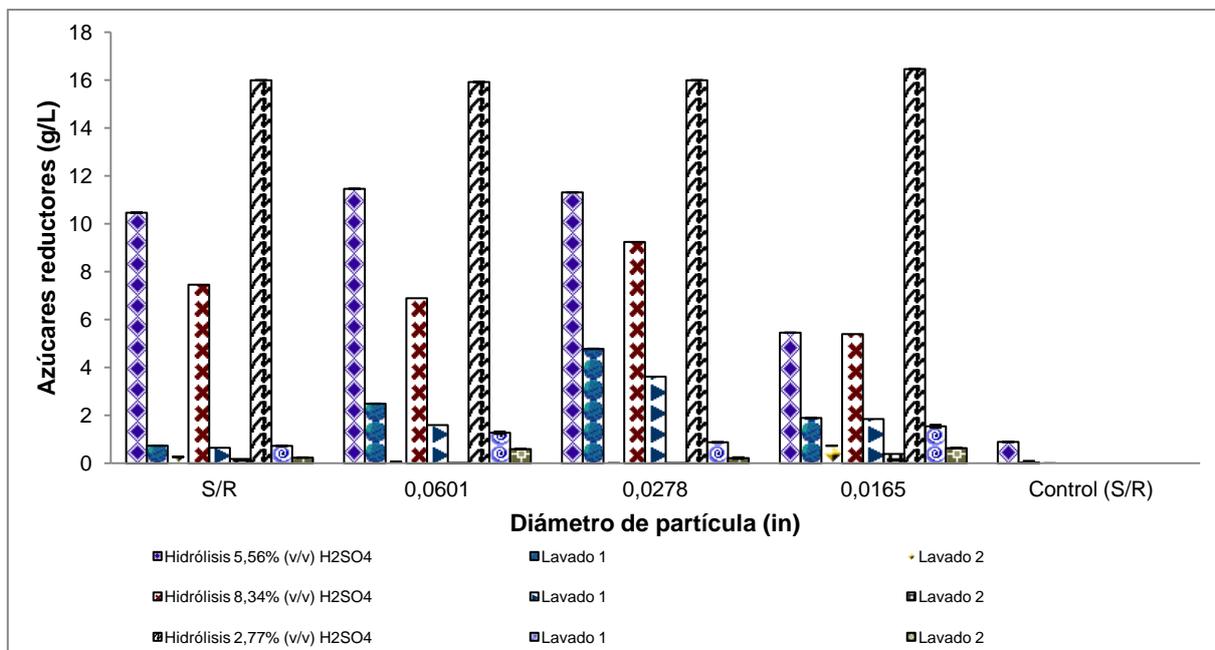


Figura 27. Pretratamiento con H₂SO₄ con las concentraciones 2.77%, 5.56 % y 8.34% (v/v) y diámetros de partícula S/R, 0.0601, 0.0278, 0.0165 in. Condiciones: 10% de sólidos, tiempo de residencia 1 hora en autoclave a 121°C 1.05kg/cm², concentración inicial 40 g/L de bagazo. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar en todas las barras. *S/R (sin reducción).



En la literatura se encuentra reportes de pretratamiento ácido para distintos sustratos lignocelulósicos. En la Tabla 30 se presentan dos estudios de pretratamientos ácidos sobre bagazo de agave y bagazo de caña. De acuerdo a los dos reportes, se observó que la liberación de azúcares reductores sobre nuestro sustrato es 15.47 veces superior que el valor reportado por Domínguez, *et al.*, (2011) para bagazo de caña. Pero inferior al reportado por Saucedo, *et al.*, (2010) sobre bagazo de agave en 8.45 veces. Las diferencias en las variables de operación y la naturaleza de sustrato contribuyen en la eficiencia del pretratamiento.

Tabla 30. Valoración de los resultados experimentales para el pretratamiento con H₂SO₄ sobre el bagazo de agave, con valores reportados en la literatura en condiciones de operación similares y diferentes.

Sustrato	Variable de operación del pretratamiento.	Azúcares reductores (g/L)	Referencia.
Bagazo de Agave tequilana Weber	Reactor (Parr Instruments, modelo 5000) 2% de H ₂ SO ₄ . / 147°C /15 min, 0.2 in diámetro de partícula.	24.9	(Saucedo, <i>et al</i> , 2010)
Bagazo de caña	Matraz de tres bocas/sistema de reflujo sobre parrilla 2 % de H ₂ SO ₄ /45° C /1h, 0.2 in diámetro de partícula.	0.98	(Domínguez, <i>et al</i> , 2011).
Bagazo de Agave tequilana Weber	Matraz/ autoclave. 2.77 % de H₂SO₄ /121 °C / 1h, diámetro de partícula S/R (sin reducción).	16.45	Este trabajo

4.8 Balance de materia para el pretratamiento con 2.77% (v/v) de H₂SO₄.

El balance de materia prima se divide en dos partes *a) Medio acuoso recolectado (ml)* se muestra en la Figura 28. Para la segunda parte *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco* Figura 29.

La Figura 28 muestra que hay una disminución del volumen del medio acuoso, en un inicio se adicionaron 250 ml de la disolución de H₂SO₄ a 2.77 % (v/v). Probablemente hay una evaporación por las condiciones del tratamiento y para contrarrestar el mismo es necesario ajustar el volumen con agua destilada después del pretratamiento, como lo establece González, *et al.*, (2011) al realizar un pretratamiento usando un catalizador básico sobre una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades.

Como consecuencia de los resultados obtenidos para el pretratamiento con H₂SO₄ al 2.77% (v/v) se decidió ajustar los azúcares reductores cuantificados a partir del sobrenadante recolectado después del pretratamiento. En la Tabla 31 se muestran los



resultados obtenidos con la corrección que se realiza para las muestras obtenidas después del pretratamiento tomando en cuenta el volumen recolectado para cada experimento y el resultado se expresa como concentración de azúcares reductores en g/L corregidos.

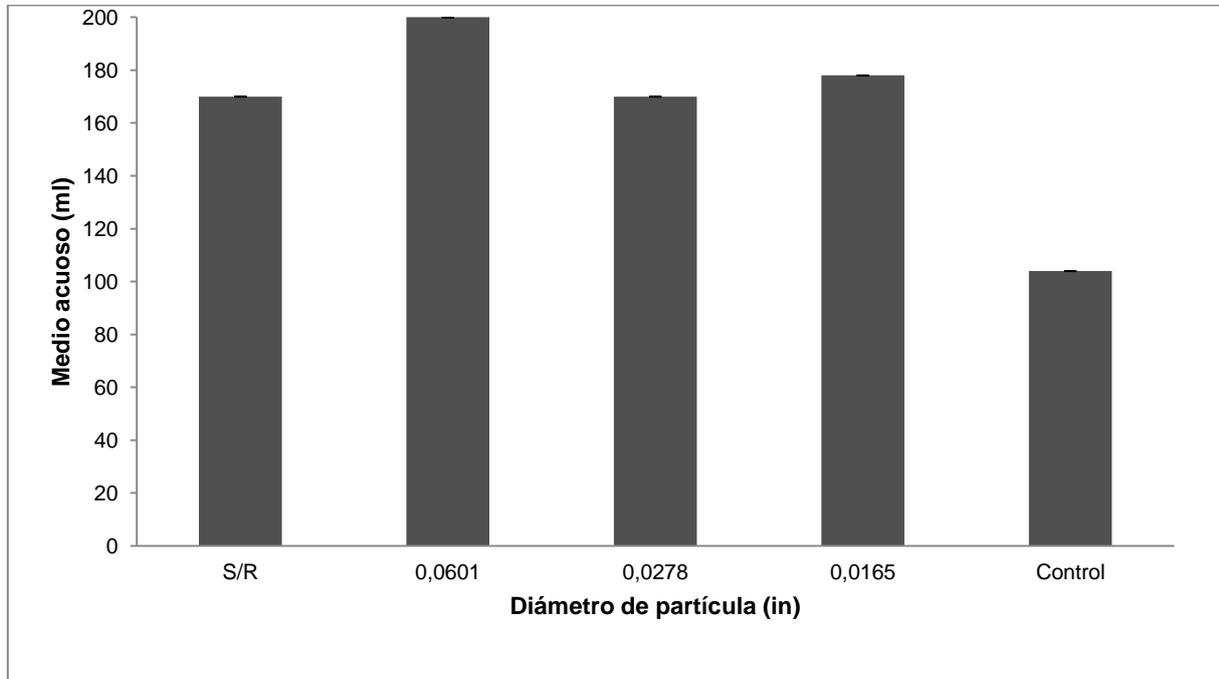


Figura 28. Evaluación del medio acuoso recolectado después del pretratamiento con H₂SO₄ a 2.77% (v/v). Se obtuvo una disminución del medio acuoso con diferentes diámetros de partícula. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar. Sin embargo no se logra apreciar.

Tabla 31. Corrección de los azúcares reductores cuantificados después del pretratamiento con 2.77% (v/v) de H₂SO₄.

Parámetro	Experimento (por duplicado)				
	1	2	3	4	Control
Número del experimento	1	2	3	4	Control
Diámetro de partícula malla/ tamaño en pulgadas	*S/R	12/0.0601	25/0.0278	40/0.0165	*S/R
AR* ajustados al volumen inicial (250 ml)	15.99±0.003	15.91±0.06	15.99±0.008	16.45±0.09	0.89±0.03
Volumen de ajuste (ml)	170±0.01	200±0.004	170±0.05	178±0.02	104±0.01
Corrección de los AR*	8.47±0.003	11.93±0.006	8.46±0.008	9.79±0.009	1.24±0.03
P _v (g/ L h)	8.47	11.93	8.46	9.79	0.35
Rendimiento de hidrólisis %	3.38	4.77	3.38	3.91	0.14

*Productividad volumétrica (P_v). *AR; Azúcares reductores g/L, se realizó tomando en cuenta el volumen de ajuste para cada experimento. *S/R (sin reducción).



De acuerdo a la corrección que se hizo en la Tabla 31, se observa que la productividad volumétrica se sobreestimó en cada uno de los experimentos en un inicio. Por lo que cuando se realiza la corrección de los azúcares reductores de acuerdo al volumen final recolectado de sobrenadante, se muestra que hay un porcentaje sobre estimado de productividad volumétrica de 47.02% (experimento 1); 25.01% (experimento 2); 47.09 % (experimento 3); 40.48 % (experimento 4).

En la segunda parte, *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco*, se muestra el bagazo residual secado en la Figura 29, presentando el bagazo que no se hidrolizó por efecto del pretratamiento. En la Tabla 32 se muestra el balance de materia total tomando en cuenta la parte *a) Medio acuoso recolectado (ml)* y *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco*.

Tabla 32. Balance de materia total, tomando en cuenta los azúcares reductores corregidos para el pretratamiento con 2.77% (v/v) de H₂SO₄.

Parámetro	Experimento (por duplicado)				
Número del experimento.	1	2	3	4	Control
Diámetro de partícula malla/tamaño en pulgadas	*S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in	*S/R
Corrección de los AR*	8.47±0.003	11.93±0.006	8.46±0.008	9.79±0.009	0.35±0.03
P _v (g/ L h)	8.47	11.93	8.46	9.79	0.35
Bagazo (g) al inicio del pretratamiento	10	10	10	10	10
Bagazo residual (g) expresado en peso seco	4.52±0.04	4.8±0.09	4.37±0.004	4.09±0.01	8.74±0.03
Bagazo que no se hidrolizó (%)	45.2	48	43.7	40.9	87.4

*Productividad volumétrica (P_v). *S/R (sin reducción).

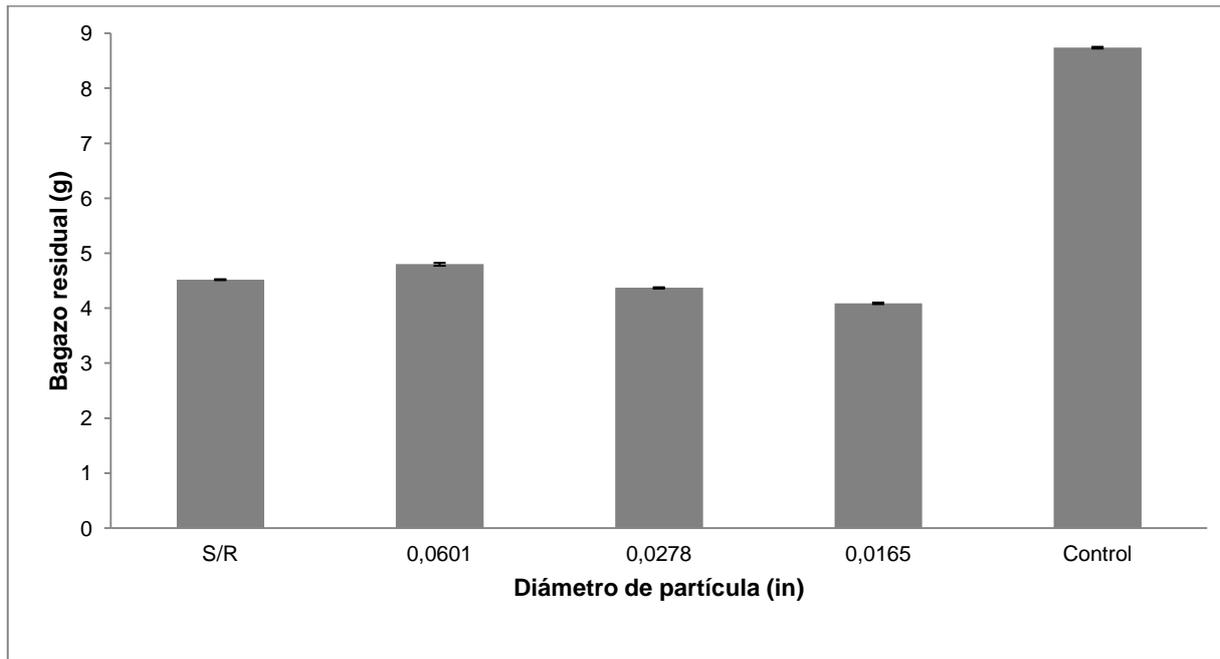


Figura 29 Balance de materia sobre el bagazo con pretratamiento en autoclave (1h/121°C/ 1.05kg/cm²) a 2.77% (v/v) de H₂SO₄ y secado a 60°C en estufa por 24 horas. El bagazo es recuperado después del pretratamiento por medio de filtrado al vacío. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar. Sin embargo no se logra apreciar.

4.9 Pretratamiento básico con NaOH para su posterior hidrólisis enzimática.

El pretratamiento básico se dividió en dos partes, en la primera parte se evaluó la concentración del catalizador 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% NaOH (p/v) los resultados se muestran en la Figura 30. La segunda es para la evaluación de las concentraciones a diferentes diámetros de partícula S/R (sin reducción), malla 12/ 0.0601in, 25/0.0278in y malla 40/0.0165 in ver Figura 31. Las productividades volumétricas de los experimentos se presentan en las Tablas 33, 34 y 35 respectivamente.

Tabla 33. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de pretratamiento de 1 hora en autoclave.

Experimento (por duplicado)	Concentración de NaOH % (p/v)	Azúcares reductores g/L	P _v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	0.01	0.33±0.008	0.33	0.13
2	0.10	0.37±0.002	0.37	0.14
3	0.30	0.32±0.01	0.32	0.12
4	0.50	0.41±0.004	0.41	0.164
5	1.0	0.36±0.02	0.36	0.144
Control negativo	Agua destilada	0.89±0.07	0.89	0.35

*Productividad volumétrica (P_v).

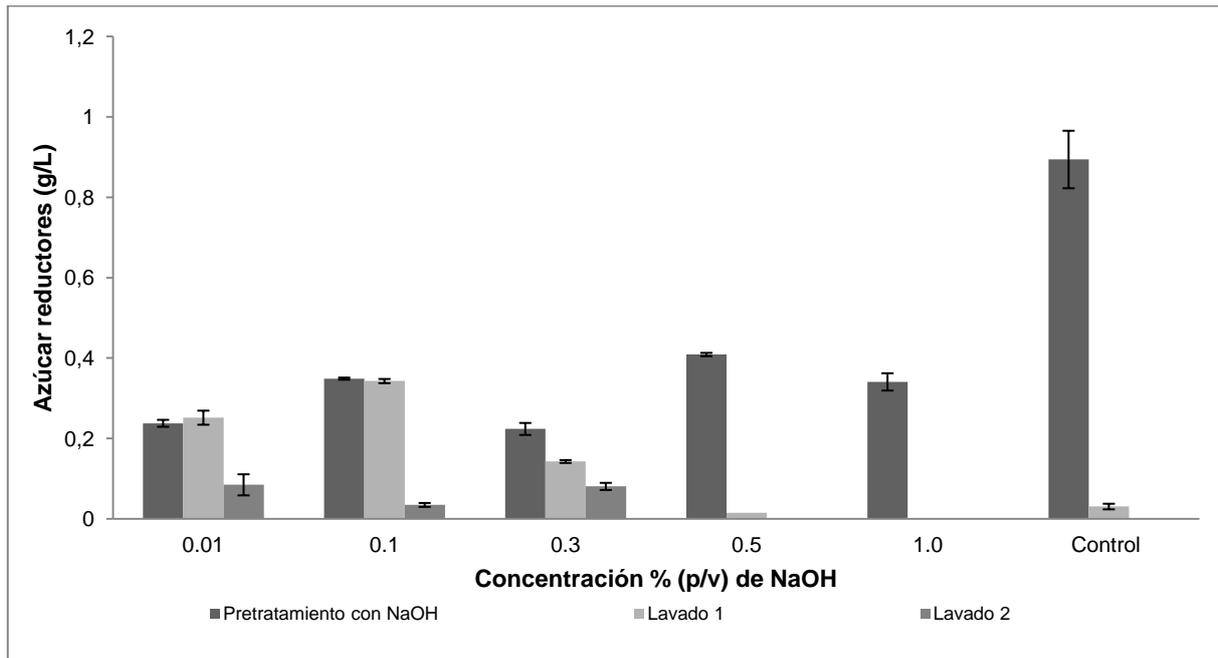


Figura 30. Pretratamiento básico a diferentes concentraciones 0.01, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0% (p/v), diámetro de partícula S/R (sin reducción). Condiciones: 10% de sólidos, tiempo de residencia 1 hora en autoclave a 121°C 1.05 kg/cm², concentración inicial 40 g/L de bagazo. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar. Sin embargo no se logra apreciar.

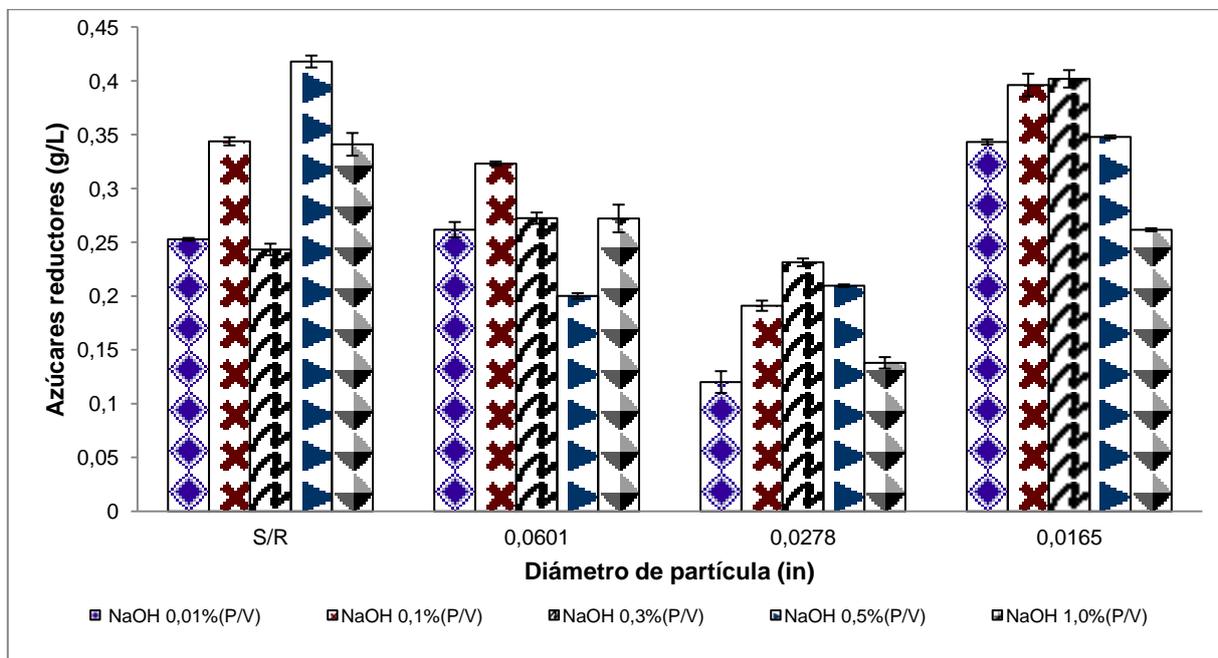


Figura 31. Pretratamiento básico para las concentraciones 0.01%, 0.1 %,0.3 % ,0.5 % y 1.0% (p/v) y diámetros de partícula S/R, 0.0601, 0.0278, 0.0165 in. Condiciones: 10% de sólidos, tiempo de residencia 1 hora en autoclave a 121°C 1.05 kg/cm², concentración inicial 40 g/L de bagazo. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar.



La mayor productividad volumétrica se obtiene al utilizar una concentración de 0.5% (p/v) de NaOH, con un valor de 0.41 g/L h. La diferencia de los demás experimentos, respecto al valor mayor de productividad volumétrica es de 19.51% a 0.01% (p/v) de NaOH; 9.75% a 0.10 % (p/v) de NaOH; 21.95% a 0.30 % (p/v) NaOH; 12.19 % a 1.0 % (p/v) de NaOH. Por lo tanto, se decidió evaluar la segunda parte a diferentes diámetros de partícula.

Tabla 34. Productividad volumétrica expresada para el pretratamiento con NaOH a 1 hora en autoclave. Continúa en la tabla siguiente.

Parámetro	Experimento (por duplicado)					
Diámetro de partícula	*S/R			12/0.0601 in		
Concentración de NaOH % (p/v)	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %
0.01	0.25±0.001	0.25	0.1	0.26±0.003	0.26	0.1
0.10	0.34±0.007	0.34	0.13	0.32±0.001	0.32	0.12
0.30	0.24±0.01	0.24	0.096	0.27±0.004	0.27	0.10
0.50	0.41±0.002	0.41	0.164	0.20±0.01	0.20	0.08
1.0	0.34±0.01	0.34	0.13	0.27±0.007	0.27	0.10
Control negativo	0.89±0.03	0.89	0.35			

*Productividad volumétrica (P_v); *Azúcares reductores (AR). *S/R (sin reducción).

Tabla 35. Productividad volumétrica expresada para el pretratamiento con NaOH de 1 hora en autoclave.

Parámetro.	Experimento (por duplicado)					
Diámetro de partícula	25/0.0278 in			40/0.0165 in		
Concentración de NaOH % (p/v)	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %	*AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %
0.01	0.12±0.005	0.12	0.04	0.34±0.005	0.34	0.13
0.10	0.19±0.002	0.19	0.07	0.39±0.005	0.39	0.15
0.30	0.23±0.001	0.23	0.09	0.40±0.003	0.40	0.16
0.50	0.21±0.001	0.21	0.08	0.34±0.008	0.34	0.13
1.0	0.13±0.0001	0.13	0.05	0.26±0.001	0.26	0.10
Control negativo	0.89±0.03	0.89	0.35			

*Productividad volumétrica (P_v).



En la Tabla 36 se muestra la diferencia en porcentaje de todos los experimentos evaluados respecto al experimento donde se obtuvo la mayor productividad volumétrica de acuerdo a los resultados de las Tablas 34 y 35 respectivamente.

Tabla 36. Comparación de las productividades volumétricas de los ensayos con pretratamiento con NaOH a diferentes concentraciones y diámetros de partícula.

Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de NaOH 0.01% (p/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	39.02	36.58	70.73	17.1
Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de NaOH 0.10% (p/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	17.07	21.95	53.65	4.87
Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de NaOH 0.30% (p/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	41.46	34.14	43.90	2.43
Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de NaOH 0.50% (p/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	100	51.21	48.78	17.07
Parámetro	Experimento (por duplicado) para una concentración de NaOH 1.0% (p/v)			
Diámetro de partícula	S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in
*A (%)	17.07	34.14	68.29	36.58

*A: Es la diferencia en porcentaje que se obtienen al tomar como 100% el valor mayor de productividad volumétrica de acuerdo a los experimentos evaluados. La mayor productividad volumétrica se obtiene al utilizar una concentración de 0.5% (p/v) de NaOH sin reducción del diámetro de partícula con un valor de 0.41 g/L h. *S/R (sin reducción).

No se muestra una tendencia uniforme, en el efecto de las diferentes concentraciones y diámetros de partícula para el pretratamiento con NaOH. Probablemente, para generar una tendencia uniforme en los resultados de la evaluación a diferentes concentraciones y diámetros de partícula con pretratamiento básico se requiera de un proceso de mezclado para llevar a cabo el pretratamiento con la finalidad de que el sistema sea homogéneo.

Se sabe que el efecto de la adición de bases sobre el material lignocelulósico provoca una hinchazón que incrementa la digestibilidad de la celulosa al provocar un aumento de la superficie interna, disminuyendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, este efecto favorece la posterior hidrólisis enzimática (Alvira, P., 2010; Sun, 2002).



4.10 Balance de materia para el pretratamiento básico a 0.5% (p/v) de NaOH.

El balance de materia prima para el pretratamiento básico a 0.5% (p/v) de NaOH se divide en a) *Medio acuoso recolectado (ml)* resultados en la Figura 32, y para b) *Bagazo residual (g) expresado en peso seco* resultados en la Figura 33.

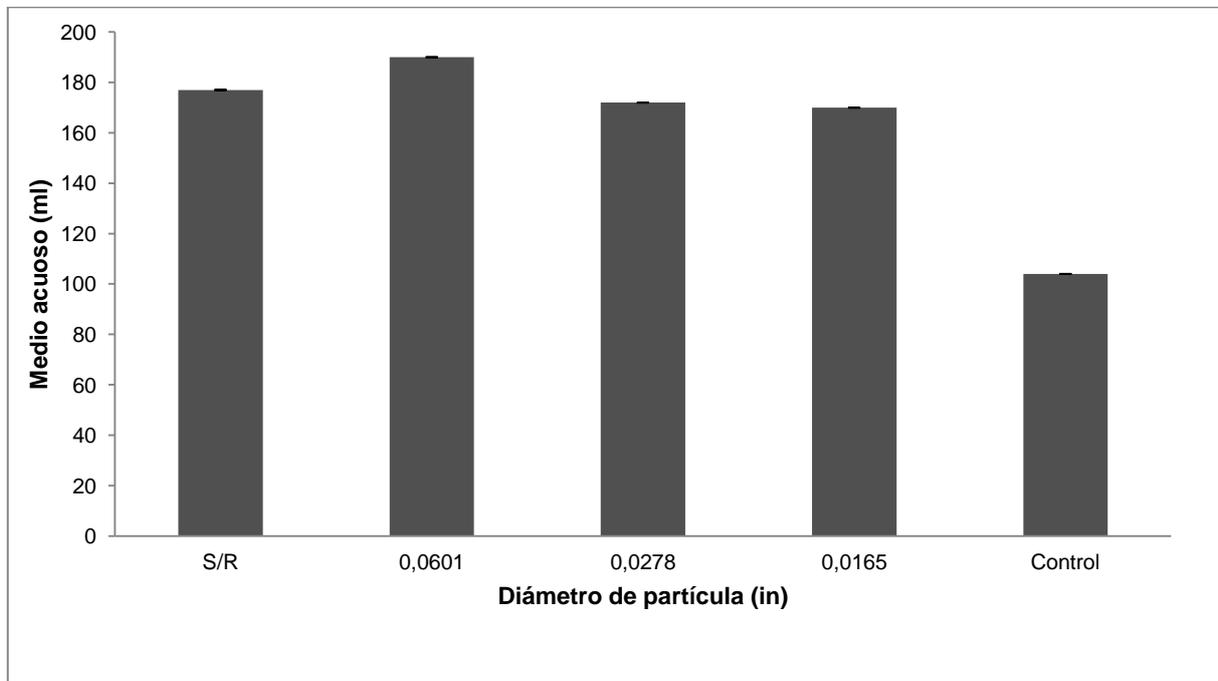


Figura 32. Evaluación del medio acuoso recolectado después del pretratamiento con NaOH a 0.5% (p/v) con diferentes diámetros de partícula. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, se presenta el error estándar. Sin embargo no se logra apreciar.

La Figura 32 muestra que hay una disminución del volumen de medio acuoso, en un inicio se adicionaron 250 ml de disolución con 0.5% (p/v) de NaOH. Este resultado sugiere una evaporación como consecuencia de las condiciones del pretratamiento. Para evitar el efecto es necesario ajustar el volumen con agua destilada después del proceso, González, *et al.*, (2011) reporta para un pretratamiento básico sobre una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades un ajuste del volumen con agua destilada después del pretratamiento, evitando así la concentración de los azúcares reductores.

En la Tabla 37 se muestran los resultados obtenidos con la corrección que se hizo sobre los azúcares reductores g/L para todas las muestras evaluadas. Además se muestra la productividad volumétrica sobrestimada de acuerdo a cada experimento con un valor de 41.46% (experimento 1); 35% (experimento 2); 47.61% (experimento 3); 47.05% (experimento 4).



Tabla 37. Corrección de los azúcares reductores cuantificados para el pretratamiento con 0.5% (p/v) de NaOH durante 1 h en autoclave.

Parámetro	Experimento (por duplicado)				
Número del experimento	1	2	3	4	Control
Diámetro de partícula malla/ tamaño en pulgadas	*S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in	*S/R
AR* (g/L) ajustados al volumen inicial (250 ml)	0.41±0.00 2	0.20±0.01	0.21±0.001	0.34±0.008	0.89
Volumen de ajuste (ml).	177±0.01	190±0.004	172±0.05	170±0.02	104±0.01
Corrección AR*	0.24±0.00 3	0.13±0.006	0.11±0.008	0.18±0.009	0.35±0.03
P _v (g/ L h)	0.24	0.13	0.11	0.18	0.35
Rendimiento de hidrólisis %	0.09	0.05	0.04	0.07	0.14

*Productividad volumétrica (P_v). *AR; azúcares reductores g/L, se realizó tomando en cuenta el volumen de ajuste para cada experimento. *S/R (sin reducción).

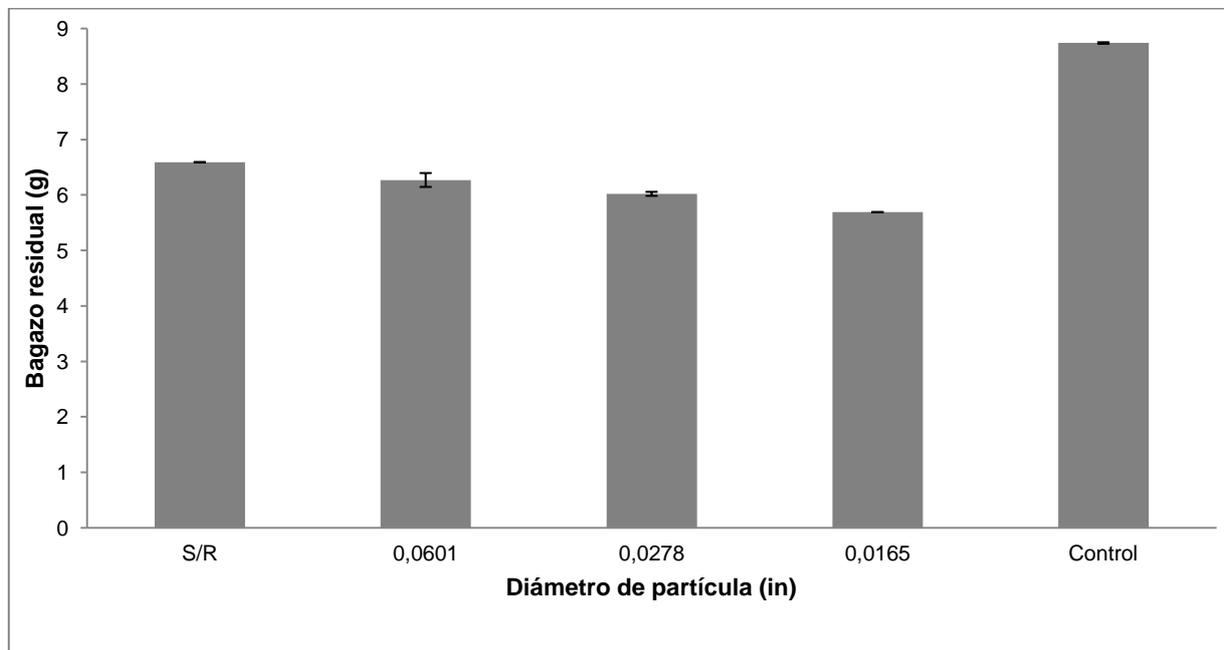


Figura 33. Balance de materia sobre el bagazo con pretratamiento básico en autoclave (1h/121°C/ 1.05 kg/cm²) el bagazo se seca a 60°C en estufa por 24 horas. El bagazo es recuperado después del pretratamiento por medio de filtrado al vacío. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado. Se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar.



Para la evaluación de *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco*, se presentan los resultados obtenidos para el bagazo que no se hidrolizó en la Figura 33. En la Tabla 38 se muestra el balance de materia total donde se establecen los resultados de las dos partes evaluadas para el balance de materia para el pretratamiento básico.

Tabla 38. Balance de materia total, corrección de azúcares reductores para el pretratamiento con 0.5% (p/v) de NaOH.

Parámetro	Experimento (por duplicado)				
	1	2	3	4	Control
Número del experimento.	1	2	3	4	Control
Diámetro de partícula	*S/R	12/0.0601 in	25/0.0278 in	40/0.0165 in	*S/R
Corrección de AR*	0.24±0.003	0.13±0.006	0.11±0.008	0.18±0.009	0.35±0.03
P _v (g/ L h)	0.24	0.13	0.11	0.18	0.35
Rendimiento de hidrólisis %	0.09	0.05	0.04	0.07	0.14
Bagazo (g) al inicio del pretratamiento	10	10	10	10	10
Bagazo residual (g) expresado en peso seco	6.59	6.27	6.02	5.69	8.74
Bagazo que no se hidrolizó (%)	65.9	62.7	60.2	56.9	87.4

*Productividad volumétrica (P_v). *S/R (sin reducción).

4.11 Efecto de la hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido.

Para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) de H₂SO₄ se presentan los resultados en la Figura 34. En este caso la productividad volumétrica se muestra en la Tabla 39 donde se especifican los valores obtenidos para cada uno de los procesos anteriores a la hidrólisis enzimática con pretratamiento.



Tabla 39. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de 72 horas de la hidrólisis enzimática con pretratamiento de 2.77 % (v/v) con H₂SO₄.

Experimento (por duplicado)	Concentración de H ₂ SO ₄ % (v/v)	Azúcares reductores (g/L)	P _v (g/L h).	Rendimiento de hidrólisis %
Pretratamiento	2.77	15.99±0.003	15.99	6.39
Hidrólisis enzimática con pretratamiento	2.77	17.03±0.006	0.23	17.03
**Hidrólisis total	2.77	33.02±0.0045	0.45	33.02
Control negativo	Agua destilada.	0.24±0.007	3.33 x 10 ⁻³	0.24

*Productividad volumétrica (P_v). **Hidrólisis total es la suma de los azúcares reductores obtenidos para el pretratamiento y la hidrólisis enzimática con pretratamiento por separado.

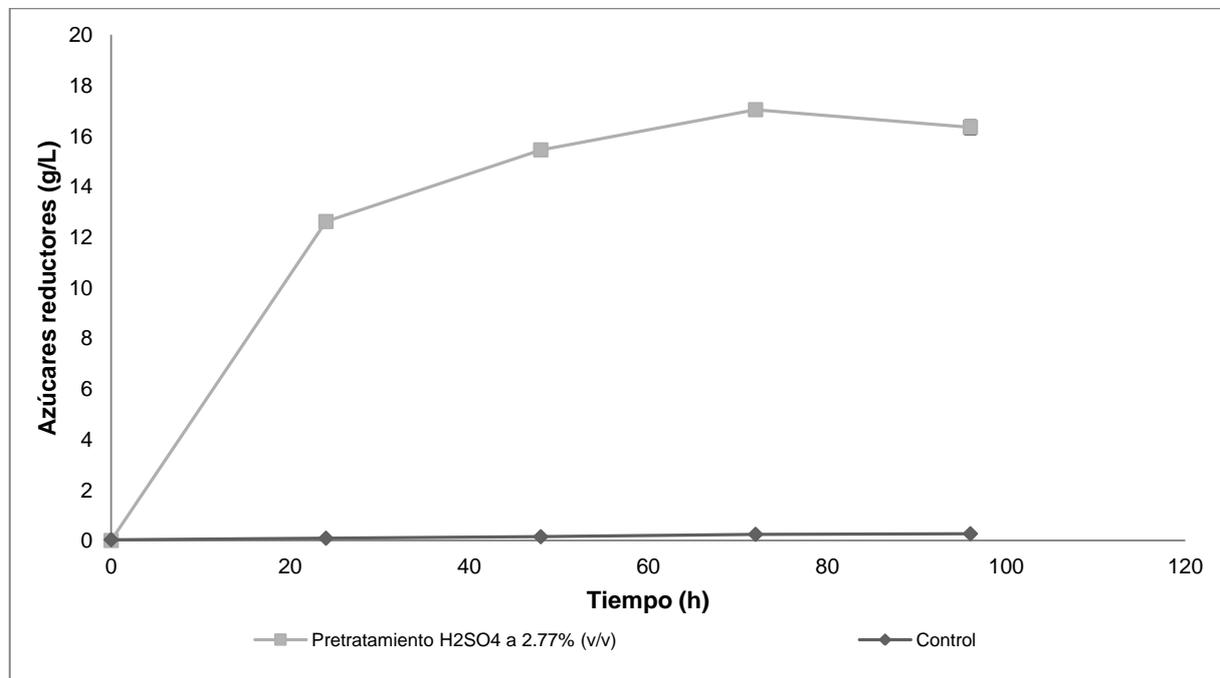


Figura 34. Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento. El bagazo fue sometido al pretratamiento en autoclave (1h/121°C/ 1.05 kg/cm) con diámetro de partícula S/R (sin reducción), y 2.77% (v/v) de H₂SO₄, posteriormente a la hidrólisis enzimática con: 10% de sólidos, pH 4.8 (0.05 M de buffer de acetatos), diámetro de partícula S/R (sin reducción), 96h, 150 rpm. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado. Se presenta el error estándar, sin embargo no se logra apreciar.

La productividad volumétrica que se obtuvo para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) de H₂SO₄, es de 0.45 g/L h (Tabla 39). A partir de un pretratamiento ácido sobre material lignocelulósico se favorece la digestibilidad de la biomasa usando una concentración de 2% (v/v) de H₂SO₄ de acuerdo a lo reportado por Alvira, (2010). Tomando en cuenta lo reportado para la cuantificación de azúcares reductores obtenidos al hidrolizar aserrín de pino y bagazo de sorgo dulce (Tabla 40), se



observa que para este trabajo hay una mayor liberación de azúcares reductores con un valor de 12.17 veces mayor que lo reportado por Zhang, *et al.*, (2011) y 22.1 veces respecto a lo reportado por López, *et al.*, (2009).

Tabla 40. Valoración de los resultados obtenidos para la hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido sobre el bagazo de agave, respecto a valores obtenidos en la literatura.

Sustrato	Variable de operación del pretratamiento	Variable de operación hidrólisis enzimática	Azúcares reductores g/L (método de DNS)	Referencia.
Aserrín de pino	1 % de H ₂ SO ₄ /121 °C /40 min	25 UFP/g carbohidratos hidrolizables / 50 °C /72 h/ 4.5 pH	7.92	(López, <i>et al.</i> , 2009).
Bagazo de sorgo dulce	Matraz/ autoclave con vapor saturado. 1 % de H ₂ SO ₄ /180°C / 10 min	20 UFP/g sustratos secos /50 °C /72 h/ 4.8 pH (0.05 M	17.85	(Zhang, <i>et al.</i> ,2011)
Bagazo de agave	2.77 % de H₂SO₄ /121 °C /1 h	0.1 ml/g de bagazo /50°C /96 h/ 4.8 pH (0.05 M	30.02	Este trabajo

4.12 Balance de materia para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 2.77% (v/v) de H₂SO₄.

El balance de materia prima para la hidrólisis enzimática con pretratamiento se divide en dos partes *a) Medio acuoso recolectado (ml)* se muestra el efecto en la Figura 35, *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco* Figura 36. Tomando en cuenta los valores obtenidos de la Tabla 39 (página 62) se ajustan los azúcares reductores de acuerdo al volumen de medio acuoso recolectado Tabla 41.

Tabla 41. Hidrólisis enzimática con pretratamiento 2.77% (v/v) de H₂SO₄. Corrección de los azúcares reductores.

Parámetro	Experimento (por duplicado).				
	AR* g/L ajustados al volumen inicial (250 ml)	Volumen de ajuste (ml).	Corrección de AR* g/L.	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	17.03±0.006	128 ±0.20	13.30±0.006	0.18	13.3
Control	0.24±0.007	97 ±0.001	0.23±0.007	3.19 x 10 ⁻³	0.23

*Productividad volumétrica (P_v). *AR; azúcares reductores g/L, se realizó tomando en cuenta el volumen de ajuste para cada experimento.

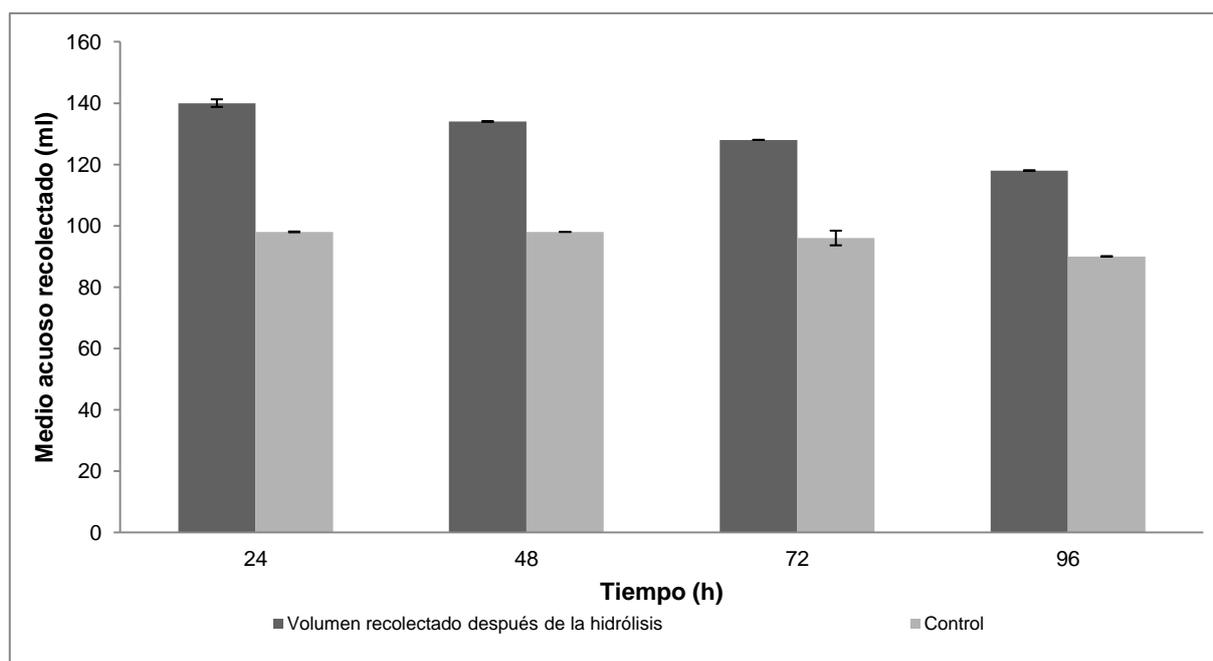


Figura 35. Evaluación del medio acuoso después de la hidrólisis enzimática con pretratamiento de H_2SO_4 a 2.77% (v/v). Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, con su error estándar, sin embargo no se logra apreciar en todas las barras.

En la Figura 35 se muestra un aumento del volumen cuantificado después del pretratamiento (en un inicio se adicionaron 100 ml de buffer de acetatos para los experimentos del pretratamiento). Probablemente el aumento en la medición del medio acuoso recolectado es el resultado del cambio en las propiedades de hidratación del bagazo que se muestra como consecuencia de las variables de operación utilizadas. Para evitar este efecto es necesario secar el bagazo después del pretratamiento. En la Tabla 42 se establece la productividad volumétrica para todo el proceso de hidrólisis enzimática con pretratamiento.

Tabla 42. Productividad volumétrica tomando en cuenta la corrección de los azúcares reductores para la hidrólisis enzimática con pretratamiento total.

Experimento (por duplicado)	Concentración de H_2SO_4 % (v/v)	Azúcares reductores g/L corregidos	P_v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
Pretratamiento	2.77	8.47 ± 0.003	8.47	
Hidrólisis enzimática con pretratamiento	2.77	13.30 ± 0.006	0.18	0.18
**Hidrólisis total	2.77	21.77 ± 0.0045	0.30	21.77
Control negativo	Agua destilada.	0.23 ± 0.007	3.19×10^{-3}	0.23

*Productividad volumétrica (P_v). **Hidrólisis total es la suma de los azúcares reductores obtenidos para el pretratamiento y los obtenidos de la hidrólisis enzimática con pretratamiento.



De acuerdo a las correcciones que se realizaron de los azúcares reductores g/L, se obtiene un productividad volumétrica e 0.30 g/L h de todo el proceso de hidrólisis enzimática con 2.77% (v/v) de H₂SO₄.

Balance de materia *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco* (Figura 36). En la Tabla 43 se muestra el balance de materia total tomando en cuenta la parte *a) Medio acuoso recolectado (ml)* y *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco*.

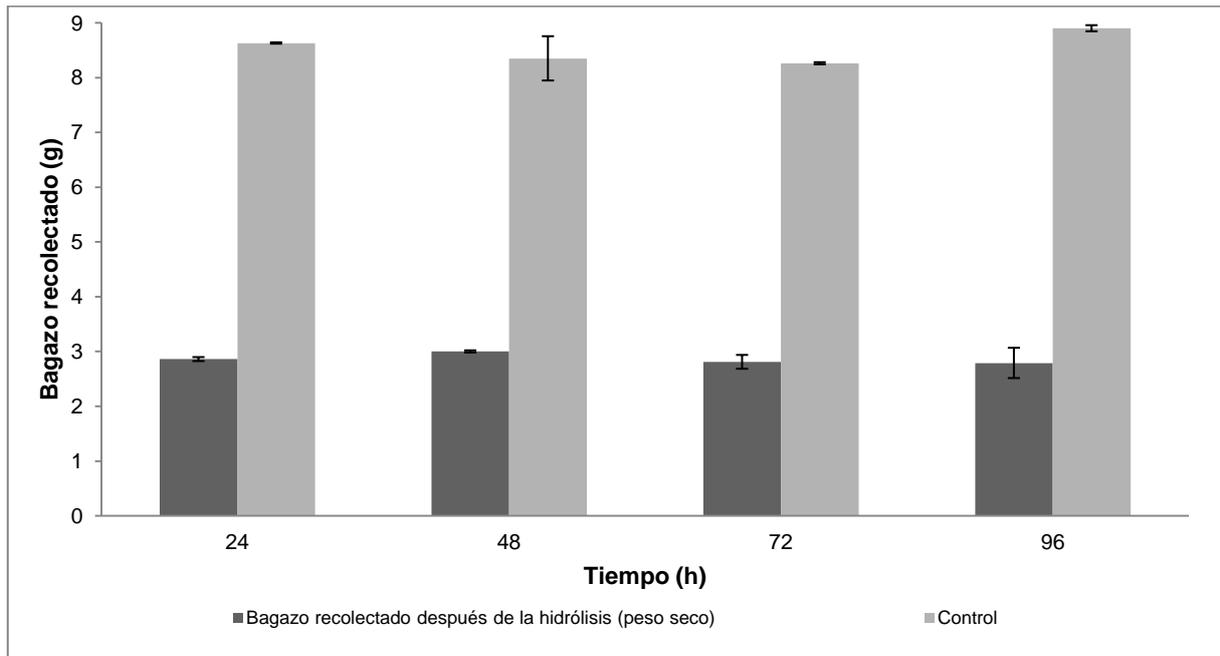


Figura 36. Balance de materia para bagazo pretratado y sometido a la hidrólisis enzimática. El bagazo es recuperado después del pretratamiento por medio de filtrado al vacío y sometido a la hidrólisis enzimática por 96 horas. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado con su error estándar, sin embargo no se logra apreciar en todas las barras.

Tabla 43. Balance de materia total, para la hidrólisis enzimática con pretratamiento con 2.77% (v/v) de H₂SO₄. *a) Medio acuoso recolectado (ml); b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco.*

Parámetro	Experimento (por duplicado).				
	Corrección *AR g/L	P _v (g/ L h) para los *AR	Bagazo (g) al inicio en 100 ml.	Bagazo residual (g) peso seco.	Bagazo que no se hidrolizó (%)
Pretratamiento	8.47±0.003	8.47	10	4.52	45.2
*HEP	13.30±0.006	0.18	10	2.81	28.1
**HEPT	21.77±0.0045	0.30	10	7.33	73.3
Control	0.23±0.007	3.19 x 10 ⁻³	10	8.74	87.4

*Productividad volumétrica (P_v). *AR; azúcares reductores g/L, se realizó tomando en cuenta el volumen de ajuste para cada experimento. *HEP: Hidrólisis enzimática con pretratamiento. **HEPT: Hidrólisis enzimática con pretratamiento total.



4.13 Efecto de la hidrólisis enzimática con pretratamiento básico.

Los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática con pretratamiento básico a 0.5% (p/v) de NaOH se muestran en la Figura 37. La productividad volumétrica se expresa en la Tabla 44. En la Tabla 45 se realiza una valoración de los resultados experimentales de este trabajo respecto a lo reportado para aserrín de pino y mezcla de frijol de cuatro variedades.

Tabla 44. Productividad volumétrica expresada para un tiempo de 72 horas de la hidrólisis enzimática con pretratamiento de 0.5% (p/v) de NaOH.

Experimento (por duplicado)	Concentración de NaOH% (p/v)	Azúcares reductores g/L	P _v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
Pretratamiento	0.5	0.41±0.002	0.41	0.16
Hidrólisis enzimática con pretratamiento	0.5	24.53±0.01	0.34	24.53
Hidrólisis total	0.5	24.94±0.006	0.34	24.94
Control negativo	Agua destilada.	0.24±0.007	3.33 x 10 ⁻³	0.24

*Productividad volumétrica (P_v). **Hidrólisis total:** es la suma de los azúcares reductores obtenidos para el pretratamiento más los obtenidos de la hidrólisis con pretratamiento.

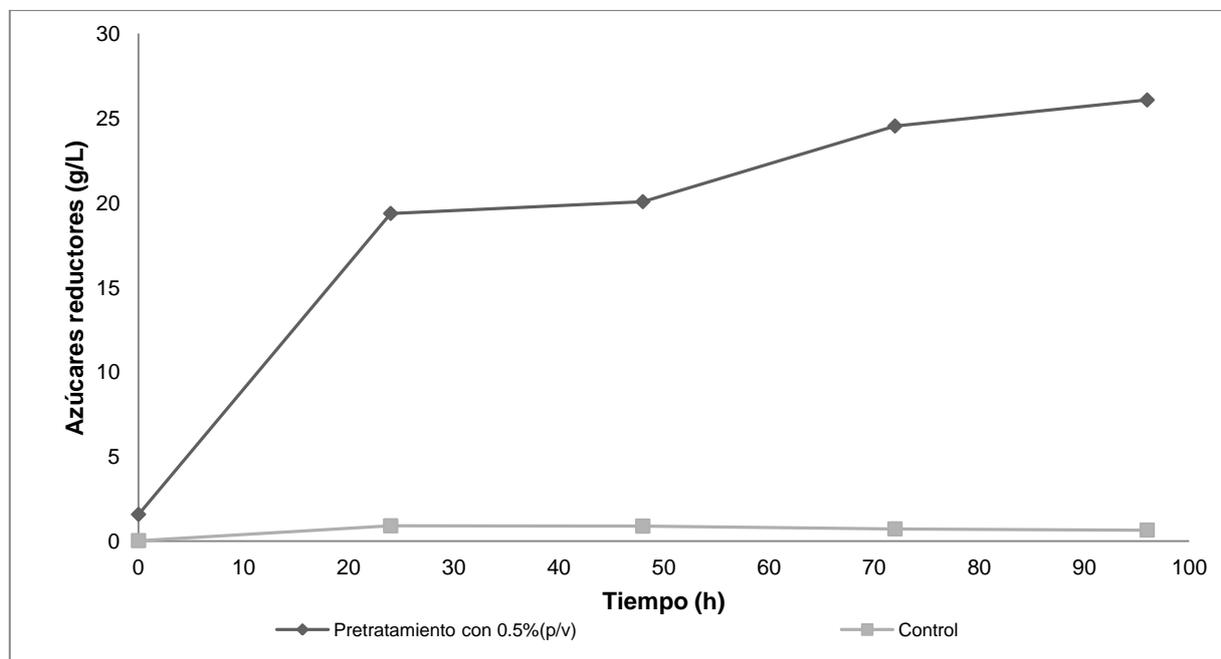


Figura 37. Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento. El bagazo fue sometido a un pretratamiento en autoclave (1h/121°C/1.05 kg/cm²) con diámetro de partícula S/R (sin reducción), 0.5% (p/v) de NaOH, posteriormente se sometió a la hidrólisis enzimática con: 10% de sólidos, pH 4.8 (0.05 M de buffer de acetatos), diámetro de partícula S/R (sin reducción), 96h, 150 rpm. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, con error estándar. Sin embargo no se logra apreciar al estar cubierto con marcador de cada punto.

**Tabla 45.** Valoración de los resultados de este trabajo en la hidrólisis enzimática con pretratamiento básico sobre el bagazo de agave respecto a lo reportado en la literatura.

Sustrato	Variable de operación del pretratamiento	Variable de operación hidrólisis enzimática	Azúcares reductores g/L	Referencia
Aserrín de pino	1% de NaOH. /121 ° C /30 min	25 UFP/g carbohidratos hidrolizables /50°C / 72 h/ 4.5 pH	5.02	(López, <i>et al.</i> , 2009)
Mezcla de pajas de frijol	0.5% de NaOH. /121 ° C / 90 min	25 UFP/g celulosa /45°C /240 h/ 4.5 pH	49.45	(González, <i>et al.</i> , 2011)
Bagazo de agave	0.5% de NaOH. /121 ° C /1 h	0.1 ml/ g de bagazo/ 50°C/ 96 h/ 4.8 pH	24.94	Este trabajo

La productividad volumétrica total que se obtiene al llevar a cabo la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) de NaOH, es de 0.34 g/L h (ver Tabla 44). Al valorar este trabajo respecto a lo reportado para otros sustratos como el aserrín de pino y mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades observamos que factores como tiempo, concentración, naturaleza del sustrato, tecnología empleada en la hidrólisis y variables de operación, son algunos de los parámetros que intervienen en el proceso de obtención de azúcares reductores.

4.14 Balance de materia para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) de NaOH.

Balance de materia prima para la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) de NaOH a) *Medio acuoso recolectado (ml)* los resultados de esta evaluación se presentan en la Figura 38, b) *Bagazo residual (g) expresado en peso seco* se muestran los resultados en la Figura 40. Tomando en cuenta los valores obtenidos de la Tabla 44 (página 66) se ajustan los azúcares reductores de acuerdo al volumen de medio acuoso recolectado Tabla 46.

Tabla 46. Hidrólisis enzimática con pretratamiento a 0.5% (p/v) de NaOH. Corrección de los azúcares reductores.

Parámetro	Experimento (por duplicado)				
	*AR (g/L)	Volumen de ajuste (ml)	**AR (g/L)	P _v (g/ L h)	Rendimiento de hidrólisis %
1	24.53±0.01	120±0.2	20.44±0.006	0.28	8.17
Control	0.24±0.007	97 ±0.001	0.23±0.007	3.19 x 10 ⁻³	0.09

*Productividad volumétrica (P_v). *AR; azúcares reductores ajustados al volumen inicial de 250 ml. **AR; corrección de los azúcares reductores g/L, se realizó tomando en cuenta el volumen de ajuste para cada experimento.

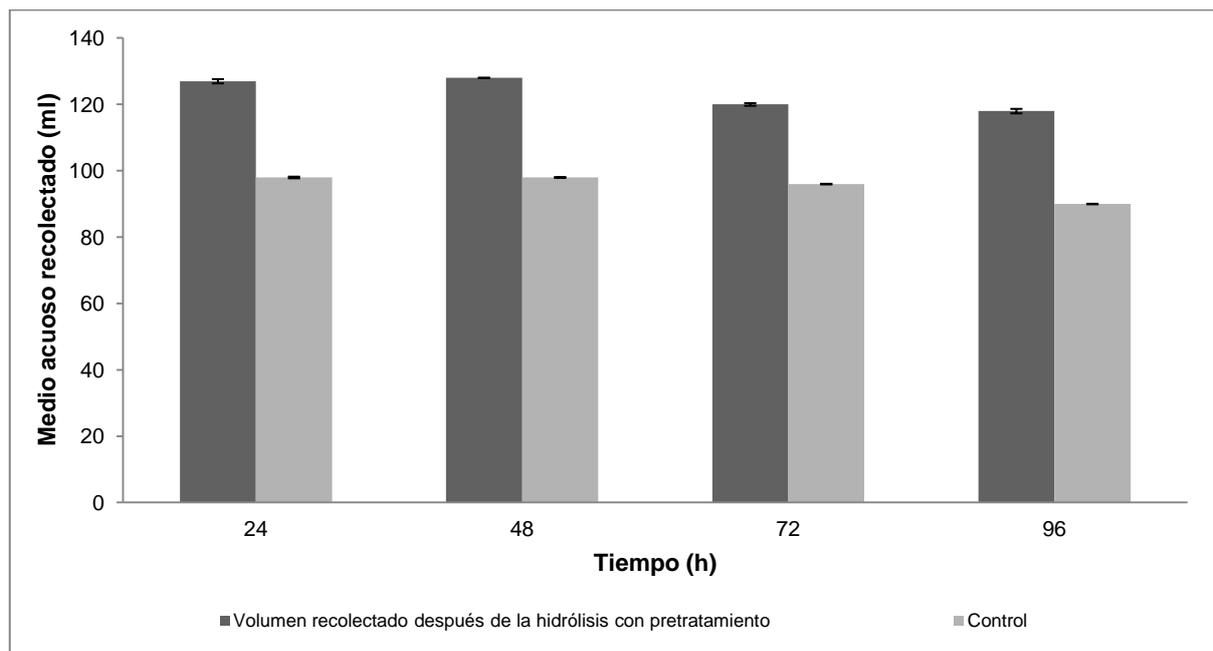


Figura 38. Evaluación del medio acuoso después de la hidrólisis enzimática con pretratamiento 0.5% (p/v) de NaOH. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, con su error estándar, sin embargo no se logra apreciar en todas las barras.

El bagazo pretratado húmedo se sometió a la hidrólisis enzimática bajo las condiciones de operación establecidas, se muestra un aumento del volumen cuantificado después del pretratamiento Figura 38 (en un inicio se adicionaron 100 ml de buffer de acetatos para los experimentos del pretratamiento con 0.5% (p/v) de NaOH). Probablemente el aumento de medio acuoso es el resultado en el cambio de las propiedades de hidratación del bagazo como consecuencia de las variables de operación utilizadas. Para evitar este efecto es probable que es necesario secar el bagazo después del pretratamiento. En la Tabla 47 se establece la productividad volumétrica para todo el proceso de hidrólisis enzimática con pretratamiento con un valor de 0.28 g/L h.

Tabla 47. Productividad volumétrica tomando en cuenta la corrección de los azúcares reductores para la hidrólisis enzimática con pretratamiento total.

Experimento (por duplicado)	Concentración de NaOH % (p/v)	Azúcares reductores g/L corregidos	P_v (g/L h)	Rendimiento de hidrólisis %
Pretratamiento	0.5	0.24±0.003	0.24	0.09
Hidrólisis con pretratamiento	0.5	20.44±0.006	0.28	20.44
Hidrólisis total	0.5	20.68±0.0045	0.28	20.68
Control	Agua destilada	0.23±0.007	3.19 x 10 ⁻³	0.23

*Productividad volumétrica (P_v). **Hidrólisis total:** es la suma de los azúcares reductores obtenidos para el pretratamiento más los obtenidos de la hidrólisis con pretratamiento.



El balance de materia para *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco* se muestra en el gráfico Figura 39, presentando el bagazo que no se hidrolizó por efecto del pretratamiento. En la Tabla 48 está el balance de materia total tomando en cuenta la parte *a) Medio acuoso recolectado (ml)* y *b) Bagazo residual (g) expresado en peso seco*.

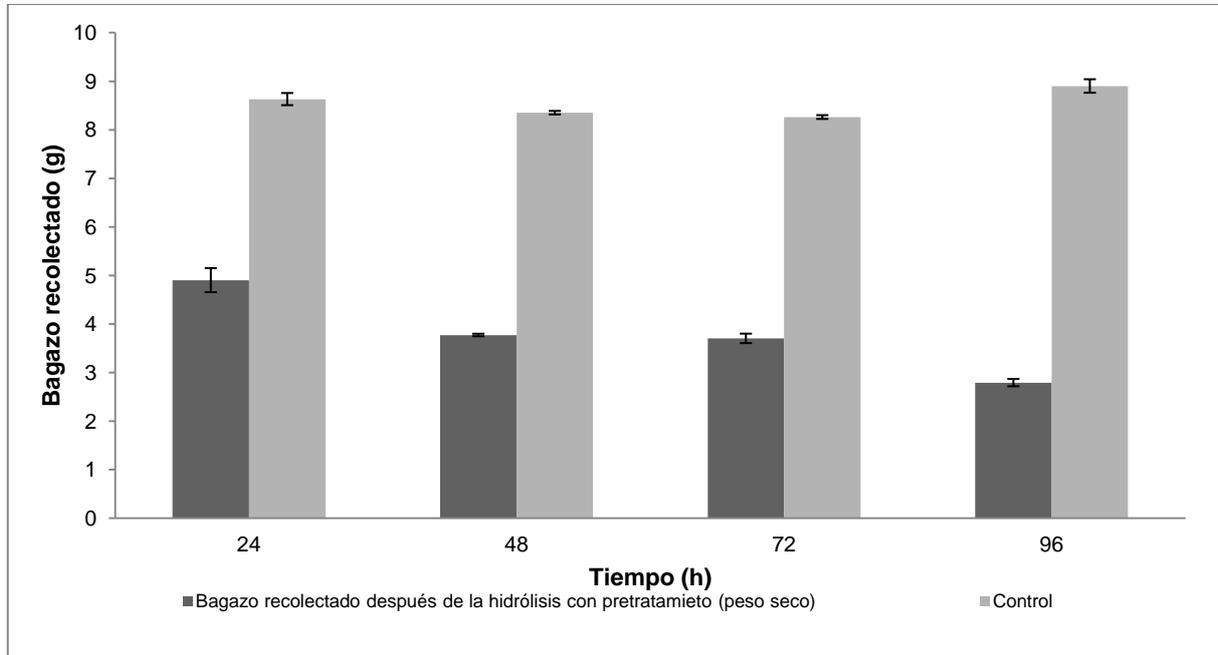


Figura 39. Balance de materia para hidrólisis enzimática con pretratamiento. El bagazo es recuperado después del pretratamiento por medio de filtrado al vacío. Esta gráfica presenta el promedio de dos muestras cuantificadas por duplicado, con su error estándar, sin embargo no se logra apreciar en todas las barras.

Tabla 48. Balance de materia total para la hidrólisis enzimática con pretratamiento con 0.5% (p/v) de NaOH.

Parámetro	Experimento (por duplicado)				
	Corrección *AR g/L	P _v (g/ L h)	Concentración g/L	Bagazo residual (g) peso seco	Bagazo que no se hidrolizó (%)
Pretratamiento	0.24±0.003	0.24	100	6.29	65.9
*HEP	20.44±0.006	0.28	100	3.50	37.00
**HEPT	20.68±0.0045	0.28	100	9.79	97.9
Control	0.23±0.007	3.19 x 10 ⁻³	100	8.74	87.4

*Productividad volumétrica (P_v). *AR; corrección de los azúcares reductores g/L, se realizó tomando en cuenta el volumen de ajuste para cada experimento. *HEP: Hidrólisis enzimática con pretratamiento. **HEPT: Hidrólisis enzimática con pretratamiento total.

En el Balance de materia prima para los dos pretratamientos se encontró que al aumentar la temperatura y disminuir el tiempo de hidrólisis sobre el bagazo se presenta un efecto de evaporación provocando una concentración de los azúcares reductores cuantificados. Cuando se disminuye la temperatura y aumenta el tiempo de hidrólisis el bagazo modifica su capacidad de hidratación y provoca un aumento del medio acuoso recolectado después de la hidrólisis enzimática con pretratamiento.



CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

La modificación de parámetros fisicoquímicos y el pretratamiento (ácido o básico) tiene efectos en la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de agave observando un cambio en los azúcares reductores cuantificados. La conclusión se divide en dos partes a) Hidrólisis enzimática (bagazo sin pretratamiento) y b) Hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido y básico.

a) Hidrólisis enzimática (bagazo sin pretratamiento).

1) Evaluación de la temperatura en la hidrólisis enzimática. Se obtiene una productividad volumétrica de 0.21 g/L h con la temperatura de 50°C y un rendimiento de hidrólisis de 15.07%.

2) Evaluación del pH en la hidrólisis enzimática: Con valor de pH de 4.8 obtiene una productividad volumétrica de 0.19 g/L h y un rendimientos de hidrólisis de 14.09%. Para la concentración de 0.05 M del buffer de acetatos el valor es de 0.22 g/L h y 16.18% respectivamente.

3) Evaluación de diferentes diámetros de partícula: Con el diámetro de partícula de malla/tamaño en pulgadas de 40/0.0165 in se obtiene la mayor productividad volumétrica de 0.19 g/L h y un rendimiento de hidrólisis de 13.78%.

4) Evaluación por la adición de diferentes volúmenes del complejo enzimático: La productividad volumétrica es de 0.21 g/L h con un volumen del complejo enzimático de 0.5 ml/g de bagazo y un rendimiento de hidrólisis de 14.99%.

5) Evaluación de diferentes concentraciones de sustrato: Con una concentración de sustrato de 150 g/L se obtiene una productividad volumétrica de 0.31 g/L h y un rendimiento de hidrólisis de 15.02%.

b) Hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido y básico.

1) Evaluación del pretratamiento con H₂SO₄: La productividad volumétrica para una concentración de 2.77% (v/v) de H₂SO₄ es de 15.99 g/L h con un rendimiento de hidrólisis de 39.97%.

2) Evaluación del pretratamiento con NaOH: La productividad volumétrica para una concentración de 0.5% (p/v) de NaOH es de 0.41 g/L h y un rendimiento de hidrólisis de 1.02%.



3) Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento para 2.77% (v/v) de H_2SO_4 : Con un pretratamiento ácido se obtienen una productividad volumétrica de 0.30 g/L h y un rendimiento de hidrólisis de 21.77%.

4) Evaluación de la hidrólisis enzimática con pretratamiento para 0.5% (p/v) de NaOH : El uso de un pretratamiento favorece la hidrólisis enzimática con una productividad volumétrica de 0.28 g/L h y un rendimiento de hidrólisis de 20.44%

Se obtuvo una mayor productividad volumétrica para los dos pretratamientos con hidrólisis enzimática respecto a lo que se libera con la hidrólisis enzimática sin pretratamiento.



CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS

- Evaluar por fermentación el hidrolizado obtenido a partir de bagazo de agave para la producción de etanol.
- Evaluar el pretratamiento, la hidrólisis enzimática y la hidrólisis enzimática con pretratamiento a nivel de reactor.
- Se sugiere evaluar la hidrólisis enzimática empleando una enzima adicional con actividad de exo-glucanasa sumada al complejo enzimático Accellerase 1500 usado durante el desarrollo de este trabajo.
- Explorar el aislamiento de algún microorganismo específico que sea capaz de hidrolizar el bagazo de agave para la obtención de azúcares reductores.



CAPÍTULO VII. ANEXO

7.1 Determinación de proteína para el complejo enzimático (Accellerase 1500).

La determinación de proteína se hizo con una muestra (por duplicado) del complejo enzimático comercial con la dilución adecuada para que la lectura de absorbancia esté dentro de la curva de calibración de albúmina sérico bovina (BSA) que se hizo (0.0 a 1.0 mg/ml) y empleando el método de Lowry, *et al.*, (1951). Posteriormente se realizó la lectura de la muestra en un espectrofotómetro a 590 nm, se ajusta a cero la absorbancia con un blanco de agua tratado bajo el mismo procedimiento, el ensayo se hizo por duplicado, se obtuvo un valor de proteína de 320 g/L, es el promedio de dos muestras.

7.2 Cuantificación de azúcares reductores con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico.

La muestra obtenida del sobrenadante de la hidrólisis enzimática y/o de los sobrenadantes de los pretratamientos, se debe diluir adecuadamente para que la lectura de absorbancia esté dentro de la curva de calibración (0.0 a 1.0 mg/ml). Una vez hecha la dilución se siguió el método de Miller, (1959) y finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 540 nm frente a un blanco tratado bajo el mismo procedimiento.

El método del DNS, se basa en la reducción del grupo aldehído que está presente en el azúcar reductor (glucosa, fructosa, maltosa u otro) y pasa a grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que al reaccionar con la fenilhidrazina presente en el reactivo de DNS (de color amarillo) produce una ozazona, la cual es colorida, y puede ser cuantificada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540nm (Nielsen, 2003) ver Figura 40.

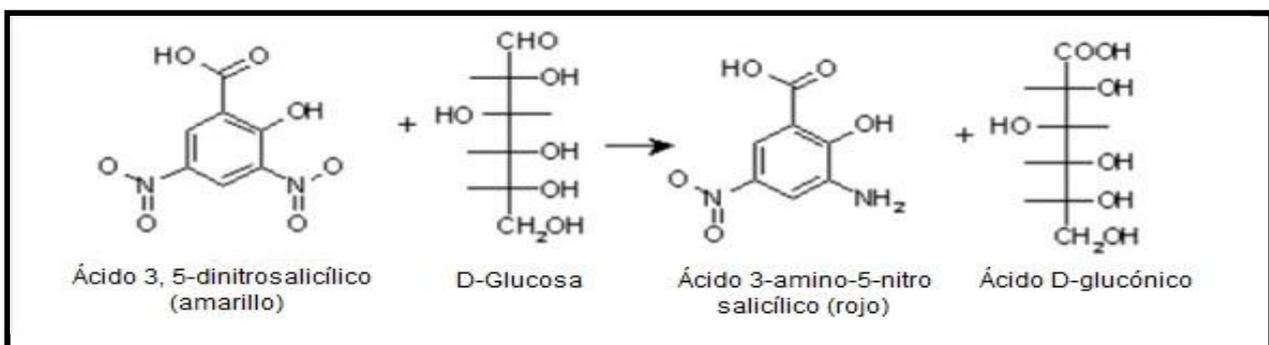


Figura 40. Esquema de las moléculas que participan en la reacción con el DNS (Vázquez, 2012).



7.3 Cuantificación de azúcares totales método Fenol-Sulfúrico.

La cuantificación de azúcares totales se realizó de acuerdo al método de fenol- sulfúrico (Dubois, M, *et al.*, 1956) se construye una curva patrón con una concentración de 0.0 a 0.1 mg/ml y posteriormente se lee la absorbancia frente a un blanco tratado bajo la misma metodología en un espectrofotómetro UV-VIS a 490 nm.

Los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas, una serie de reacciones complejas toman lugar bajo estas condiciones, empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida, se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos (Nielsen, 2003) Figura 41.

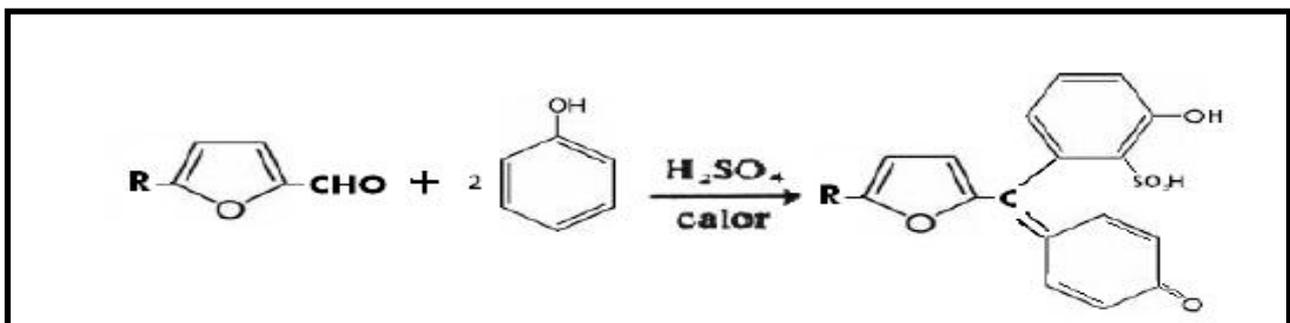


Figura 41. Reacción de fenol-sulfúrico (Caballero, 2010).

7.4 Cálculo de la productividad volumétrica.

La productividad volumétrica se determinó por medio de la ecuación (Figura 42). Se utilizaron los datos recolectados a partir de las muestras cuantificadas con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La productividad volumétrica se estandarizo para 72 horas de hidrólisis enzimática sin/con pretratamiento, en el caso de la evaluación del pretratamiento sólo se estandarizo para 1 hora.

$$Pv = \frac{(A_{72} - A_0)}{t_{72} - t_0}$$

Figura 42. Ecuación para calcular la productividad volumétrica.

Dónde:

P_v : productividad volumétrica.

A_{72} : Azúcares reductores cuantificados a las 72 horas de hidrólisis enzimática g/L.

A_0 : Azúcares reductores cuantificados al tiempo cero de hidrólisis enzimática g/L.

T_{72} : Tiempo de hidrólisis enzimática (h).

**BIBLIOGRAFÍA**

- Accellerase Product Line (Genencor, 2012). Accesado: 02/04/2012.
Disponible en www.genencor.com.
- Alvira, P., Tomás, E., Ballesteros, M., Negro, J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101: 4851–4861.
- Arroyo, J., 2010. Selección de microorganismos fúngicos productores de enzimas celulolíticas para hidrolizar bagazo de *Agave (Agave tequilana)*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan.
- Bansal, P., Hall, M., Matthew, J, Realf, J. 2009. Modelling cellulose kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* 27(6):833-848.
- Bhatands, M., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* 15: 583-620.
- Caballero, M. 2010. Evaluación de la producción de bioetanol a partir de residuos de malta. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Campus, M., Marcos, M., 2008. Los biocombustibles, 2da. Edición, Editorial Mundi Prensa, Madrid, España. Pp.124-145.
- Concejo Regulador del Tequila. Accesado 24/11/2012. Disponible en <http://www.crt.org.mx/>
- Criquet, S., 2002. Measurement and characterization of cellulose activity in sclerophyllous forest litter. *Journal of Microbiological Methods* 50: 165– 173.
- Dias, M., Ensinas, A., Nebra, S., Filho, R., Rossell, C., Wolf, M., 2009. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. *Chemical engineering research and design*, 87: 1206–1216.
- Dubois, M, *et al.*, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28:350-356.
- García, C., Gil, F., Hernández, T., Trasar, C., 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Grupo Mundi. España. Pp 169-175.
- González, Y., González, O., Nungaray, 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): 1-18.



- González, R., Soto, González., C., Rutiaga, Q., Medrano, R. 2011. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1): 17-28.
- Hamelinck, C., Hooijdonk, Geertje, Faaij, A., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4): 384-410.
- Howard, R.L., et al., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production *African Journal of Biotechnology*, 2 (12): 602-619.
- Iñiguez, G., Díaz, R., Sanjuan, R., Anzaldo, J., Rowell, R., 2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave Tequilana Weber* azul leaves. *Bioresource technology*, 77:101-108.
- Latorre, U., 2008. Aplicación de biotecnología para la obtención de pastas de alta calidad. Estudios de sistemas enzimáticos en secuencias de blanqueo respetuosas con el medio ambiente. Tesis de Doctorado. Cataluña, España: Universidad Politécnica de Cataluña.
- Lehninger, D., Michael M. 2005. Principios de bioquímica, 4ª edición. Omega, 198-230.
- Lowry, O., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J, Bio chem*, 193,265-275.
- López, M., Soto, C., Rutiaga, Q., 2009. Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Revista Contam Ambient*, 25(2): 95-102.
- Macarron, R., 1992. Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* QM9414. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 1. Universidad Complutense de Madrid. Accesado: 23/11/2012.
Disponible en <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/X/3/X3009401.pdf>.
- Mathews, C., Holde, K.E, Ahern, K., 2002. Bioquímica. 3ª edición. Madrid, Pearson Educación. 44, 593, 650.
- McCutchen, Bill F. 2006. Plant Biotechnology's Role in Feedstock Engineering. Positioning Sorghum as an Energy Crop. *Texas A&M Agriculture*. 12.
- McMurry, J. 2006. Química orgánica. 6ª edición. Thomson, 1012-1014.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 31,426-428.



- Mussatto, S., Teixeira, J., 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2: 897-907.
- Nollet, L., 1996. (Ed). Handbook of Food Analysis; M. Dekker, Nueva York .
- Oliva, J., 2003. Efecto de los productos de degradación Originados en la Explosión por Vapor de Biomasa de Chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Accesado el 19/02/12 Disponible en [http:// www.ucm.es/BUC/tesis/bio/ucm-t26833.pdf](http://www.ucm.es/BUC/tesis/bio/ucm-t26833.pdf).
- Ovando, S.L., Waliszewski, K.N., 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, A., De la Rubia T & Martínez, E., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int.Microbiol.* 5: 53–63.
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizon, J., 2009. Effect og Agave tequilana age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36:655–661.
- Rosete, D., 2009. Propuesta de un sistema de desmedulado, para la obtención de fibra de bagazo de agave tomado de los desechos de las fábricas tequileras de Arandas, Jalisco. Tesis de licenciatura Ingeniero Mecánico. Escuela superior de ingeniería mecánica y eléctrica unidad culhuacán. Instituto Politécnico Nacional.
- Saucedo, L., Castro,M., Martínez, P. 2010.Diseño de un bioproceso para la obtención de etanol anhidro a partir de bagazo del *agave tequilana* Weber. *Ciencia Nicolaita*, número especial.
- Saucedo, L., Castro,M., Martínez, P.2011. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ehtanol by *Pichia caribbica*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:725–732.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1–11.
- Soares, I., Travassos, J., Baudel, H., Benachour, M. 2011. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products* 33:670–675
- Taherzadeh, M., y Karimi, K., 2007. Acid-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *BioResources* 2(3): 472-499.



- Valenzuela, A., 2003. El Agave Tequilero Cultivo e Industria de México. Madrid. Ediciones mundi-prensa.
- Vázquez, T., 2012. Evaluación de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo para la obtención de azúcares fermentables a etanol y efecto de diferentes pretratamientos. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wyman, Charles E., 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96(18):1959-1966.
- Zhang, J., Ma, X., Yu, J., Tan, T., 2011. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*. 102: 4585–4589.