



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA QUÍMICA - BIOCATALISIS

PRETRATAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS  
MEDIANTE EXPANSIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO EN ESTADO  
SUPERCRÍTICO

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
I.Q. MIGUEL ÁNGEL PIMENTEL ALARCÓN

TUTOR:  
DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA, F.Q. UNAM

MÉXICO, D.F. JULIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: DRA. KLIMOVA BERESTNEVA TATIANA E.  
Secretario: DR. GARCÍA MEDEIROS DE OLIVEIRA MILTON T.  
Vocal: DR. TECANTE CORONEL ALBERTO  
1<sup>er</sup> Suplente DR. VIVALDO LIMA EDUARDO  
2<sup>do</sup> Suplente DR. GIMENO SECO MIQUEL

Lugares donde se realizó la tesis: LABORATORIO 314, CONJUNTO “E” Y LABORATORIO DE INGENIERÍA QUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

## **TUTOR DE TESIS**

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

---

**FIRMA**

*(Segunda hoja)*

## Resumen

El desarrollo de alternativas a los combustibles fósiles como fuente de energía es una prioridad global urgente. La biomasa puede ser utilizada para producir biocombustibles, una fuente de energía alternativa prometedora. Sin embargo, en la actualidad los biocombustibles son producidos a partir de cultivos desarrollados para la producción de alimentos, aumentando las preocupaciones sobre la energía neta, los efectos de gases de efecto invernadero y la competencia potencial entre el uso de la tierra para la producción de combustibles, alimentos, forraje, fibra y ecosistemas.

El material vegetal de desecho del sector agrícola o la industria alimentaria representa uno de los recursos más abundantes a nivel global de lignocelulosa, y por consiguiente de azúcares fermentables. La conversión de estos azúcares a etanol es una forma de sacar provecho de la energía solar, incorporada en el crecimiento de las plantas, sin competir por el uso de suelo.

El bagazo de agave, un residuo vegetal procedente de la producción del tequila, representa una materia prima prometedora para la producción de etanol. Sin embargo, para la bioconversión de este tipo de residuos lignocelulósicos a etanol, el tratamiento previo del material antes de la hidrólisis enzimática es esencial para obtener altos rendimientos globales de azúcar. Diversos métodos de tratamiento previo se han desarrollado.

La utilización de dióxido de carbono en condiciones supercríticas para la deslignificación de la madera ya ha sido reportado en la literatura para diferentes especies de árboles. En este estudio, se utilizó un proceso conocido como explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>-E).

Se estudió el efecto de diversas condiciones de pretratamiento. Cada muestra pretratada fue hidrolizada con celulasa comercial para evaluar su digestibilidad enzimática. Las variables analizadas fueron:

- Ciclos de operación
- Cosolvente utilizado
- Presión
- Tamaño de partícula
- Tiempo de residencia
- Temperatura

## Abstract

The development of alternatives to fossil fuels as an energy source is an urgent global priority. Biomass can be used to produce biofuels, a promising alternative energy source. At present, however, biofuels are produced from crops developed for food production, raising concerns about the net energy, greenhouse gas effects and potential competition between use of land for production of fuels, food, animal feed, fiber, and ecosystems.

Plant and waste material from agriculture or food industry represents one of the world's largest resources of lignocellulose and therefore fermentable sugars. Conversion of these sugars to ethanol is one way to take profit of the solar energy incorporated in the plant growth without competing for land use.

Agave bagasse, a plant residue derived from the production of tequila, represents a promising raw material for ethanol production. However, for the bioconversion of this kind of lignocellulosic residues to ethanol, pretreatment of the material prior to enzymatic hydrolysis is essential to obtain high overall yields of sugar. Several methods of pretreatment have been developed.

The use of carbon dioxide at supercritical conditions for the delignification of wood has already been reported in the literature for several species of tree. In this study, a process known as supercritical carbon dioxide explosion (SC-CO<sub>2</sub>-E) is used.

The effect of various pretreatment conditions were studied. Each pretreated sample was hydrolyzed with commercial cellulase to assess its enzymatic digestibility. The analysed variables were:

- Pretreatment cycles
- Cosolvent used
- Pressure
- Particle size
- Residence time
- Temperature

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de posgrado otorgada (becario 262887).

A mi tutor, el Dr. Eduardo Bárzana García; y a mi coasesor<sup>1</sup>, el Dr. Óscar Hernández Meléndez; por hacer posible la realización de este proyecto.

A mi familia, por todo lo demás.

---

<sup>1</sup>No fue posible incluirlo oficialmente como tal, pero eso no le quita todas las horas de trabajo.

# Índice general

Índice de figuras . . . . .	V
Índice de tablas . . . . .	VII
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Justificación . . . . .	1
1.2. Objetivos . . . . .	2
1.3. Hipótesis . . . . .	2
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
2.1. Biocombustibles . . . . .	3
2.1.1. Bioetanol . . . . .	4
2.1.2. Biodiésel . . . . .	6
2.1.3. Biogás . . . . .	7
2.2. Lignocelulosa . . . . .	8
2.2.1. Componentes extraños . . . . .	10
2.2.2. Polisacáridos . . . . .	10
2.2.3. Lignina . . . . .	11
2.3. Actividad termodinámica de agua . . . . .	11
2.3.1. Actividad de agua y humedad de equilibrio . . . . .	12
2.3.2. Medición de $a_w$ . . . . .	12
2.4. Biocatálisis . . . . .	13
2.4.1. Disolventes orgánicos . . . . .	13
2.5. Fluidos supercríticos . . . . .	14
2.6. Líquidos iónicos . . . . .	16
2.7. Materia prima . . . . .	17
2.7.1. Maíz . . . . .	19
2.7.2. Madera . . . . .	20
2.7.3. Plantas $C_4$ . . . . .	20
2.7.4. Plantas CAM . . . . .	21

2.7.5. Residuos vegetales . . . . .	21
<b>3. Antecedentes</b>	<b>23</b>
3.1. Meta . . . . .	23
3.2. Pretratamiento . . . . .	23
3.2.1. Métodos físicos . . . . .	25
3.2.2. Métodos fisicoquímicos . . . . .	26
3.2.3. Métodos biológicos . . . . .	28
3.2.4. Métodos químicos . . . . .	30
3.3. Hidrólisis de celulosa . . . . .	32
3.3.1. Hidrólisis ácida . . . . .	32
3.3.2. Hidrólisis enzimática . . . . .	34
3.4. Fermentación . . . . .	36
3.4.1. Inhibición por productos de degradación . . . . .	36
3.5. Purificación . . . . .	36
3.6. Hidrólisis y fermentación simultáneas . . . . .	37
<b>4. Metodología</b>	<b>38</b>
4.1. Caracterización del bagazo de agave . . . . .	38
4.1.1. Sustrato . . . . .	38
4.1.2. Reactivos . . . . .	39
4.1.3. Procedimiento . . . . .	39
4.2. Determinaciones de concentración de proteína . . . . .	40
4.2.1. Material . . . . .	41
4.2.2. Método . . . . .	41
4.2.3. Cálculo de concentración . . . . .	41
4.3. Determinaciones de actividad enzimática . . . . .	42
4.3.1. Información general . . . . .	42
4.3.2. Actividad de celulasa . . . . .	44
4.3.3. Actividad de endoglucanasa . . . . .	46
4.3.4. Actividad de xilanasa . . . . .	50
4.4. Pruebas de estabilidad enzimática . . . . .	52
4.4.1. Método . . . . .	52
4.5. Explosión de dióxido de carbono supercrítico . . . . .	52
4.5.1. Procedimiento . . . . .	53
4.5.2. Explosión y sacarificación simultáneas . . . . .	55
4.6. Análisis del bagazo de agave . . . . .	55
4.6.1. Isotermas de desorción de humedad . . . . .	55

4.6.2.	Análisis al microscopio . . . . .	56
4.6.3.	Valoración de azúcares reductores . . . . .	56
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>58</b>
5.1.	Caracterización del bagazo de agave . . . . .	58
5.2.	Determinaciones de concentración de proteína . . . . .	59
5.3.	Determinaciones de actividad enzimática . . . . .	60
5.3.1.	Actividad de celulasa . . . . .	60
5.3.2.	Actividad de endoglucanasa . . . . .	61
5.3.3.	Actividad de xilanasas . . . . .	61
5.4.	Pruebas de estabilidad enzimática . . . . .	61
5.5.	Análisis del bagazo de agave . . . . .	62
5.5.1.	Isotermas de desorción de humedad . . . . .	62
5.5.2.	Adecuación de las condiciones de operación . . . . .	64
<b>6.</b>	<b>Discusión</b>	<b>80</b>
6.1.	Bagazo de agave . . . . .	80
6.2.	Dióxido de carbono supercrítico . . . . .	80
6.2.1.	Usos . . . . .	82
6.2.2.	Pretratamiento de material lignocelulósico . . . . .	82
6.3.	Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio . . . . .	85
6.3.1.	Pretratamiento de material lignocelulósico . . . . .	85
6.4.	Enzimas . . . . .	86
6.4.1.	Celulasas . . . . .	87
6.4.2.	Xilanasas . . . . .	87
6.4.3.	Sacarificación de polisacáridos . . . . .	88
6.4.4.	Celluzyme BL . . . . .	88
6.5.	Isotermas de desorción de humedad . . . . .	89
6.6.	Sacarificación de celulosa . . . . .	90
6.6.1.	Ciclos de pretratamiento . . . . .	90
6.6.2.	Tamaño de partícula . . . . .	90
6.6.3.	Presión de pretratamiento . . . . .	90
6.6.4.	Humedad de pretratamiento . . . . .	91
6.6.5.	Concentración de [bmim]Cl . . . . .	91
6.6.6.	Tiempo de residencia . . . . .	91
6.6.7.	Temperatura de pretratamiento . . . . .	92
6.6.8.	Pretratamiento e hidrólisis simultáneos . . . . .	93
6.6.9.	Pretratamiento y acción enzimática óptimos . . . . .	93

<b>Conclusiones</b>	<b>96</b>
<b>7. Trabajo posterior</b>	<b>97</b>
7.1. Continuación al proyecto . . . . .	97
7.1.1. Isotermas de desorción de humedad . . . . .	97
7.1.2. Modelo cinético . . . . .	97
7.2. Xilanasas . . . . .	101
7.3. Recomendaciones . . . . .	101
7.3.1. Reciclaje de residuos sólidos . . . . .	101
7.3.2. Bioprosesamiento consolidado (Lynd et al., 2002) . . . . .	102
7.3.3. Otros biocombustibles (Somerville, 2007) . . . . .	105
<b>Bibliografía</b>	<b>107</b>
<b>A. Tablas de resultados</b>	<b>110</b>

# Índice de figuras

2.1. Integración completa del ciclo de recursos para tecnologías sustentables . . . . .	4
2.2. Proceso de producción de bioetanol . . . . .	5
2.3. Estructura de la lignocelulosa . . . . .	9
2.4. Principales biopolímeros presentes en la lignocelulosa . . . . .	9
2.5. Ejemplos de cultivos bioenergéticos potenciales . . . . .	17
3.1. Pretratamiento de biomasa lignocelulósica . . . . .	24
4.1. Método de Van Soest-Wine (modificado) . . . . .	39
4.2. Análisis de papel filtro . . . . .	44
4.3. Análisis de carboximetilcelulasa . . . . .	47
4.4. Análisis de xilanasa . . . . .	50
4.5. Reactor utilizado para la SC-CO <sub>2</sub> -E . . . . .	53
4.6. Diagrama del reactor utilizado para la SC-CO <sub>2</sub> -E . . . . .	54
4.7. Explosión de CO <sub>2</sub> supercrítico (procedimiento) . . . . .	54
5.1. Composición del bagazo de agave . . . . .	58
5.2. Concentración de proteína . . . . .	59
5.3. Análisis de papel filtro . . . . .	60
5.4. Análisis de carboximetilcelulasa . . . . .	61
5.5. Análisis de xilanasa . . . . .	62
5.6. Estabilidad enzimática del coctel “Celluzyme BL” . . . . .	63
5.7. Isotermas de humedad para bagazo pretratado a diferentes ciclos . . . . .	63
5.8. Isotermas de humedad para bagazo pretratado a diferentes temperaturas . . . . .	64
5.9. Efecto del número de ciclos de pretratamiento . . . . .	65
5.10. Dependencia de la sacarificación con el número de ciclos de pretratamiento . . . . .	66
5.11. Efecto del tamaño de partícula . . . . .	67
5.12. Dependencia de la sacarificación con el tamaño de partícula . . . . .	67
5.13. Efecto de la presión de pretratamiento . . . . .	68

5.14. Dependencia de la sacarificación con la presión de pretratamiento . . . . .	69
5.15. Efecto de la humedad de pretratamiento . . . . .	70
5.16. Dependencia de la sacarificación con la humedad del pretratamiento . . . . .	71
5.17. Efecto de la cantidad de líquido iónico . . . . .	72
5.18. Dependencia de la sacarificación con la cantidad de LI . . . . .	73
5.19. Efecto del tiempo de residencia . . . . .	73
5.20. Dependencia de la sacarificación con el tiempo de residencia . . . . .	74
5.21. Efecto de la temperatura de pretratamiento . . . . .	75
5.22. Dependencia de la sacarificación con la temperatura de pretratamiento . . . . .	76
5.23. Explosiones con enzima . . . . .	78
5.24. Operaciones en condiciones óptimas . . . . .	79
6.1. Diagrama de fases del dióxido de carbono . . . . .	81
6.2. Explosión de CO <sub>2</sub> supercrítico (fundamento) . . . . .	84
6.3. Estructura del [bmim]Cl . . . . .	85
6.4. Representación esquemática de la hidrólisis de celulosa . . . . .	88
6.5. Operaciones en condiciones óptimas . . . . .	95
7.1. Configuraciones de procesamiento de biomasa celulósica . . . . .	102
7.2. Tratamiento de material lignocelulósico empleando agua líquida caliente . . . . .	103

# Índice de tablas

2.1. Composición de diversos materiales lignocelulósicos . . . . .	8
2.2. Propiedades críticas de diversos solventes . . . . .	15
2.3. Propiedades generales de los líquidos iónicos . . . . .	16
2.4. Estimado de cultivos potenciales para la producción de biocombustibles . . . . .	22
3.1. Efecto de diferentes tipos de pretratamiento en biomasa lignocelulósica . . . . .	26
5.1. Cocteles enzimáticos analizados . . . . .	59
6.1. Pretratamiento de madera a diferentes condiciones . . . . .	83
A.1. Caracterización del bagazo de agave . . . . .	110
A.2. Determinaciones de concentración de proteína . . . . .	110
A.3. Determinaciones de actividad de celulasa . . . . .	111
A.4. Determinaciones de actividad de endoglucanasa . . . . .	111
A.5. Determinaciones de actividad de xilanasa . . . . .	111
A.6. Pruebas de estabilidad enzimática . . . . .	112
A.7. Sorción de humedad a diferentes ciclos de pretratamiento . . . . .	112
A.8. Sorción de humedad a diferentes temperaturas de pretratamiento . . . . .	112
A.9. Sacarificación a diferentes ciclos de pretratamiento . . . . .	113
A.10. Sacarificación a diferentes presiones de pretratamiento . . . . .	113
A.11. Sacarificación a diferentes tamaños de partícula . . . . .	113
A.12. Sacarificación a diferentes cosolventes de pretratamiento . . . . .	113
A.13. Sacarificación a diferentes tiempos de residencia . . . . .	113
A.14. Sacarificación a diferentes temperaturas de pretratamiento . . . . .	114
A.15. Explosiones con enzima a diferentes temperaturas . . . . .	114
A.16. Operaciones en condiciones óptimas . . . . .	114

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Justificación

El desarrollo de alternativas a los combustibles fósiles como fuente de energía es una prioridad global. Actualmente, cerca del 95 % de la energía mundial proviene de combustibles fósiles (Somerville, 2007), pero la obtención de los energéticos derivados del petróleo atraviesa una fuerte crisis debido a una disminución en sus reservas, por lo que ahora se ha despertado el interés en su reemplazo con fuentes de energía alternativas que sean sustentables y ecológicas. La bioenergía es una de las fuentes renovables que puede reemplazar en parte el uso de los combustibles fósiles.

La bioenergía contribuye a la diversificación de la energía de los países y al desarrollo de tecnologías emergentes, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero, generando empleos y sustituyendo la importación de combustibles.

Según la agencia internacional de energía (IEA) a partir de la biomasa es posible obtener cerca de un tercio de la energía necesaria en África, Asia y Latinoamérica (Somerville, 2007).

A escala planetaria, se ha avanzado en la producción de biocombustibles. La producción de biocombustibles en 2007 rebasó los 53 GL. La producción de etanol en ese año representó el 4% de los 1300 GL de gasolina consumidos globalmente (Marcano et al., 2010).

En 2008, el planeta produjo aproximadamente 87 GL de biocombustibles líquidos, que es aproximadamente igual al volumen de combustible líquido consumido por Alemania ese año.

Prácticamente todo este biocombustible fue producido a partir de cultivos originalmente destinados a la producción de alimentos, elevando la preocupación sobre la energía neta, el efecto invernadero y la competencia potencial entre el uso del suelo para produc-

ción de biocombustibles, alimento, forraje, fibra y ecosistemas.

Si se destinan dimensiones significativas de tierras para el cultivo agrícola con fines bioenergéticos, los precios de productos de popular consumo alimentario aumentarían considerablemente y, además, habría menos disponibilidad de tierras fértiles aptas para la producción de alimentos.

La implementación pendiente de tecnologías mejoradas para convertir más eficientemente las partes no comestibles de las plantas (lignocelulosa) a combustibles líquidos abre una amplia gama de opciones para usar materias primas para biocombustible que superen las actuales y puedan ser cultivadas en suelos distintos a los usados actualmente para alimento y forraje, ya que la capacidad para producir combustibles lignocelulósicos es de vital importancia.

## 1.2. Objetivos

1. Determinar si la explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>-E) es un método factible como pretratamiento de biomasa lignocelulósica.
2. Identificar el o los cocteles enzimáticos comerciales más apropiados para la hidrólisis de los polisacáridos presentes en el bagazo de agave.
3. Determinar las condiciones de operación más adecuadas para la sacarificación de residuos lignocelulósicos mediante el método de la SC-CO<sub>2</sub>-E.

## 1.3. Hipótesis

1. Si se logra alcanzar un rendimiento de sacarificación de bagazo de agave en azúcares reductores mayor al 50 %, podrá concluirse que la explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>-E) es un método factible como pretratamiento de material lignocelulósico.
2. En caso de se obtenga el rendimiento deseado con un coctel enzimático, este se considerará como el más apropiado para la hidrólisis. De lo contrario, será conveniente utilizar una mezcla de cocteles enzimáticos que actúen en conjunto para elevar el rendimiento de la sacarificación.
3. Tanto el rendimiento como el costo de la SC-CO<sub>2</sub>-E dependen en gran medida de las condiciones a las que se lleve a cabo. Por esta razón, si se establece la factibilidad del proceso, así como los cocteles enzimáticos adecuados, será necesario determinar también las condiciones de operación que permitan obtener rendimientos elevados de manera eficiente.

## Capítulo 2

# Marco teórico

### 2.1. Biocombustibles

En términos energéticos, la biomasa es la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Un biocombustible es una mezcla de hidrocarburos que se utiliza como combustible en los motores de combustión interna, y que se deriva de la biomasa.

Los biocombustibles son recursos energéticos procesados por el ser humano a partir de materias producidas por seres vivos. Pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, y su finalidad es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión. Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos.

El vínculo entre el cambio climático y los biocombustibles surge del hecho de que los biocombustibles representan fuentes de energía neutrales en carbono. La energía de la luz solar se absorbe por el sistema fotosintético de las plantas y se utiliza para reducir y condensar el dióxido de carbono atmosférico en las sustancias químicas que conforman el cuerpo de las plantas. Cuando las plantas se queman, la energía resultante de la oxidación se libera como calor y el  $\text{CO}_2$  se recicla. Por esta razón, el uso de este tipo de combustibles reduce dichas emisiones en comparación con los combustibles fósiles.

En la actualidad, los biocombustibles más usados y desarrollados son el bioetanol, el biodiésel y el biogás. Sin embargo el uso y producción actuales de los biocombustibles se encuentran en un punto de partida. El próximo cambio generacional en el uso de los recursos biológicos vendrá de una total integración de recursos vegetales innovadores, la síntesis de biomateriales y la generación de biocombustibles y bioenergía (Figura 2.1).

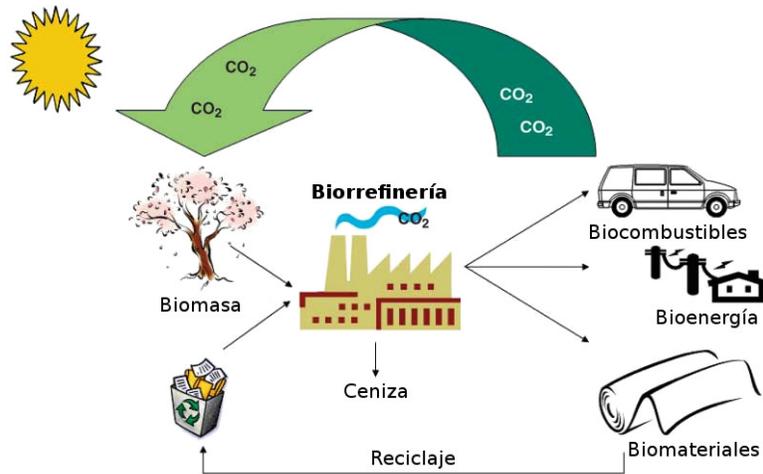


Figura 2.1: Integración completa del ciclo de recursos para tecnologías sustentables. Fuente: Ragauskas et al. (2006)

### 2.1.1. Bioetanol

El bioetanol es una fuente de energía renovable que puede ser usado como un sustituto parcial de la gasolina. Es también una alternativa amigable con el ambiente a los aditivos de gasolina como el metil tert-butil éter (Alinia et al., 2010). Asimismo, mediante el uso de bioetanol en lugar de los compuestos derivados del petróleo, se pueden reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

El etanol obtenido de la biomasa se ha convertido en una alternativa real para ser desarrollada como combustible. El proceso está basado en la utilización de los carbohidratos contenidos en las células vegetales en un proceso de conversión biológico para producir etanol. En la Figura 2.2 se muestra un diagrama esquemático del proceso de producción de bioetanol.

El bioetanol tiene las mismas características y composición química que el etanol, ya que se trata del mismo compuesto. La diferencia radica en su proceso de producción. El bioetanol debe de ser obtenido desde biomasa, no pudiendo obtenerse del petróleo. De esta manera, todos los licores alcohólicos que proceden de la fermentación del azúcar de alguna planta se pueden denominar como bioetanol. El principal método de obtención de bioetanol es la fermentación, ya sea directa o indirecta:

**Directa** Fermentación de productos ricos en azúcares reductores, como la caña de azúcar.

**Indirecta** A partir de la hidrólisis de polímeros como el almidón o la celulosa; y de la fermentación posterior de los azúcares reductores obtenidos.

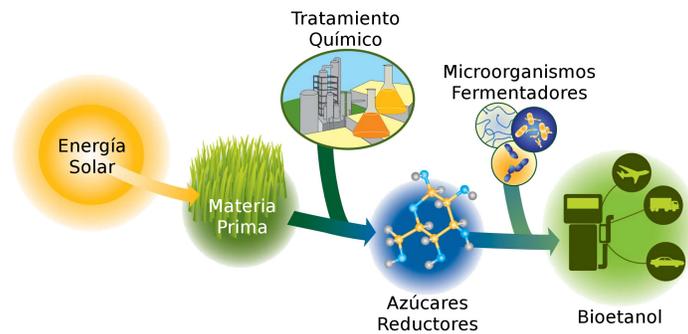


Figura 2.2: Proceso de producción de bioetanol. Fuente: Rubin (2008)

En el caso de la obtención de etanol a partir de celulosa, se puede utilizar el mayor porcentaje de la biomasa. Sin embargo, no puede ser procesada tal y como se encuentra en la naturaleza, sino que necesita ser transformada para obtener una mayor producción. La conversión biológica y química de la biomasa son los medios para lograr la transformación. Estos métodos generalmente involucran cuatro pasos secuenciales:

**Pretratamiento** Se requiere para alterar el tamaño y la estructura macroscópica y microscópica de la biomasa, así como su composición y estructura química submicroscópica, de manera que la hidrólisis de la fracción de carbohidratos complejos en azúcares simples se alcance más rápidamente y con mejores rendimientos.

**Hidrólisis** Incluye las etapas de proceso de conversión de los carbohidratos poliméricos en azúcares monoméricos, catalizada ya sea por ácidos o por enzimas.

**Fermentación** Los azúcares generados durante la hidrólisis son transformados en etanol por diversos microorganismos, como bacterias o levaduras.

**Purificación** El etanol se recupera de la mezcla de fermentación mediante destilación, quedando en los fondos del destilado la lignina residual, polisacáridos que no reaccionaron, enzimas, microorganismos, cenizas y otros componentes. Estos materiales se pueden convertir en diversos coproductos; o emplearse como combustible para impulsar el proceso.

El bioetanol es un biocombustible que ofrece grandes ventajas en virtud de sus características fisicoquímicas, materias primas de origen, costos de producción relacionados y efectos ambientales, entre muchas otras. En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios para desarrollar la producción a gran escala de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Los materiales que más se han investigado son madera y residuos forestales,

papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas, así como residuos sólidos urbanos (Domínguez Domínguez et al., 2011).

Asimismo, debido al aumento de las medidas tomadas para controlar las emisiones totales de gases con efecto invernadero, el uso de este alcohol como combustible para el transporte por carretera crece rápidamente. Un análisis del ciclo de vida completo de este producto como combustible muestra cómo las emisiones generadas en el proceso de producción del combustible y las de operación son compensadas por las fijadas en el cultivo durante su crecimiento.

### **Bioetanol de segunda generación**

Es aquel que es producido a partir de materiales lignocelulósicos. Este tipo de etanol puede ser obtenido a partir de la fermentación de los azúcares reductores provenientes de las fracciones de celulosa y hemicelulosa presentes en este tipo de materiales.

Los residuos lignocelulósicos se obtienen de los sectores agrícola, forestal, de los excedentes de las cosechas y la industria de transformación de las mismas. Para la producción de bioetanol se pueden utilizar diversos tipos de materias primas, tales como paja de trigo, paja de arroz, residuos de maíz y bagazo de caña de azúcar, entre otros.

Actualmente se han desarrollado tecnologías para el procesamiento de residuos lignocelulósicos a nivel laboratorio y planta piloto. No obstante, a pesar de que la materia prima es de menor costo que aquella utilizada en la producción de etanol de primera generación, el proceso requiere fuertes inversiones debido a que es necesario realizar una etapa más: el pretratamiento de la materia prima.

Asimismo, para desarrollar la producción de bioetanol de segunda generación es primordial conocer la composición química de la materia prima, la cual determina el pretratamiento al que debe ser sometida.

#### **2.1.2. Biodiésel**

Es un combustible renovable que puede obtenerse a partir de lípidos naturales, tales como aceites vegetales o grasas animales, ya sea con o sin uso previo.

Se obtiene mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación, y se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiesel o gasóleo obtenido del petróleo. Puede mezclarse en diferentes cantidades con gasóleo procedente de la refinación del petróleo.

El biodiésel tiene una ventaja ecológica en comparación con el diésel de origen fósil, ya que reduce las emisiones de gases que provocan el efecto de invernadero. Asimismo, elimina las emisiones de azufre ( $\text{SO}_2$ ) del diésel, evitando así las lluvias ácidas, entre otros problemas.

Sin embargo, el impacto ambiental y las consecuencias sociales de su previsible producción y comercialización masiva, especialmente en los países en vías de desarrollo, generan un aumento de la deforestación de bosques nativos, la expansión indiscriminada de la frontera agrícola, el desplazamiento de cultivos alimentarios y para la ganadería, la destrucción del ecosistema y la biodiversidad, y el desplazamiento de los trabajadores rurales.

### 2.1.3. Biogás

El biogás es una fuente de energía renovable, como la energía solar o la eólica, que además puede ser producida a partir de materias primas disponibles regionalmente o del reciclado de residuos, es amigable con el ambiente y permanece neutral en las emisiones de gases de efecto invernadero.

Es un gas combustible, que se genera en medios naturales o en dispositivos específicos, por las reacciones de biodegradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, mediante la acción de microorganismos y otros factores.

La descomposición anaeróbica es un proceso natural que ocurre en forma espontánea en la naturaleza y forma parte del ciclo biológico. De esta forma podemos encontrar el denominado “gas de los pantanos” que brota en aguas estancadas, el gas natural (metano) de los yacimientos petrolíferos, así como el gas producido en el tracto digestivo de los rumiantes como los bovinos. En todos estos procesos intervienen las denominadas bacterias metanogénicas.

La producción de biogás por descomposición anaeróbica es un modo considerado útil para tratar residuos biodegradables, ya que produce un combustible de valor además de generar un efluente que puede aplicarse como acondicionador de suelo o abono genérico.

El uso del biogás tiene diversas ventajas. El empleo del biogás en Norteamérica tiene el potencial de generar suficiente energía eléctrica para abastecer el 3% de la demanda eléctrica de todo el continente.

Adicionalmente, el biogás podría ayudar a la reducción del calentamiento global. Normalmente, el estiércol que se deja a descomponer libera dos de los principales gases que contribuyen al cambio climático global: el dióxido de nitrógeno y el metano. El dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) eleva la temperatura atmosférica 310 veces más que el dióxido de carbono, y el metano ( $\text{CH}_4$ ) 21 veces más que el dióxido de carbono.

Una vaca produce suficiente estiércol al día para generar 3 kWh de electricidad; y solo se requieren 2.4 kWh para mantener una bombilla incandescente de 100 W encendida durante un día completo. De esta manera, convertir el estiércol bovino a biogás en lugar de dejarlo descomponer, genera una cantidad considerable de energía renovable al tiempo que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero.

## 2.2. Lignocelulosa

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, y el más abundante sobre la superficie terrestre. Esta biomasa producida por la fotosíntesis es de las fuentes de carbono renovable más prometedoras para solucionar los problemas actuales de energía, ya que contiene una gran cantidad de azúcares fermentables, y anualmente se forman cerca de 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas et al., 2006).

Es también el principal componente de los residuos agrícolas (paja, hojas, cáscaras, etc.), de los residuos forestales (aserrín, virutas, etc.) y de los residuos de la industria conservera (pieles, brácteas, etc.). En forma de fibra es el material de soporte de los tejidos vegetales. Su utilización como material fibroso y de soporte ha sido muy amplia, aunque hoy relegada por el uso de productos derivados del petróleo y de la moderna tecnología. Sin embargo, se mantiene el interés por su utilización como fuente renovable de energía y de materias primas (Lázaro Belanche y Arauzo Pérez, 1994).

Los componentes de la materia lignocelulósica se clasifican en tres grupos principales: sustancias extrañas, polisacáridos y lignina. Y su proporción varía entre las distintas especies de plantas, su edad y su etapa de crecimiento. En la Figura 2.3 se muestra la estructura de la lignocelulosa, en la Figura 2.4 los principales biopolímeros que la conforman y en la Tabla 2.1 la composición de diferentes materiales lignocelulósicos.

Tabla 2.1: Composición de diversos materiales lignocelulósicos

Material Lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Madera suave	45 - 50	25 - 35	25 - 35
Cáscara de nuez	25 - 30	25 - 30	30 - 40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25 - 40	35 - 40	18 - 30
Papel	85 - 99	0	0 - 15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15 - 20	80 - 85	0
Algodón	80 - 95	0	0
Papel periódico	40 - 55	25 - 40	18 - 30
Desechos de papel de pulpeos químicos	60 - 70	10 - 20	5 - 10
Desechos sólidos de aguas residuales	8 - 15	No disponible	24 - 29
Desechos animales (cerdos)	6	28	No disponible
Desechos sólidos de ganado	1.6 - 4.7	1.4 - 3.3	2.7 - 5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	34
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

Fuente: Cuervo et al. (2009)

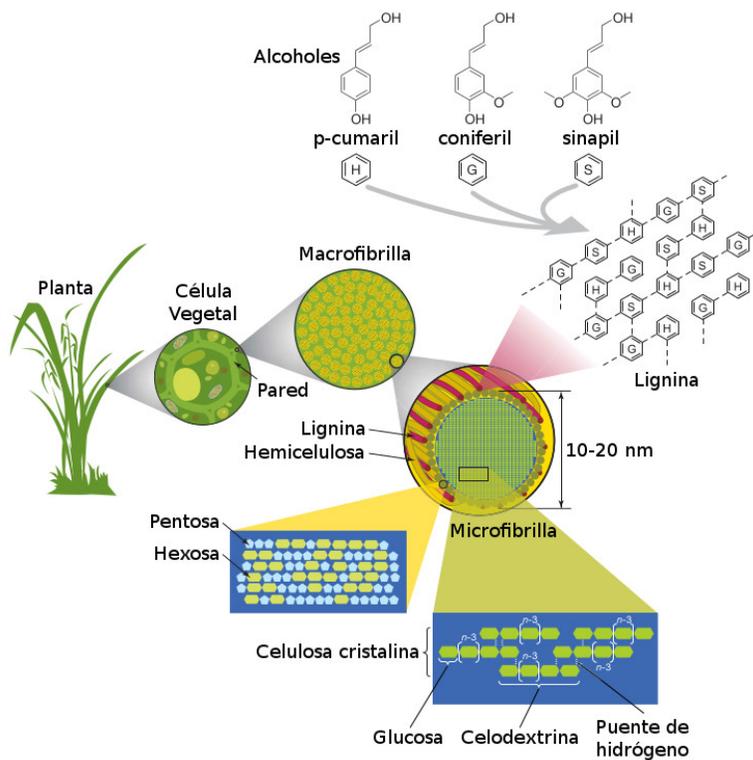


Figura 2.3: Estructura de la lignocelulosa. Fuente: Rubin (2008)

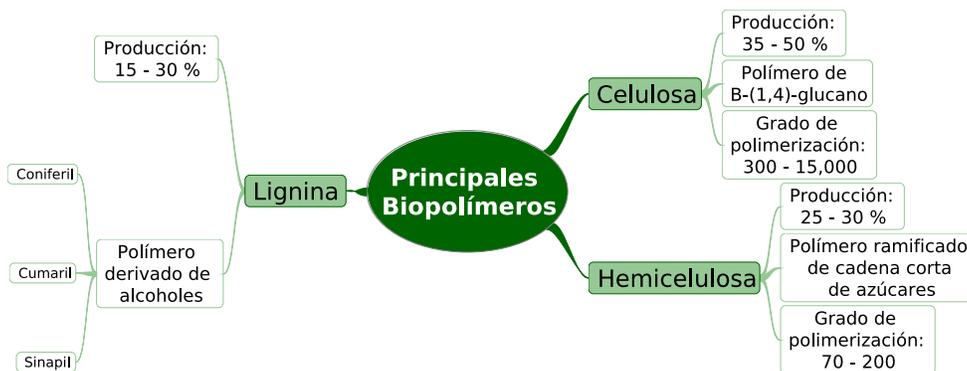


Figura 2.4: Principales biopolímeros presentes en la lignocelulosa. Modificado de Ra-gauskas et al. (2006)

### 2.2.1. Componentes extraños

Se denominan así los materiales que no constituyen las paredes celulares, y consisten en una amplia variedad de productos químicos. Atendiendo a sus solubilidades en agua y en disolventes orgánicos neutros, pueden clasificarse en productos extraíbles y no extraíbles. A pesar de su presencia en pequeña cantidad, los materiales extraños son muy importantes, puesto que hacen resistente la celulosa al ataque de microorganismos y productos químicos.

### 2.2.2. Polisacáridos

Constan de carbohidratos de alto peso molecular, principalmente celulosa y hemicelulosa, que suponen cantidades del 60 al 80 % de la materia total.

#### Celulosa

Es el homopolímero más abundante del mundo y el componente más importante de las paredes celulares de las células vegetales. Se trata de un biopolímero lineal insoluble en agua que requiere de ácidos muy concentrados para hidrolizarse en D-glucosa.

Tiene un alto peso molecular, de aproximadamente 500,000 Da; una longitud de cadena de entre 100 y 14000 unidades. Su unidad estructural básica está compuesta por moléculas de D-glucosa unidas por un enlace glucosídico  $\beta$ -1,4. El patrón de repetición presenta una unidad estereoquímica de la celulosa, un dímero de glucosa conocido como celobiosa, o ( $\beta$ -1,4 D-glucosil D-glucosa). Estas características hacen de la celulosa una potencial fuente de materia prima para la producción de biocombustibles sin menoscabo del potencial agroalimentario.

Las unidades se unen formando agregados llamados microfibrillas, que contienen zonas de celulosa amorfa, fácilmente atacables por enzimas; y otras zonas de mayor orden, la fracción cristalina, estimada entre un 50 y un 90 %, más resistente a la acción enzimática, debido principalmente a que ofrece una menor superficie de contacto para las enzimas.

Típicamente, las cadenas de celulosa son protectores en las paredes celulares vegetales. Bajo condiciones normales, la celulosa es insoluble en agua, propiedad necesaria para su funcionamiento adecuado como soporte estructural en las paredes celulares.

#### Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas; y ácidos (4-O-metilglucorónico, D-galacturónico y D-glucorónico). Los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3.

Su función principal es proporcionar una unión entre la celulosa y la lignina. En su estado natural existe en una forma amorfa que puede dividirse en dos categorías: poliuronidos y celulosanas. Los poliuronidos son hemicelulosas que contienen grandes cantidades de ácido hexurónico y algunos grupos metoxil, acetil y carboxílicos libres. Las celulosanas son polímeros formados por azúcares tales como hexosas: manano, galactano y glucosano; y pentosas: xilano y arabano. Estos heteroxilanos se unen entre sí y con las moléculas de lignina, formando una red en la que se insertan las microfibrillas de celulosa.

Las hemicelulosas están involucradas en la elongación y modificación de la pared celular. A diferencia de la lignina, se piensa que tienen un efecto fuerte en la interacción entre las microfibras de celulosa. Su composición química y sus características estructurales varían ampliamente según las diferentes especies, tejido, y la etapa de desarrollo. La adhesión mutua entre la celulosa y la hemicelulosa puede ser provista por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, además de otras interacciones que pudieran existir, mediados por boro y/o calcio.

### 2.2.3. Lignina

La lignina es un biopolímero aromático sumamente complejo que no puede ser degradado con facilidad de forma natural; es el segundo polímero en abundancia después de la celulosa, constituye cerca del 15 % de la biomasa terrestre y su fuente natural es la madera, donde se encuentra en una proporción del 20 al 35 %.

Es un heteropolímero tridimensional y ramificado formado por unidades de fenilpropano unidas por enlaces éter y carbono-carbono. Tiene un alto peso molecular (alrededor de 100 kDa) y es amorfa en la naturaleza.

La red de lignina está concentrada en las capas exteriores de las fibras, y proporciona soporte estructural y rigidez por endurecimiento y por mantener juntas las fibras de polisacáridos. Adicionalmente, es altamente resistente a la degradación química y biológica, y evita que las moléculas de agua entren a las microfibrillas de celulosa, inhibiendo la acción enzimática.

## 2.3. Actividad termodinámica de agua

En términos generales, la actividad de agua ( $a_w$ ) es una medida del estado de energía del agua en un sistema. Fue desarrollada para cuantificar la intensidad con la que el agua se asocia con diversos sólidos o constituyentes no acuosos.

Se define como la presión de vapor de un material dividida entre la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. De esta manera, el agua destilada pura tiene una

actividad de exactamente la unidad.

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

donde “P” es la presión de vapor de un material, y “P<sub>0</sub>” es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

Típicamente, cuando se incrementa la temperatura, se incrementa también la actividad de agua. Y cabe mencionar que el agua migra de zonas de alta  $a_w$  a zonas de baja  $a_w$ .

Las sustancias con mayores valores de  $a_w$  tienden a permitir la vida de un mayor número de microorganismos. Por esta razón, la actividad de agua es una propiedad importante en la industria de alimentos.

### 2.3.1. Actividad de agua y humedad de equilibrio

La actividad de agua y la humedad presentan una relación no lineal conocida como isoterma de sorción de humedad, ya sea de adsorción o desorción. En el presente proyecto se llevaron a cabo isotermas de desorción de humedad.

Estas isotermas son específicas para cada temperatura y cada sustancia, y son útiles para predecir las propiedades físicas de diversos materiales, como la porosidad y la superficie específica (Hernández Meléndez et al., 2008).

### 2.3.2. Medición de $a_w$

Los valores de actividad de agua de un material se obtienen a partir de instrumentos conocidos como higrómetros, ya sean de capacitancia o de punto de rocío.

En ambos métodos, el equilibrio de vapor debe ocurrir dentro de la cámara de medición. Esto puede requerir un tiempo prolongado, pero puede ser facilitado mediante la adición de un ventilador dentro de la cámara. Asimismo, también se debe alcanzar un equilibrio térmico, a menos que la temperatura de la muestra sea medida.

#### Higrómetros de capacitancia

Consisten en dos placas cargadas separadas por una membrana polimérica dieléctrica. A medida que la membrana adsorbe agua, su capacidad para mantener carga se incrementa y se mide su capacitancia. Este valor, determinado por un sensor calibrado específicamente, es proporcional a la  $a_w$ .

Este tipo de higrómetros no son afectados por la mayoría de los químicos volátiles, pueden ser mucho más pequeños que las otras alternativas y no requieren ser limpiados. Sin embargo, son menos precisos que los de punto de rocío, con un error de  $\pm 0.15 a_w$ .

Deben ser calibrados regularmente y pueden ser afectados por agua residual en la membrana polimérica.

### **Higrómetros de punto de rocío**

La temperatura a la que se forma el rocío en una superficie limpia está directamente relacionada a la presión de vapor del aire.

Los higrómetros de punto de rocío funcionan mediante la colocación de un espejo sobre una cámara de medición cerrada. El espejo es enfriado hasta que se alcanza el punto de rocío y se mide mediante un sensor óptico. Posteriormente, esta temperatura se usa para encontrar la humedad relativa de la cámara usando cartas psicrométricas.

Este método es teóricamente el más preciso, con un error de  $\pm 0.003 a_w$ , y frecuentemente el más rápido. El sensor requiere ser limpiado si se acumulan residuos en el espejo.

Debido a las ventajas anteriormente mencionadas, este fue el tipo de higrómetro utilizado para los fines de el presente proyecto.

## **2.4. Biocatálisis**

La biotecnología de enzimas es aquella área de la ingeniería bioquímica abocada al análisis, diseño y operación de sistemas para la producción y utilización de biocatalizadores. La producción biotecnológica de numerosos materiales y productos de uso cotidiano se realiza a través de procesos enzimáticos, por lo que es necesario:

- Estudiar las enzimas como biocatalizadores y su aplicación.
- Conocer a nivel molecular la bioquímica de las plantas.
- Incrementar el rendimiento de las reacciones enzimáticas.
- Mejorar la calidad de los productos derivados.

La biotecnología enzimática utiliza catalizadores biológicos, entre ellos células y enzimas, para garantizar una actividad más ecológica en los procesos industriales. Estos biocatalizadores presentan ventajas tales como alta especificidad, eficiencia, reducción de la contaminación y ahorro de energía, características que los hacen aptos para ser empleados en el desarrollo de nuevos procesos de producción sostenible, lo que ha representado un incentivo importante para el desarrollo de la biocatálisis y la tecnología enzimática.

### **2.4.1. Disolventes orgánicos**

El potencial de la actividad enzimática observada en presencia de solventes orgánicos ha recibido mucha atención en las últimas tres décadas. A pesar de la escasa información

que se tiene de la aplicación a escala industrial de enzimas en medios acuoso/orgánico y no acuoso, es evidente su potencial.

Pese a que las interacciones entre el solvente y la enzima son complejas, hay diversos fenómenos comunes que se pueden aplicar a la biocatálisis en medio orgánico.

A continuación se muestran algunas de las ventajas y desventajas de la biocatálisis en medio orgánico:

**Ventajas:**

- Mayor solubilidad de especies hidrofóbicas
- Se altera las regio- y estereo- especificidades
- Menor actividad de agua (se altera el equilibrio hidrolítico)
- Menor incidencia de reacciones secundarias ocasionadas por el agua
- Los disolventes no polares no pueden desorber el agua unida a la enzima
- Menor contaminación microbiana
- Mayor estabilidad térmica de las enzimas en medio no polar

**Desventajas:**

- Los disolventes tienden a reducir la actividad enzimática (se requiere mayor cantidad de biocatalizador)
- Los disolventes polares pueden actuar como desnaturalizantes al particionarse las moléculas de agua del centro activo al medio. Afectando así a la estructura protéica.
- Inactivación interfásial en sistemas de dos fases
- Se requiere controlar la actividad de agua para procesos que involucren reacciones de condensación

## 2.5. Fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (FSC) es cualquier sustancia en condiciones de temperatura y presión superiores a su punto crítico, donde las fases distintas de líquido y gas ya no existen. Se presentan naturalmente en medios como volcanes submarinos o atmósferas de planetas como Venus.

Pueden difundirse a través de los sólidos como los gases, y disolver materiales como los líquidos. Cerca de su punto crítico, pequeños cambios en la presión o temperatura ocasionan grandes cambios en su densidad, permitiendo controlar con precisión muchas

de sus propiedades. Adicionalmente, no presentan tensión superficial, puesto que no existe la interfase gas-líquido. Esto permite una fácil penetración en materiales microporosos.

En términos generales, los FSCs tienen propiedades entre las de los gases y los líquidos. En la Tabla 2.2 se muestran las propiedades críticas para algunos compuestos usados comúnmente en condiciones supercríticas.

Tabla 2.2: Propiedades críticas de diversos solventes

Solvente	Peso Molecular (g/mol)	Temperatura Crítica (K)	Presión Crítica (atm)	Densidad Crítica (g/mL)
Dióxido de Carbono	44.01	304.1	72.8	0.469
Agua	18.015	647.1	217.8	0.322
Metano	16.04	190.4	45.4	0.162
Etano	30.07	305.3	48.1	0.203
Propano	44.09	369.8	41.9	0.217
Etileno	28.05	282.4	49.7	0.215
Propileno	42.8	364.9	45.4	0.232
Metanol	32.04	512.6	79.8	0.272
Etanol	46.07	513.9	60.6	0.276
Acetona	58.08	508.1	46.4	0.278

Fuente: Reid et al. (1987)

Los fluidos supercríticos son apropiados como sustitutos de solventes orgánicos en procesos tanto de investigación como industriales. Algunas de sus aplicaciones son:

- Extracción supercrítica
- Lavado en seco
- Cromatografía supercrítica
- Reacciones químicas en fluidos supercríticos
- Impregnación y tintes
- Formación de nano- y micro- partículas
- Generación de cocristales farmacéuticos
- Secado supercrítico
- Oxidación con agua supercrítica
- Gasificación con agua supercrítica
- Generación de energía
- Producción de biodiésel
- Recuperación mejorada de petróleo
- Refrigeración
- Deposición supercrítica
- Agentes antimicrobianos

Sin embargo, el desarrollo de los FSCs es todavía un tema relativamente nuevo e

inexplorado. La inhomogeneidad local de los fluidos supercríticos es digna de mención, aunque el conocimiento científico de este aspecto sigue siendo escaso.

## 2.6. Líquidos iónicos

Un líquido iónico (LI) es una sal en estado líquido. Mientras los líquidos ordinarios están formados predominantemente por moléculas eléctricamente neutras, los LIs están constituidos principalmente por iones y pares iónicos (moléculas sin disociar) de vida corta. También se les conoce como electrolitos líquidos, fluidos líquidos, sales fundidas o sales líquidas.

Las propiedades generales de los líquidos iónicos se resumen en la Tabla 2.3. Son particularmente importantes:

**Baja presión de vapor** Por lo que no presentan los problemas ambientales de los solventes orgánicos volátiles

**Conductividad eléctrica moderada** Usualmente en el mismo rango que los electrolitos en fase acuosa

**Excelentes disolventes o catalizadores** Principalmente para reacciones orgánicas o procesos simples como la electrodeposición

Tabla 2.3: Propiedades generales de los líquidos iónicos

Sal	Catión o anión grande
Punto de fusión	Preferentemente menor a 100 °C
Rango líquido	Frecuentemente mayor a 200 °C
Estabilidad térmica	Usualmente alta
Viscosidad	Normalmente menor a 100 cP
Constante dieléctrica	Implícita menor a 30
Polaridad	Moderada
Conductividad específica	Usualmente menor a 10 mS/cm (alta)
Conductividad molar	Menor a 10 Scm <sup>2</sup> /mol
Ventana electroquímica	Mayor a 2 V
Disolvente y/o catalizador	Excelente para diversas reacciones orgánicas
Presión de vapor	Usualmente despreciable

Fuente: Johnson (2007)

Un LI se caracteriza por una conductividad eléctrica específica del orden de 1 mS/cm, así como por una conductividad molar que por lo general excede 0.1 Scm<sup>2</sup>/mol. Adicionalmente, los LIs deben contener únicamente iones, con una baja cantidad de pares iónicos, y tienden a presentar bajas constantes dieléctricas.

## 2.7. Materia prima

Los sustratos más utilizados para producir biocombustibles son la caña de azúcar y el maíz, siendo Brasil el mayor productor de bioetanol a partir de caña de azúcar, y Estados Unidos a partir del maíz (Cuervo et al., 2009); sin embargo, ambos representan una materia prima que bien podría utilizarse para la producción de alimentos, de manera que a medida que se destinen estas materias primas para la obtención de biocombustibles, menor será la cantidad disponible para su consumo, trayendo consecuencias económicas negativas a nivel mundial.

Existen, sin embargo, otras opciones que no presentan este problema; principalmente fuentes lignocelulósicas, como los desechos de la industria maderera, residuos de cosechas, aserrín y otro tipo de plantas (Figura 2.5).



Figura 2.5: Ejemplos de cultivos bioenergéticos potenciales. (A) *Miscanthus giganteus* en Illinois. (B) *Agave tequilana* de 5 años de edad en México. (C) *Pennisetum purpureum* de 1 año de edad en Florida. (D) Brotes de sauce de 2 años a partir de raíces de 8 años en Inglaterra (en el tercer ciclo de regeneración). Fuente: Somerville et al. (2010)

Además de no competir con el sector alimenticio, la energía de proceso requerida para la conversión del material lignocelulósico a biocombustibles se puede obtener a partir de la combustión de otros componentes de la biomasa, principalmente la lignina.

Debido al tipo de fotosíntesis que realizan, las plantas pueden dividirse en tres grupos:

**Plantas C<sub>3</sub>:** La síntesis de compuestos de carbono a partir de CO<sub>2</sub> es reversible. El proceso inverso es conocido como fotorrespiración, fenómeno que ocurre cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en la hoja es considerablemente inferior en comparación a la de oxígeno. Esto supone una pérdida notable al no generarse energía (principal rasgo que lo diferencia de la respiración mitocondrial).

**Plantas C<sub>4</sub>:** En estas plantas, típicamente de clima tropical, se lleva a cabo un proceso más eficiente para captar el dióxido de carbono. Se presentan dos variedades de cloroplastos. En el externo se capta el CO<sub>2</sub> y se transporta hacia el interno, donde se sintetizan los azúcares. De esta manera, la concentración de oxígeno en el cloroplasto interno nunca es elevada, evitando así la fotorrespiración.

**Plantas CAM:** Este tipo de plantas, generalmente de clima árido, presentan un metabolismo semejante al de las C<sub>4</sub>, sin embargo, la separación de los dos procesos no es espacial, sino temporal. Durante la noche se abren los estomas (poros) para captar el CO<sub>2</sub>, el cual es almacenado en forma de ácido. Y durante el día se cierran para evitar la pérdida de agua y se sintetizan los azúcares a partir del CO<sub>2</sub> almacenado durante la noche.

El tipo de planta utilizado para la obtención de energía estará íntimamente ligado a la eficiencia en el uso de agua (ver Tabla 2.4), puesto que el emplear agua de riego generalmente no es sustentable.

En consecuencia, las plantas C<sub>3</sub>, como el trigo o la cebada, que son relativamente ineficientes en cuanto al uso de agua, se pueden cultivar únicamente donde se presenten lluvias abundantes. Las plantas C<sub>4</sub>, como el maíz o la caña de azúcar, que son más eficientes, se pueden cultivar donde exista una cantidad moderada de lluvia. Por último, las plantas CAM, como el agave, las cuales son las más eficientes en el uso de agua, podrán cultivarse en regiones áridas y semiáridas.

En lo que respecta a la calidad del suelo, siglos de experiencia en la producción de caña de azúcar y estudios recientes en los efectos del cultivo de la misma en el carbono del suelo indican que es posible cultivarla sustentablemente; la evidencia disponible sugiere que también los pastos perennes y árboles.

El cultivo de este tipo de plantas permitiría además incrementar el secuestro de gases de efecto invernadero, lo que ofrece importantes ventajas ante las crecientes preocupaciones sobre de los problemas ambientales de la actualidad.

Es inevitable que algunos nutrientes minerales sean removidos durante el cultivo de la biomasa, por lo que se considera esencial reciclar los que no se consuman en el proceso de producción de los biocombustibles, es decir, transportarlos desde las instalaciones donde ocurra dicho proceso de vuelta al terreno de cultivo.

Investigaciones a largo plazo sobre las prácticas agroecológicas que maximicen la productividad biomásica neta, la sustentabilidad y los beneficios ambientales de diversos sistemas de cultivo de biomasa serán necesarias para identificar las prácticas apropiadas, y las implicaciones de la distribución de tierras para producción de biocombustibles lignocelulósicos.

Enfocándose en el uso de cultivos dedicados a la producción de biocombustibles en lugar de destinar para ello los que originalmente tenían fines alimenticios, será posible superar muchas de las limitaciones problemáticas asociadas con nuestra estrecha dependencia en un número relativamente pequeño de cultivos alimenticios y desarrollar agroecosistemas para producción de biocombustibles compatibles con las metas ambientales contemporáneas.

### **2.7.1. Maíz**

En términos globales, el maíz es el cultivo de mayor producción de grano. Se generan alrededor de 820 millones de megatoneladas de grano al año, y una cantidad similar de rastrojos (hojas y mazorcas desgranadas) que está potencialmente disponible para producción de combustible.

La industria de etanol de Estados Unidos produjo más de 6,200 millones de litros de etanol en 2000 (Sun y Cheng, 2002), la mayoría del cual fue producido a partir de maíz. Sin embargo, un incremento en la producción de etanol a partir de maíz compite por el suelo contra la producción de alimentos a base de maíz.

Por otro lado, la conversión de la mitad de los rastrojos de maíz a etanol celulósico produciría aproximadamente 51 GL de etanol (como se observa en la Tabla 2.4). De esta manera, la cantidad total de etanol proveniente de rastrojos sería cerca del doble de la proveniente del grano; y esto sin incrementar la extensión de suelo utilizada.

No obstante, existe la preocupación de que remover incluso la mitad de los rastrojos generaría erosión y pérdida de carbono, por lo que se requeriría también la adición de fertilizantes adicionales para reemplazar los minerales perdidos.

Debido a los costos asociados con la recuperación de los rastrojos en una operación separada posterior a la cosecha del grano, será necesario el desarrollo de nuevos implementos agrícolas que permitan la cosecha simultánea del grano y los rastrojos para hacer viable el uso de los rastrojos.

### 2.7.2. Madera

La biomasa leñosa puede ser cultivada sosteniblemente para la producción de madera y papel; luego entonces también podría emplearse como materia prima para biocombustibles en algunas regiones.

Se ha reportado que es posible producir de 0.12 a 0.30 m<sup>3</sup> de bioetanol por tonelada de masa seca. Este valor es ligeramente mayor que el obtenido a partir de cultivos agrícolas. Adicionalmente, la tendencia creciente hacia los medios electrónicos y el reciclaje del papel pueden reducir la demanda de pulpa de madera, y esto presenta una oportunidad de redistribuir la biomasa leñosa para energéticos.

Adicionalmente, el servicio forestal de Estados Unidos enfrenta hoy en día el problema del manejo del exceso de residuos de madera que incrementan el riesgo de incendios. Además la invasión del escarabajo de la corteza del pino ha llevado a la mortalidad generalizada de árboles, que requerirán ser removidos para reducir el riesgo de incendios forestales catastróficos.

Teniendo esto en cuenta, la madera puede entonces representar oportunidades regionalmente específicas para cultivos sostenibles de materia prima para biocombustibles.

En perspectiva, la biomasa cultivada al año en el hemisferio norte para productos de madera tiene un contenido energético equivalente a cerca del 107 % del combustible líquido consumido en los Estados Unidos.

Esto sugiere que, cultivada adecuadamente, la madera es un recurso renovable que podría explotarse sustentablemente como materia prima lignocelulósica.

Con la finalidad de maximizar la biomasa producida por hectárea, la mejor práctica parece ser la cosecha de monte bajo, en la que las plantas se cortan cerca del nivel del suelo al final de la temporada de crecimiento cada 3 a 5 años. Las plantas rápidamente generan nuevos brotes a partir de los rizomas sin intervención alguna. De esta forma se minimizan las pérdidas de nutrientes minerales, erosión del suelo, emisiones de carbono y la inversión energética que conlleva el crecimiento de las raíces.

Cultivar durante el invierno en intervalos largos también mejora la biodiversidad, comparada con los cultivos anuales. Algunas especies de árboles aptas para cultivo de monte bajo presentan simbiosis con organismos fijadores de nitrógeno y asociaciones con micorrizas, lo que disminuye la cantidad necesaria de fertilizante.

### 2.7.3. Plantas C<sub>4</sub>

Las plantas perennes que usan la fotosíntesis tipo C<sub>4</sub>, como la caña de azúcar, el pasto elefante o las especies de *Miscanthus*, presentan de manera natural eficiencias más altas de luz, agua y nitrógeno, comparadas con las especies C<sub>3</sub>. La labranza reducida y los

sistemas de raíces de las plantas perennes añaden carbono al suelo y lo protegen de la erosión.

Adicionalmente, la estacionalidad de este tipo de plantas hace que tengan un periodo cíclico de senescencia, en el que los pastos perennes como *Miscanthus* movilizan los nutrientes minerales del tallo y hojas a las raíces al final de la estación de crecimiento. De esta manera, la cosecha de la biomasa durante el invierno resulta en una eliminación considerablemente baja de minerales.

Según estudios reportados en la literatura (Somerville et al., 2010), un cultivo de *Miscanthus giganteus* produjo 60 % más biomasa que un cultivo de maíz bien fertilizado y altamente productivo. Asimismo, se reporta que más de 600 Mha de suelo a nivel mundial ha caído en desuso de producción agrícola, la mayor parte en los últimos 16 años. Una fracción importante de esta superficie es adecuada para el cultivo de plantas perennes.

#### **2.7.4. Plantas CAM**

Aproximadamente 18 % de la superficie terrestre es semiárida (200 a 800 mm de precipitación, temperatura promedio mayor a 21 °C durante la estación de crecimiento y propensión a sequía). El uso de especies con altas eficiencias de agua y resistencia a las sequías, como son las especies de agave, representa una oportunidad potencial para la producción de biomasa con fines bioenergéticos.

El agave usa un tipo de fotosíntesis llamado “Metabolismo Ácido de las Crasuláceas” (CAM) que reduce en gran medida la cantidad de agua transpirada mediante la absorción de CO<sub>2</sub> durante la noche y luego transformándola en azúcares a través de la fotosíntesis durante el día.

Estas plantas, al abrir los estomas (poros) durante la noche, pierden mucho menos agua de la que perderían si los abrieran de día. De esta manera, especies como el agave tienen una eficiencia de agua que llega a ser hasta seis veces mayor que la que presentan las especies C<sub>3</sub>, como el trigo.

Algunas especies de agave se cultivan actualmente en aproximadamente 500,000 ha para producción de fibras o bebidas alcohólicas, por lo que las prácticas agronómicas ya están bien establecidas.

Adicionalmente, la mayor parte del suelo que ha caído en desuso agrícola es semiárido, y la extensión de tierra disponible para el cultivo de agave es vasta.

#### **2.7.5. Residuos vegetales**

Los residuos de la industria de conservas vegetales pueden ser considerados como biomasa residual. Están constituidos por materia orgánica, formada por las plantas, mediante la fotosíntesis. Por ello se consideran como una fuente de energía renovable. Por

Tabla 2.4: Estimado de productividad, precipitación y requerimientos de nitrógeno de cultivos potenciales para la producción de biocombustibles

<b>Cultivo</b>	<b>Productividad Promedio</b> MT/ha · año	<b>Conversión de Etanol</b> L/año	<b>Requerimiento de Agua</b> cm/año	<b>Tolerancia a la Sequía</b>	<b>Requerimiento de Nitrógeno</b> kg/ha · año
<b>Maíz</b>	10	3800 (total)	50 - 80	Baja	90 - 120
Grano	7	2900			
Rastrojos	3	900			
<b>Caña</b>	80 (húmedo)	9950 (total)	150 - 250	Moderada	0 - 100
Azúcar	11	6900			
Bagazo	10	3000			
<b>Miscanthus</b>	15 - 40	4600 - 12400	75 - 100	Baja	0 - 15
<b>Álamo</b>	5 - 11	1500 - 3400	70 - 105	Moderada	0 - 50
<b>Agave</b>	10 - 34	3000 - 10500	30 - 80	Alta	0 - 12

Fuente: Somerville et al. (2010)

otra parte, puesto que la producción de este tipo de biomasa residual se localiza en puntos muy concretos, su acumulación puede dar lugar a problemas de contaminación y deterioro del medio ambiente.

Si bien estos residuos biomásicos secos pueden utilizarse directamente como combustible, existe un interés creciente por el estudio de nuevos procesos en los que, a partir de los residuos y subproductos celulósicos, se obtengan productos de mayor valor.

En los últimos años ha recibido gran atención el estudio de procesos de transformación de estos materiales, dirigidos a la obtención de combustibles y productos químicos que actualmente se obtienen del petróleo.

La disponibilidad de los residuos agrícolas y forestales asegura sustratos abundantes y económicos, sin embargo, su recolección y transporte supone en muchos casos un costo adicional, que se refleja en la rentabilidad económica del proceso.

## Capítulo 3

# Antecedentes

### 3.1. Meta

La finalidad es convertir el material lignocelulósico en etanol. Para esto se debe llevar a cabo una hidrólisis de los polímeros a los monosacáridos. Posteriormente estos azúcares se convierten en etanol mediante un proceso de fermentación por medio de levaduras u otros microorganismos. Después el etanol se separa del caldo de fermentación, obteniéndose a una concentración baja, ya que concentraciones elevadas de etanol pueden inhibir a los microorganismos fermentadores. Finalmente el etanol debe ser concentrado para poder emplearlo como combustible (Schacht et al., 2008).

Sin embargo, se requiere mejorar diversos pasos del proceso para el uso eficiente de material lignocelulósico, como son el pretratamiento, la hidrólisis, la fermentación, y la purificación del etanol. Más preguntas todavía siguen abiertas para el uso de la lignina, que en su mayoría se utiliza para el suministro de energía.

### 3.2. Pretratamiento

El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo capaz de degradar la lignocelulosa. Un tratamiento eficaz debe ser de bajo costo y bajo consumo energético, fácil recuperación y reutilización, además de ser aplicable a diversos materiales con eficiencia y reproducibilidad. Asimismo, debe evitar la degradación o pérdida de carbohidratos o formación de subproductos inhibitorios para las enzimas y microorganismos en los procesos de hidrólisis y fermentación.

La estructura de la pared celular en los materiales lignocelulósicos se asemeja a la

de una columna de hormigón armado, siendo las fibras de celulosa las varillas metálicas y la lignina el cemento. La biodegradación de las biomásas lignocelulósicas no tratadas es muy lenta y la extensión de la biodegradación también es baja. Actualmente se están desarrollando diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos; cuya finalidad es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para facilitar la liberación de la glucosa.

Para el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos, dada la complejidad de los componentes del material lignocelulósico, es necesario que se someta a tratamientos especiales para liberar los azúcares, que posteriormente podrán ser convertidos a diversos productos. El examen de las características estructurales de la pared celular indica dos obstáculos principales a la hidrólisis de la celulosa contenida en materiales lignocelulósicos. Estos son: la envoltura de lignina que rodea las fibras de celulosa y la resistencia estructural de la celulosa en sí.

Puesto que la protección de lignina representa un gran impedimento a la accesibilidad de la celulosa, antes de degradarla es necesario aplicar algún pretratamiento que disminuya el efecto protector de la lignina, aunque no es necesario eliminar o alterar toda la lignina para aumentar de forma significativa la susceptibilidad de los materiales a la degradación enzimática. Dependiendo del tipo de biomasa, es suficiente eliminar del 20 al 60% de la lignina.

Este pretratamiento es un proceso importante para la conversión práctica de celulosa. Además de eliminar la lignina, se requiere para alterar la estructura de la biomasa para hacer la celulosa más accesible a las enzimas que convertirán los polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables. En la Figura 3.1 se muestra un diagrama del pretratamiento de biomasa lignocelulósica.

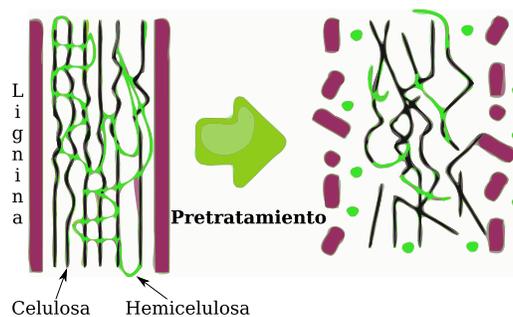


Figura 3.1: Pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Modificado de Mosier et al. (2005)

El propósito del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, e incrementar la porosidad del material. Un pretratamiento

eficiente debe cumplir los siguientes requerimientos (Sun y Cheng, 2002):

- Incremento de la capacidad de formación de azúcares
- Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos
- Evitar la formación de productos que inhiban pasos de proceso subsecuentes
- Ser rentable

Existen diversos métodos para romper la asociación de lignina-celulosa, algunos con la ayuda de sustancias que descomponen la lignina, dejando intacta la mayor parte de la celulosa. Y a partir de ellos se han desarrollado diferentes tipos de pretratamiento:

**Pretratamientos físicos:** Molienda, vaporización a presión e irradiación

**Pretratamientos químicos:** Pirólisis, ácidos, álcalis, gases, agentes oxidantes, disolventes de la celulosa o extracción de la lignina

**Pretratamientos biológicos:** Se utilizan microorganismos que atacan la madera, capaces de degradar la lignina.

Sin embargo, se requiere un mayor entendimiento del fundamento de los mecanismos físicos y químicos que ocurren durante el pretratamiento, así como de la relación que existe entre la composición química y la estructura fisicoquímica de la lignocelulosa con la digestibilidad enzimática de la celulosa y hemicelulosa. El objetivo es generar modelos predictivos de pretratamiento que permitan la selección, diseño, optimización y control de procesos de pretratamiento tecnologías que de acuerdo con materia prima de biomasa con el método apropiado y la configuración del proceso.

Una vez que finaliza el proceso de pretratamiento, se lleva a cabo la hidrólisis de la celulosa, seguida de la fermentación de los azúcares producidos durante el pretratamiento y la hidrólisis.

En la Tabla 3.1 se muestra el efecto de algunos métodos de pretratamiento en la composición química y estructura fisicoquímica de diferentes materiales lignocelulósicos.

### 3.2.1. Métodos físicos

#### Fragmentación

Dentro de los pretratamientos de este tipo, se encuentra la fragmentación, donde el material lignocelulósico es fragmentado, extruido (Morales Huerta, 2011), triturado o molido (hasta 0.2 mm) para aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión (Cuervo et al., 2009).

Tabla 3.1: Efecto de diferentes tipos de pretratamiento en biomasa lignocelulósica

Pretratamiento	Incrementa la Superficie de Contacto	Decristaliza la Celulosa	Remueve la Hemicelulosa	Remueve la Lignina	Altera la Lignina
Explosión de Vapor	*	o	*	o	o
Agua Líquida Caliente	*	ND	*	o	o
- con pH Controlado	*	ND	*	o	ND
- en Lecho Fijo	*	ND	*	o	o
Ácido Diluido	*	o	*	o	*
- en Lecho Fijo	*	o	*	o	*
AFEX	*	*	o	*	*
ARP	*	*	o	*	*
Alcalino	*	ND	o	*	*

\*: Mayor Efecto

o: Menor Efecto

ND: No Determinado

Fuente: Mosier et al. (2005)

### Pirólisis

Durante este proceso, la lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300 °C. Aunque este es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico, tiene un costo elevado en comparación con otros (Cuervo et al., 2009).

### 3.2.2. Métodos fisicoquímicos

El efecto de este tipo de métodos varía de acuerdo al material lignocelulósico, y entre ellos se encuentran:

#### Explosión de vapor

Es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves. La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160-260 °C (0.69-4.83 MPa), causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles.

Hoy en día se aplica comercialmente para hidrolizar hemicelulosa para la manufactura de fibras y otros productos por el proceso Masonite (Mason, 1926). En este proceso la biomasa es introducida en recipientes donde se le somete vapor de alta presión durante pocos minutos sin la adición de otros compuestos químicos. Después de cierto tiempo, se libera el vapor rápidamente del reactor para reducir la presión.

La adición de ácido sulfúrico mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. Los factores que afectan el proceso son el tiempo de tratamiento, temperatura, humedad y tamaño de partícula.

Los mayores cambios físicos y químicos a la biomasa lignocelulósica causados por la explosión de vapor se le atribuyen a la eliminación de la hemicelulosa. Esto incrementa la accesibilidad de las fibrillas de celulosa al ataque enzimático. La reducción del tamaño de partícula de la biomasa y el aumento de volumen de poro por la expansión explosiva es menos importante para la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica explotada con vapor.

La principal ventaja de este método es el requerimiento de energía relativamente bajo; y su principal desventaja es que se generan compuestos inhibitorios para los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación. (Moreno González, 2011)

### **Agua líquida caliente**

Los pretratamientos con agua líquida usan la presión para mantener el agua en estado líquido a temperaturas elevadas. Los procesos de flujo pasan agua líquida a elevadas temperaturas a través del material lignocelulósico. Este tipo de pretratamiento se ha denominado hidrotermólisis. Los procesos que utilizan mezclas de líquido vapor se denominan solvólisis o aquasolv.

La solvólisis por agua líquida caliente comprimida pone en contacto la biomasa con agua por hasta 15 min a temperaturas de 200-230 °C. Entre el 40 y el 60 % de la biomasa total es disuelta en el proceso, siendo removidos 4-22 % de celulosa, 35-60 % de lignina y toda la hemicelulosa. Más del 90 % de la hemicelulosa se recupera como azúcares monoméricos cuando se emplea ácido para hidrolizar el líquido resultante.

Se encontró que los resultados del pretratamiento son virtualmente independientes de la temperatura y el tiempo. La variabilidad de los resultados está relacionada al tipo de biomasa; y se reportó que la elevada solubilización de la lignina impide la recuperación de los azúcares provenientes de la hemicelulosa (Mosier et al., 2005).

Existen tres tipos de configuración para los reactores de agua líquida caliente:

**Paralelo** Se calienta un lodo de biomasa y agua a la temperatura deseada y se mantiene a las condiciones de pretratamiento durante el tiempo de residencia elegido antes de ser enfriado

**Contracorriente** Se diseña para mover el agua y la lignocelulosa en direcciones opuestas a través del reactor de pretratamiento

**Lecho fijo** El agua caliente fluye a través de un lecho de biomasa, hidroliza y disuelve componentes de la biomasa y posteriormente los arrastra fuera del reactor

### **Explosión de fibra de amoníaco (AFEX)**

Este pretratamiento mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos, los cuales son tratados con amoníaco a alta temperatura y presión. Alcanza elevadas velocidades de hidrólisis con rendimientos cercanos a los teóricos para concentraciones bajas de enzima.

Es un método muy apropiado para residuos herbáceos y agrícolas y funciona moderadamente bien en maderas duras, pero no así en maderas suaves (Mosier et al., 2005). Es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90 % de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, y no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulósico sea triturado. Por razones ambientales y económicas, el amoníaco se recicla después del pretratamiento (Cuervo et al., 2009).

El pretratamiento en lecho fijo consiste en pasar amoníaco en solución a través de una columna empacada con biomasa a temperatura elevada (160-180 °C) y velocidad baja ( $\sim 1$  cm/min), con un tiempo de residencia cercano a 15 min. Este método también se conoce como proceso de percolación reciclada de amoníaco (ARP), puesto que el amoníaco es separado y reciclado (Mosier et al., 2005).

El amoníaco acuoso reacciona principalmente con la lignina, pero no con la celulosa, causando la depolimerización de la lignina y la ruptura de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos.

Este tipo de pretratamientos simultáneamente reducen el contenido de lignina y remueven parte de la hemicelulosa mientras decristalizan la celulosa. De esta manera afectan la accesibilidad de la celulosa para las celulasas tanto microscópica como macroscópicamente.

El costo del amoníaco y de su recuperación en el proceso determina el del pretratamiento en general. Sin embargo, también influye el rendimiento total de azúcares obtenido, y la pérdida causada por la degradación de la misma. Condiciones moderadas de temperatura ( $< 90$  °C) y pH ( $< 12$ ) minimizan la degradación de azúcares manteniendo rendimientos elevados.

### **3.2.3. Métodos biológicos**

Estos representan un tipo ecológico de pretratamiento que incrementa la accesibilidad al material celulósico, favoreciendo su posterior hidrólisis y fermentación.

Se han descrito diversos organismos capaces de realizar el proceso de deslignificación de manera natural, siendo los principales los hongos basidiomicetos (Lázaro Anell et al., 2009). Este tipo de organismos producen enzimas ligninolíticas extracelulares como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP), que tienen una potente capacidad oxidante. Asimismo, los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* secretan

enzimas hidrolíticas (glucanasas) que hidrolizan los  $\beta$ -glucanos, permitiendo penetrar la pared celular de las plantas (González et al., 2011).

En la degradación enzimática de la lignina intervienen una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero y dan como resultado la desestabilización de los enlaces y finalmente la ruptura de la macromolécula (Quintero et al., 2006).

Las principales ventajas de estos métodos son el alto rendimiento del producto, las condiciones suaves de reacción, la baja cantidad de compuestos tóxicos generados y la mínima demanda energética. Sin embargo, son procesos muy lentos, lo que limita su aplicación a nivel industrial.

### **Sacarificación y fermentación simultáneas**

Una alternativa posible a este problema es la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), donde las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentativos están en un mismo reactor.

La SSF consolida la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los azúcares en un solo paso. Adicionalmente, se sabe que la actividad de las celulasas puede ser inhibida por sus productos (celobiosa y glucosa), por lo que la remoción de ellos por parte de los microorganismos fermentadores incrementa la actividad de las celulasas (Sun y Cheng, 2002).

#### **Ventajas:**

- Incremento de la tasa de hidrólisis por conversión de los azúcares que inhiben la actividad de las celulasas
- Disminución de los requerimientos enzimáticos
- Aumento en el rendimiento del producto
- Eliminación inmediata de la glucosa al producir etanol
- Reducción del tiempo requerido para finalizar el proceso
- Requerimiento de un único reactor

#### **Desventajas:**

- Incompatibilidad entre las temperaturas de hidrólisis y fermentación
- Baja tolerancia de los microorganismos al etanol generado

### 3.2.4. Métodos químicos

#### Ozonólisis

El ozono degrada la lignina y la hemicelulosa de sustratos como la paja de trigo, el algodón, el bagazo de caña y el aserrín. Las reacciones ocurren a presión y temperatura ambiente; se remueve la lignina hasta en un 8 % y el rendimiento aumenta en un 57 %; además de que no produce residuos tóxicos. Sin embargo, se requiere una gran cantidad de ozono, lo que eleva los costos (Vidal y Molinier, 1988).

#### Pretratamiento ácido

El pretratamiento ácido ha recibido una gran atención en investigación a lo largo de los años. Los ácidos como el sulfúrico o el clorhídrico concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos, por lo que requieren equipos especiales para trabajarlos adecuadamente.

Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos para hidrolizar la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, quedando la celulosa y la lignina. Esta última se extrae con solventes orgánicos. El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa; en algunos casos el rendimiento de hemicelulosa y glucosa después de la sacarificación enzimática llegan a alcanzar hasta el 90 % del máximo posible (Sun y Cheng, 2002).

Las principales desventajas de estos procesos se encuentran en la aplicación del ácido. Resulta en una mayor corrosión, por lo que el costo de los materiales de construcción del equipo es elevado en comparación con otros pretratamientos. Asimismo, es necesaria una neutralización posterior del pH para evitar la inhibición de los microorganismos fermentadores, esto conduce a la formación de partículas de desecho que deben ser separadas y eliminadas (Cuervo et al., 2009).

**Pretratamiento ácido en lecho fijo** La adición de ácido diluido en un reactor de lecho fijo es efectiva para hidrolizar la hemicelulosa. Condiciones más severas de acidez permiten hidrolizar fracciones más resistentes de la biomasa. Se hace fluir una corriente de agua fría primero por la zona de alta temperatura y posteriormente por la de baja temperatura. De esta manera se reduce la exposición de los azúcares a las condiciones severas, elevando el rendimiento.

A pesar de los excelentes rendimientos de azúcares obtenidos a partir de la hemicelulosa, y de la obtención de celulosa altamente digerible con bajas cargas de ácido, este tipo de sistemas requiere un significativo suministro de energía, debido a la configuración del equipo y el requerimiento elevado de agua. Por esta razón no se ha demostrado la aplicabilidad comercial de estos métodos (Mosier et al., 2005).

### **Pretratamiento alcalino**

Es la adición de bases diluidas a la biomasa, lo que permite la disolución de la lignina, por lo que la eficiencia del proceso depende del contenido de la misma en el material. Se requieren menores temperaturas y presiones en comparación con otros métodos de pretratamiento, siendo posibles incluso los procesos a condiciones ambientales.

El hidróxido de sodio diluido produce hinchamiento, permitiendo un incremento en el área superficial interna, lo que reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos.

En las maderas duras se presenta un incremento en la digestibilidad y un descenso del contenido de lignina, pero en maderas suaves con contenido de lignina de hasta 26 % no se han obtenido resultados eficientes.

Además, el costo de estos procesos es elevado y se requieren tiempos de operación muy largos (días). Además, a diferencia de otros métodos, se presentan limitantes ocasionadas por las sales generadas durante el proceso. Debido a lo anterior, este método aún no es competitivo a gran escala (Sun y Cheng, 2002).

### **Deslignificación oxidativa**

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad del material lignocelulósico a la hidrólisis enzimática. Es capaz de eliminar cerca del 50 % de la lignina y la mayor parte de la hemicelulosa, misma que se solubiliza y posteriormente libera glucosa durante la hidrólisis (Cuervo et al., 2009).

### **Proceso Kraft**

A pesar de sus más de cien años de existencia el proceso Kraft de obtención de pulpa para papel ha experimentado relativamente pocos cambios, como son el empleo de aditivos quinónicos y la cocción extendida (Pérez et al., 2000). Esto posibilita la obtención de pulpas con contenidos de lignina considerablemente bajos; sin embargo, los reactivos de blanqueo empleados aún generan efluentes altamente contaminantes (Gumeta Chávez et al., 2007).

### **Procesos organosolv**

Los llamados procesos organosolv también se usan para el tratamiento de los materiales lignocelulósicos. Generalmente se emplean la mezcla: agua, disolvente orgánico y ácido. Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona; y ácidos como el sulfúrico y el clorhídrico.

La función del ácido es actuar como catalizador de la reacción de deslignificación, rompiendo los enlaces de la lignina y de la celulosa. El agua actúa como nucleófilo y reacciona con los centros activados por el catalizador en la protolignina. El disolvente orgánico solubiliza la lignina e impregna el tejido vegetal, llevando los reactivos a la protolignina y los fragmentos resultantes de lignina desde la parte interna de la célula hacia el seno de la solución.

Estos procesos son más económicos y menos contaminantes que los procesos convencionales como el Kraft (Gumeta Chávez et al., 2007). Además, una posible modificación a estos procesos consiste en el cambio de las condiciones experimentales, elevando la temperatura y presión de operación. Esto ofrece mejores rendimientos independientemente de la materia prima empleada.

Algunos estudios realizados con etanol como cosolvente muestran que la mejor composición fue una mezcla de etanol-agua 1:1/v:v; y que la mayor parte de la remoción de la lignina ocurre durante los primeros 30 minutos de reacción.

Asimismo, se encontró que la presión ejerce un ligero efecto en la deslignificación, a diferencia de la temperatura, que es un parámetro sumamente importante y tiene un fuerte efecto en el proceso. Los mejores resultados se obtuvieron a una temperatura de 190 °C y una presión de 16 MPa (Pasquini et al., 2005).

### **3.3. Hidrólisis de celulosa**

La hidrólisis de la celulosa puede ser catalizada eficazmente tanto por ácidos como por enzimas celulolíticas, produciendo los azúcares reductores que posteriormente serán convertidos a etanol.

Los catalizadores ácidos tienen la desventaja de la adición de una sustancia corrosiva que debe ser recuperada, mientras que los enzimáticos conducen a largos tiempos de residencia y a biomasa adicional, que debe ser eliminada.

#### **3.3.1. Hidrólisis ácida**

La hidrólisis ácida ha sido la tecnología más usada para la obtención de azúcares reductores (fermentables) a partir de materia lignocelulósica. Consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa en sus monómeros elementales (azúcares fermentables o reductores). El grado de degradación de la biomasa depende de la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de hidrólisis. A medida que actúa el ácido, el peso molecular y la viscosidad de los productos decrecen y el poder reductor aumenta.

El ácido puede introducirse profundamente en la estructura morfológica de la celulosa

debido su pequeño tamaño molecular, y llevar a cabo una reacción secuencial de hidrólisis. Los principales inconvenientes de este proceso son: el rendimiento relativamente bajo, la alta formación de subproductos y el elevado consumo de energía.

El mecanismo molecular de la hidrólisis ácida consta de tres pasos:

1. Se forma un ácido conjugado mediante la adición de un protón al átomo de oxígeno que conecta dos unidades de azúcar.
2. El enlace glucosídico C-O se rompe y se forma un ion cíclico de carbonio. Este es el paso determinante.
3. Mediante una adición rápida de agua, este ion es transferido formando glucosa en el último paso de la reacción.

La velocidad de reacción es muy rápida al principio, y disminuye posteriormente. Las velocidades iniciales elevadas se atribuyen a la fracción amorfa de la celulosa, y las velocidades bajas a la fracción cristalina del sustrato.

La eficiencia del proceso depende de diferentes variables:

**Acidez:** A menor pH, la hidrólisis será más agresiva, hidrolizando más efectivamente la celulosa, pero existe el riesgo de degradar también los azúcares reductores.

**Temperatura:** A mayor temperatura, mayor será la velocidad de hidrólisis de celulosa y la velocidad de degradación de los azúcares

**Tiempo:** Reacciones largas hidrolizan una mayor proporción tanto de celulosa como de azúcares reductores.

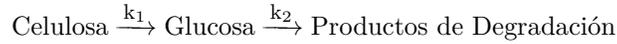
Estudios recientes realizados con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) reportan que las condiciones óptimas de operación para este tipo de hidrólisis dependen de la materia prima. Para la hidrólisis de bagazo de caña sin pretratar, la mayor concentración de azúcares reductores totales se obtuvo en condiciones de temperatura de 45 y 75 °C y un tiempo de 60 y 90 minutos, respectivamente (Domínguez Domínguez et al., 2011).

#### **Modelo cinético** (Schacht et al., 2008)

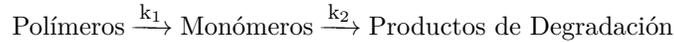
El modelado de la cinética de descomposición de la celulosa es sumamente complicado, debido a la estructura del sustrato. La accesibilidad de los enlaces glucosídicos cambia constantemente con el avance de la reacción. Asimismo, otros tipos de enlaces, como los de la xilosa o grupos acetilo son incluso más fuertes que los glucosídicos.

El número y variedad de modelos es extenso y puede variar de acuerdo con los compuestos específicos dentro del sistema. Un modelo empleado comúnmente está basado en

dos reacciones consecutivas de primer orden:



Este modelo también se puede aplicar exitosamente a la descomposición de la hemicelulosa. Se puede generalizar a:



Donde  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes cinéticas de las reacciones. La integración de las ecuaciones diferenciales resulta en una ecuación para la cantidad de los monómeros:

$$M = M_0 e^{-k_2 t} + P_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} \left( e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) \quad (3.1)$$

Siendo “M” la concentración del monómero, “P” la del polímero y “t” el tiempo de reacción. El subíndice “0” indica el valor inicial.

Este modelo se puede ampliar asumiendo un tipo reactivo de polímero como una fracción “ $\alpha$ ” de la cantidad total de sustrato, y un tipo no reactivo. Incorporando esto, se obtiene:

$$M = M_0 e^{-k_2 t} + \alpha P_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} \left( e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) \quad (3.2)$$

La influencia combinada de la temperatura y el tiempo de residencia se pueden incorporar mediante la introducción de un coeficiente de severidad, que hace posible considerar ambas simultáneamente. Este coeficiente “ $R_0$ ” fue introducido por Overend y Chornet (1994):

$$R_0 = t \cdot \exp \left( \frac{T - 100}{14.75} \right) \quad (3.3)$$

Con “t” como tiempo de reacción (min) y “T” como temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.3.2. Hidrólisis enzimática

Debido a las desventajas de la hidrólisis ácida, hoy en día es preferida la hidrólisis enzimática. Puede dar un producto puro con un rendimiento cuantitativo, consumiendo menos energía, sin embargo, la enzima es una macromolécula, por lo que su acceso a la celulosa en un sustrato heterogéneo e insoluble puede estar restringido por muchos factores que no intervienen en la catálisis ácida.

En consecuencia de esto, el mecanismo de reacción es muy diferente, y mucho más complejo. El mecanismo de reacción para la hidrólisis enzimática se ha discutido ampliamente en la literatura, pero aún no es enteramente comprendido.

El tamaño de poro relativamente pequeño de las estructuras lignocelulósicas (alrededor de 51 Å), es la razón de los largos tiempos de reacción durante la catálisis enzimática, mientras que en la catálisis ácida, la especie activa, protones de 4 Å de diámetro, pueden difundirse fácilmente a través del sustrato.

Como ya se ha discutido, el pretratamiento del material lignocelulósico conduce a una reacción con tiempos mucho más cortos para la descomposición enzimática. Las condiciones de reacción deben elegirse en un intervalo bien definido, ya que la hemicelulosa se descompone rápidamente en monosacáridos, mientras que la celulosa requiere un tratamiento mucho más severo para el rendimiento sustancial de monosacáridos.

Asimismo, se ha demostrado experimentalmente que los monosacáridos subsecuentemente se convierten a productos de degradación en procesos de elevadas temperaturas o tiempos de residencia.

Los costos de las enzimas son una parte sustancial para la producción de bioetanol. Si se desea reciclar las enzimas para su uso repetido, se deben mantener en el reactor mientras el producto es retirado, o en su defecto, separarlas del producto en un proceso posterior. Una alternativa a esto es emplear enzimas inmovilizadas, pero se debe asegurar que las enzimas mantengan su actividad bajo estas condiciones.

### Obtención de las celulasas

Las celulasas pueden aislarse a partir de numerosos microorganismos; si bien las más extensamente estudiadas son las obtenidas a partir de distintas especies de *Trichoderma*, y en particular de *Trichoderma reesei*, por lo que el conocimiento de las características generales de las celulasas con frecuencia se basa en las investigaciones realizadas sobre las celulasas obtenidas de esta especie. Para las enzimas de este género, el pH y la temperatura óptimos se encuentran alrededor de 4.8 y de 40 a 50 °C, respectivamente.

También se han estudiado celulasas bacterianas obtenidas a partir de microorganismos mesofílicos y termofílicos. Se han empleado cultivos mixtos de levaduras con especies de *Clostridium*. Las celulasas secretadas por este microorganismo son endo- y exo- glucanasas, presentando un pH óptimo de 5.2 y 5.4; y una temperatura óptima de 65 y 67 °C respectivamente. La relación de actividad de endoglucanasa a exoglucanasa es alta.

La celulasa fúngica de *Trichoderma reesei* en comparación, presenta mayor actividad de exocelulasa. La actividad de celobiasa extracelular y de  $\beta$ -xilosidasa es nula para *Clostridium Thermocellum*, a diferencia de las celulasas de *Trichoderma reesei*.

Una breve comparación indica que las celulasas bacterianas y fúngicas son diferentes. Además de las diferencias de pH y temperatura óptimos, la diferencia principal es la alta relación de actividad extracelular endo-exo en celulasas bacterianas en comparación con las fúngicas. Pero en ambos casos, las enzimas logran una desaparición significativa de la

celulosa.

Adicionalmente, se han caracterizado las actividades de celulasa y xilanasa para otras bacterias celulolíticas, la mayor parte de las cuales se encuentran naturalmente en el sistema digestivo de los rumiantes.

## 3.4. Fermentación

La producción de etanol a partir de biomasa celulósica se logra a través de la fermentación de los azúcares reductores obtenidos durante la hidrólisis de la celulosa. La llevan a cabo diferentes microorganismos, ya sean levaduras o bacterias.

La degradación de la biomasa vegetal genera, además de las hexosas, grandes cantidades de azúcares como la xilosa y la arabinosa, pentosas que no pueden ser fermentadas por organismos como *Saccharomyces cerevisiae*.

Por esta razón, se requiere emplear organismos fermentadores de hexosas junto con fermentadores de pentosas; o en su defecto, fermentadores de hexosas modificados genéticamente para transportar y fermentar pentosas.

### 3.4.1. Inhibición por productos de degradación

Desafortunadamente, durante el proceso de descomposición de la biomasa, se forman productos de degradación, los cuales inhiben la acción normal de los microorganismos fermentadores. Entre estos productos se encuentran el ácido acético, que se deriva de la descomposición de la hemicelulosa, el furfural y el hidroximetilfurfural.

Dichos compuestos presentan una fuerte influencia inhibitoria en las levaduras, la cual es mayor en los microorganismos con capacidad para fermentar pentosas que en los que fermentan hexosas. Adicionalmente, la descomposición de lignina produce compuestos fenólicos, que inhiben fuertemente tanto la acción de las levaduras como la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa.

## 3.5. Purificación

Para la separación de etanol, los procesos comunes usan una primera destilación en columna, llamada columna de cerveza. Los sólidos remanentes y la mayor parte del agua son separados en esta columna. En la parte superior se remueve el etanol, junto con el CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación. El dióxido de carbono se lava y se recircula al fondo, donde se encuentran todos los sólidos; estos se separan posteriormente mediante centrifugación. La fracción líquida se concentra con el calor de la destilación y el agua

condensada regresa al proceso. Finalmente, el producto obtenido en esta columna contiene cerca de 37% de etanol.

El etanol es enriquecido en otra columna de destilación hasta la concentración azeotrópica de 96%. Para producir alcohol absoluto, se han desarrollado y empleado diversos métodos de destilación, parcialmente con compuestos como el benceno. Un proceso más reciente y ecológico es la eliminación de agua por adsorción en tamiz molecular.

### 3.6. Hidrólisis y fermentación simultáneas

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un huésped atractivo para la producción de una gran variedad de productos de importancia médica y alimenticia, debido a que se trata de un organismo no patógeno libre de endotoxinas para el hombre. Su utilización a escala industrial se remonta siglos atrás.

Presenta ventajas como su fácil manejo y alta velocidad de crecimiento en comparación con bacterias en condiciones anaerobias, capacidad para realizar procesos postraduccionales de proteínas complejas, etc. Por razones como estas, *S. cerevisiae* se ha usado en numerosas investigaciones cuyo objetivo es producir etanol a partir de material lignocelulósico.

Se ha utilizado a *S. cerevisiae* para expresar genes de celulasas con la finalidad de sacarificar y fermentar simultáneamente. La expresión en *S. cerevisiae* de los genes que codifican para tres enzimas celulolíticas: una  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus aculeatus*, una endoglucanasa y una celobiasa de *Trichoderma reesei* permiten una fermentación directa y eficiente de la celulosa amorfa a etanol logrando un 88.5% del rendimiento teórico. Este biocatalizador tiene la habilidad de inducir de manera sinérgica y secuencial la degradación de celulosa para producción de etanol.

La integración estratégica del metabolismo de toda la variedad de azúcares presentes en los hidrolizados de lignocelulosa, así como la hidrólisis de celulosa mediante la expresión heteróloga de celulasas en cepas de levaduras industriales productoras de etanol, permite prever los alcances que tendrá la biotecnología en la producción de etanol.

## Capítulo 4

# Metodología

### 4.1. Caracterización del bagazo de agave

El procedimiento empleado para el análisis del bagazo de agave está basado en la capacidad de diferentes soluciones de detergentes para disolver los componentes no fibrosos del material, y la posibilidad de separar las fibras mediante filtración.

En el presente proyecto se utilizó una modificación del método de Van Soest-Wine; el cual se basa en un procedimiento de análisis con detergente neutro (NDF) y detergente ácido (ADF); que no requiere de equipos especializados para llevar a cabo la disolución y filtración (Contreras Lara et al., 1999). Este método permite obtener un estimado de la proporción principal de cada componente de la fibra vegetal: celulosa, hemicelulosa y lignina (Moreno González, 2011).

En la Figura 4.1 se muestra un diagrama esquemático del método empleado para caracterizar el bagazo de agave (modificación del método de Van Soest-Wine). Se utilizó un sistema clásico de reflujo con un matraz de bola y un refrigerante.

#### 4.1.1. Sustrato

Para la caracterización se utilizó como materia prima bagazo de agave proveniente de Tequila Patrón. Este se cortó y tamizó a un tamaño de malla de 40. Se toma como base aproximadamente un gramo de bagazo para su caracterización completa.

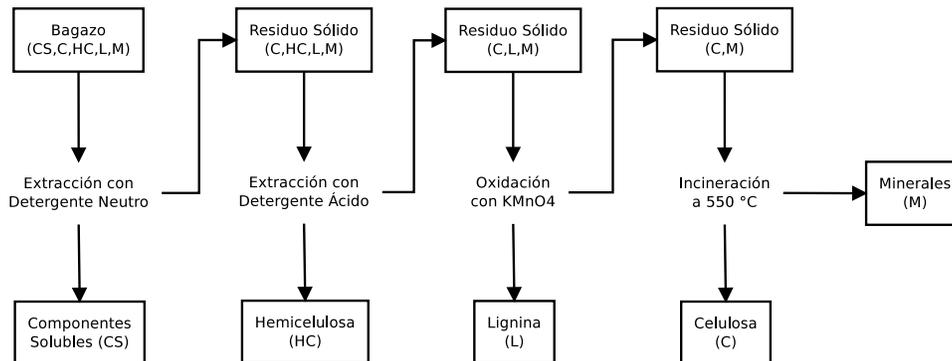


Figura 4.1: Método de Van Soest-Wine (modificado)

#### 4.1.2. Reactivos

##### Solución detergente NDF

Solución acuosa con 3 % (m/v) de laurilsulfato de sodio, 2 % (m/v) de etilendiaminotetraacetato de sodio, 0.5 % (m/v) de fosfato disódico, 0.7 % (m/v) de borato de sodio decahidratado y 1 % (v/v) de etilcelulosa.

##### Solución detergente ADF

Solución acuosa con 2 % (m/v) de bromuro de cetiltrimetilamonio y 3 % (v/v) de ácido sulfúrico concentrado.

##### Solución saturada de $\text{KMnO}_4$

Solución acuosa de permanganato de potasio al 5 % (m/v)

#### 4.1.3. Procedimiento

Después de cada tratamiento, las muestras se secan a 105 °C y se pesan.

1. Se seca el bagazo a 105 °C.
2. Se aplica el detergente NDF a 100 °C y se filtra. Posteriormente se repite este paso con el detergente ADF
3. Se aplica la solución de  $\text{KMnO}_4$  y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se repite este paso hasta que la solución queda color púrpura.
4. Se realizan lavados con agua destilada caliente, filtrando entre cada lavado, hasta que no se genere espuma durante la filtración.

5. Se calcina el remanente de la muestra a 550 °C.

### **Determinación de concentraciones**

La estimación de la proporción de los distintos componentes del residuo lignocelulósico se determina gravimétricamente considerando la pérdida en peso que la materia presenta después de cada tratamiento. El detergente NDF elimina los componentes solubles de la fibra, el ADF extrae la hemicelulosa, el  $\text{KMnO}_4$  retira la lignina y la incineración convierte la celulosa en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en estado gaseoso, quedando únicamente los minerales insolubles.

## **4.2. Determinaciones de concentración de proteína**

Existen varios métodos para determinar la concentración de proteínas de una muestra, tales como la determinación de la absorbancia a 280 nm, o mediante la formación de derivados coloreados de las proteínas, base de los métodos de Biuret o de Lowry. En estos casos se forma un complejo coloreado de cobre con el enlace peptídico; en el método de Lowry, además del complejo anterior también se forma un derivado de las tirosinas que contribuye a la absorbancia total.

El método utilizado durante este proyecto se basa en un principio diferente: se emplea un colorante hidrofóbico conocido como reactivo de Bradford, cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente.

Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y es más sensible que la medición de absorbancia a 280 nm.

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la seroalbúmina bovina.

#### 4.2.1. Material

Reactivo de Bradford	
Azul de Coomassie G-250	5 mg
Etanol	2.5 mL
Ácido Fosfórico	5 mL
Agua destilada	Aforar a 50 mL

#### Patrón de albúmina

Se disuelven 10 mg de albúmina bovina en 10 mL de agua destilada, con lo que se obtiene una disolución madre con una concentración de 1 mg/mL.

#### 4.2.2. Método

1. Preparar la curva patrón de albúmina bovina en un rango desde 0 hasta 60  $\mu\text{g}$ , de manera que el volumen final en cada tubo sea de 300 mL. Para ello mezclar el volumen adecuado de la disolución madre de albúmina bovina y el correspondiente volumen de agua, de acuerdo a la siguiente tabla:

Albúmina ( $\mu\text{L}$ )	0	10	20	30	40	50	60
Agua ( $\mu\text{L}$ )	300	290	280	270	260	250	240
Total ( $\mu\text{L}$ )	300	300	300	300	300	300	300

2. Preparación de tres diluciones cada muestra problema:

Proteína ( $\mu\text{L}$ )	10	5	1
Agua ( $\mu\text{L}$ )	290	295	299
( $\mu\text{L}$ )	300	300	300

3. Añadir 3 mL del reactivo de Bradford a todos los tubos, agitar. Después de 5 minutos proceder a la lectura de la absorbancia a 595 nm.

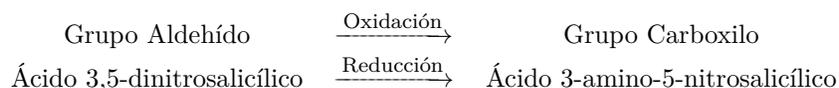
#### 4.2.3. Cálculo de concentración

1. Elaborar la curva patrón, trazando la concentración de la albúmina bovina contra su absorbancia.
2. Para las diluciones problema, interpolar las absorbancias obtenidas sobre la curva patrón para determinar la concentración de proteínas presentes en cada una de ellas.

3. Teniendo en cuenta los volúmenes de muestra utilizados en cada caso y la dilución realizada, calcular la concentración de proteínas de cada muestra analizada.

### 4.3. Determinaciones de actividad enzimática

Se llevaron a cabo mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (color amarillo) por la glucosa (u otros azúcares reductores) al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse midiendo la absorbancia en la zona de 540-570 nm.



#### 4.3.1. Información general

- Los análisis de celulasa se llevan a cabo en buffer de citrato 0.05 M pH 4.8, el cual se prepara con ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ).
- Para enzimas solubles, se filtra o centrifuga la muestra para remover sólidos y se analiza el sobrenadante o el filtrado. Para enzimas unidas a la célula, se homogenizan las células en el buffer apropiado. Las enzimas liofilizadas se disuelven en buffer a concentraciones de 1 a 5 mg/mL. Las enzimas en solución se diluyen en buffer.
- Los blancos de enzima sin sustrato y de sustrato sin enzima son incluidos con todos los análisis enzimáticos y los valores de las muestras son corregidos con los valores de los blancos.
- Para obtener resultados cuantitativos, las enzimas deben ser diluidas o el tiempo de reacción reducido hasta que la cantidad de producto trazada contra la concentración de la enzima sea razonablemente lineal. Para los procedimientos analíticos descritos aquí, esto es cuando cerca de 0.5 mg (o menos) de glucosa son producidos de carboximetilcelulosa, o celobiosa; o 2.0 mg de glucosa (o menos) son producidos de papel filtro, u otros sustratos insolubles. Para la celulosa insoluble, las velocidades iniciales tienen valores bajos, pues siempre existe algo de celulosa amorfa que es hidrolizada fácilmente, pero la velocidad cae rápidamente si la celulasa es incompleta. Para obtener resultados cuantitativos, las preparaciones de enzima deben ser comparadas con base en una conversión significativa e igual. El doble de enzima producirá la misma cantidad de azúcar en la mitad del tiempo, pero no el doble de azúcar en el mismo tiempo. Un valor arbitrario de 2.0 mg de azúcares reductores como glucosa de 50 mg de papel filtro (4% de conversión) en 60 minutos ha sido designado como el intercepto para calcular las unidades de celulasa de papel filtro.

- Habiendo determinado la actividad enzimática volumétrica de una muestra, y conociendo su concentración de proteína, se calcula su actividad específica dividiendo la primera entre la segunda.

### Estimación de los azúcares reductores

Se lleva a cabo mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Reactivo DNS	
Agua destilada	1416 mL
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10.6 g
Hidróxido de sodio	19.8 g
Sales de Rochelle (tartrato Na-K)	306 g
Fenol (fundir a 50 °C)	7.6 mL
Metabisulfito de sodio	8.3 g

### Estándares de glucosa:

0.2 - 5.0 mg de glucosa por mL o por 0.5 mL, según sea el caso.

### Procedimiento

Colocar 1 - 2 mL de muestra en un tubo de ensayo y añadir 3 mL de reactivo DNS. Introducir en agua hirviendo por 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Diluir las muestras de ser necesario para que la absorbancia en el espectrofotómetro sea entre 2 y 8. Incluir el estándar de glucosa y las muestras diluidas. Leer la absorbancia a 540 nm contra un blanco de agua destilada de absorbancia cero. Trazar los estándares en escala semilogarítmica ( $\log(A)$  contra concentración). Esto debería dar una línea recta que interseca la abscisa en 0.04 mg de glucosa. Este valor representa la glucosa perdida por oxidación. Para la determinación precisa a bajas concentraciones de glucosa añadir 0.1 mg de glucosa a cada muestra. Tres mililitros de reactivo DNS reaccionarán con alrededor de 10 mg de glucosa. Por lo tanto las soluciones concentradas de azúcar deberán diluirse de manera que las muestras para análisis contengan 5 mg o menos de azúcares reductores.

### Análisis enzimáticos

Los estándares deben ser preparados y diluidos de manera similar a las muestras desconocidas. Por ejemplo, para el análisis de papel filtro usar 0.5 mL de estándares que contengan 0.2 - 5.0 mg de glucosa por 0.5 mL. Añadir 1 mL de buffer 0.05 M y 3 mL de reactivo DNS.

## Comentarios

El color se produce únicamente bajo condiciones alcalinas, por lo que las muestras ácidas deben ser neutralizadas. Este método no es específico y mide cualquier compuesto reductor. Si se usa glucosa como estándar, los valores para la celobiosa serán 15 % bajos y para la xilosa 15 % altos en términos de masa. Las muestras que ebulLEN se deben dejar enfriar durante un tiempo razonable antes de su lectura. Las muestras que no ebulLEN se deterioran gradualmente.

### 4.3.2. Actividad de celulasa

#### Análisis de papel filtro (Ghose, 1987)

En la Figura 4.2 se muestra un diagrama del método de análisis de papel filtro, realizado a una escala diez veces menor con la finalidad de reducir costos y residuos contaminantes.

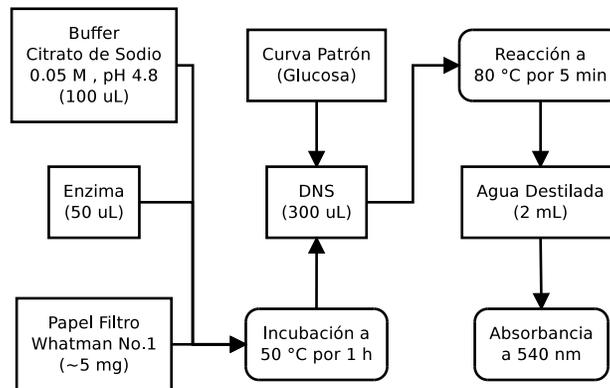


Figura 4.2: Análisis de papel filtro

#### Sustrato

Papel filtro Whatman número 1, 1.0 x 6.0 cm (~ 50 mg)

#### Método

1. Añadir 1.0 mL de buffer de citrato 0.05 M pH 4.8 a un tubo de ensayo de por lo menos 25 mL de capacidad.
2. Añadir 0.5 mL de enzima, diluida en buffer de citrato. Al menos dos diluciones se deben preparar para cada enzima investigada. Una dilución debe producir poco más

y una poco menos de 2.0 mg (cantidad absoluta) de glucosa (= azúcares reductores) en las condiciones de reacción.

3. Calentar a 50 °C, añadir el papel filtro, mezclar (no hay problema si una pequeña parte del papel filtro queda por encima de la superficie del líquido, pero si el papel “escala” por la pared del tubo, debe ser forzado hacia abajo).
4. Incubar a 50 °C durante 60 minutos.
5. Añadir 3.0 mL de DNS, mezclar. Transferir el tubo a una gradilla.
6. Hervir por exactamente 5.0 min. Todas las muestras, blancos y estándares deben ser hervidos juntos. Después, transferir a un baño de agua fría.
7. Añadir 20 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar mediante la inversión completa del tubo varias veces, de manera que la solución se separe del fondo del tubo en cada inversión (esto es importante).
8. Cuando la “pulpa” se haya asentado bien (por lo menos 20 minutos después), el color formado se mide contra el blanco cero a 540 nm. Si la pulpa no se asienta, lo hará después de agitarla con un agitador de vidrio (la necesidad de la agitación solo se puede observar después de algunos minutos de asentamiento).

**Blanco cero:** Se utiliza para calibrar el espectrofotómetro en absorbancia cero, contiene únicamente buffer y solución DNS.

**Blanco de enzima:** Se mide el color contra el blanco cero y se sustrae del valor del tubo de reacción apropiado. No contiene sustrato.

**Estándares de glucosa:** Se utilizan para construir la curva patrón.

### Cálculo de unidades

1. Construir una línea estándar de glucosa usando las concentraciones de glucosa trazadas contra la absorbancia a 540 nm.
2. Usando dicha línea, traducir los valores de absorbancia de los tubos de muestra (después de la sustracción del blanco de enzima) en glucosa (= mg de glucosa producidas durante la reacción).
3. Traducir las diluciones usadas en concentración de enzima:

$$\text{Concentración} = \frac{1}{\text{Dilución}} = \frac{\text{Volumen de enzima en dilución}}{\text{Volumen total de dilución}}$$

4. Estimar la concentración de enzima que produciría exactamente 2.0 mg de glucosa trazando la glucosa liberada contra la concentración de enzima.
5. Calcular FPU:

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{Concentración de enzima que produzca 2.0 mg de glucosa}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{mL}}$$

Debido a que el análisis de FPU no es lineal, el uso de las Unidades Internacionales *per se* es incorrecto, puesto que esta unidad está basada en velocidades iniciales, como las reacciones lineales en las que el producto es formado a la misma velocidad durante toda la reacción. Por lo tanto, se recomienda que los resultados se expresen simplemente como unidades por mililitro, como en el ejemplo dado.

### Derivación de la unidad FPU

La unidad FPU está basada en la Unidad internacional (IU)

$$\begin{aligned} 1 \text{ IU} &= 1 \mu\text{mol}/\text{min de sustrato convertido} \\ &= 1 \mu\text{mol}/\text{min de glucosa (azúcares reductores) formados} \\ &= 0.18 \text{ mg}/\text{min cuando el producto es glucosa} \end{aligned}$$

La cantidad de glucosa liberada en el análisis de FPU a la dilución crítica es 2.0 mg:

$$2 \text{ mg} \cdot \frac{1 \mu\text{mol}}{0.18 \text{ mg}} = 11.11 \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa es producida por 0.5 mL de enzima en 60 min:

$$\frac{11.11 \mu\text{mol}}{0.5 \text{ mL} \cdot 60 \text{ min}} = 0.37 \text{ IU}/\text{mL}$$

Por consiguiente, la cantidad de enzima (= concentración crítica de enzima = mL/mL) que libere 2.0 mg de glucosa en la reacción de FPU contiene 0.37 unidades, y:

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{Concentración crítica de enzima}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{Mililitro}}$$

### 4.3.3. Actividad de endoglucanasa

**Análisis de carboximetilcelulasa** (Ghose, 1987)

En la Figura 4.3 se muestra un diagrama esquemático de este método, realizado a una escala diez veces menor con la finalidad de reducir costos y residuos contaminantes.

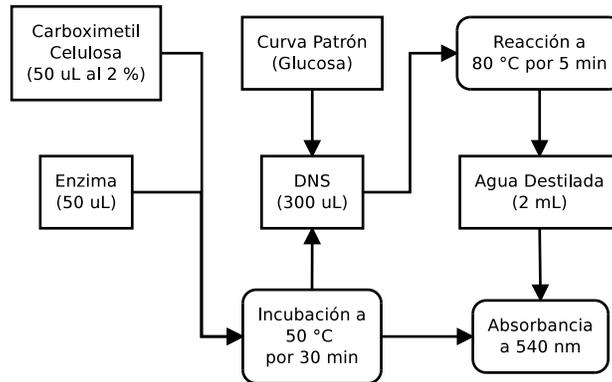


Figura 4.3: Análisis de carboximetilcelulasa

### Sustrato

Carboximetilcelulosa CMC 7L2 (grado de sustitución = 0.7) al 2% en buffer de citrato 0.05 M, pH 4.8.

### Método

1. Añadir 0.5 mL de enzima, diluida en buffer de citrato, a un tubo de ensayo de al menos 25 mL. Por lo menos dos diluciones se deben preparar para cada enzima investigada. Una dilución debe producir poco menos y una poco más de 0.5 mg (cantidad absoluta) de glucosa (= azúcares reductores) bajo las condiciones de reacción.
2. Calentar a 50 °C.
3. Añadir 0.5 mL de solución de sustrato, mezclar bien e incubar a 50 °C por 30 min.
4. Añadir 3.0 mL de DNS, mezclar. Transferir el tubo a una gradilla.
5. Hervir por exactamente 5.0 min. Todas las muestras, blancos y estándares deben ser hervidos juntos. Después, transferir inmediatamente a un baño de agua fría.
6. Añadir 20 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar mediante la inversión completa del tubo varias veces, de manera que la solución se separe del fondo del tubo en cada inversión (esto es importante).
7. Medir el color formado contra el blanco cero a 540 nm. De ser necesario (cuando se usen diluciones pequeñas), el color formado en el blanco de enzima es sustraído del de la muestra.

- Traducir la absorbancia de la muestra (corregida si fue sustraído el valor del blanco de enzima) en producción de glucosa durante la reacción, usando la curva estándar de glucosa.

**Blanco cero:** Se utiliza para calibrar el espectofotómetro en absorbancia cero, contiene únicamente buffer y solución DNS.

**Blanco de enzima:** Se mide el color contra el blanco cero y se sustrae del valor del tubo de reacción apropiado. No contiene sustrato.

**Estándares de glucosa:** Se utilizan para construir la curva patrón.

### Cálculo de unidades

- Construir una línea estándar de glucosa usando las concentraciones de glucosa trazadas contra la absorbancia a 540 nm.
- Usando dicha línea, traducir los valores de absorbancia de los tubos de muestra (después de la sustracción del blanco de enzima) en glucosa (= mg de glucosa producidas durante la reacción).
- Traducir las diluciones usadas en concentración de enzima:

$$\text{Concentración} = \frac{1}{\text{Dilución}} = \frac{\text{Volumen de enzima en dilución}}{\text{Volumen total de dilución}}$$

- Estimar la concentración de enzima que produciría exactamente 0.5 mg de glucosa trazando la glucosa liberada contra la concentración de enzima.
- Calcular CMC:

$$\text{CMC} = \frac{0.185}{\text{Concentración de enzima que produzca 0.5 mg de glucosa}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{mL}}$$

Debido a que el análisis de CMC no es lineal, el uso de las Unidades Internacionales *per se* es incorrecto, puesto que esta unidad está basada en velocidades iniciales, como las reacciones lineales en las que el producto es formado a la misma velocidad durante toda la reacción. Por lo tanto, se recomienda que los resultados se expresen simplemente como unidades por mililitro, como en el ejemplo dado.

### Derivación de la unidad CMC

La unidad CMC está basada en la Unidad internacional (IU)

1 IU = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de sustrato convertido  
 = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de glucosa (azúcares reductores) formados  
 = 0.18 mg/min cuando el producto es glucosa  
 La cantidad de glucosa liberada en el análisis de CMC a la dilución crítica es 0.5 mg:

$$0.5 \text{ mg} \cdot \frac{1 \mu\text{mol}}{0.18 \text{ mg}} = 2.78 \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa es producida por 0.5 mL de enzima en 30 min:

$$\frac{2.78 \mu\text{mol}}{0.5 \text{ mL} \cdot 30 \text{ min}} = 0.185 \text{ IU/mL}$$

Por consiguiente, la cantidad de enzima (= concentración crítica de enzima = mL/mL) que libere 0.5 mg de glucosa en la reacción de CMC contiene 0.185 unidades, y:

$$\text{CMC} = \frac{0.185}{\text{Concentración crítica de enzima}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{Mililitro}}$$

#### Nota a los métodos de FPU y CMC

Los análisis de FPU y CMC están basados en el mismo principio de estimación de una cantidad fija (y relativamente grande) de glucosa del sustrato relevante. Como resultado, cuando se lleven a cabo estos análisis por primera vez, pueden sorprender las elevadas absorbancias obtenidas. Si, dependiendo del espectrofotómetro usado, se encuentra que el color formado es tan denso que no puede ser medido, es permisible diluir el color antes de la medición (añadiendo 1.0 mL de agua destilada a 1 mL de solución colorida, mezclando y multiplicando la glucosa obtenida por 2). Sin embargo, dado que la reacción enzimática es no lineal, NO es permisible usar resultados de soluciones más diluidas y extrapolar a la cantidad crítica de glucosa. Las instrucción en todos los ensayos de que una dilución debe liberar más y una menos que la cantidad crítica de glucosa DEBE ser acatada en todos los casos.

Cuando se analicen bajos niveles de actividad, se puede encontrar que incluso la enzima sin diluir libere una cantidad de glucosa menor a la crítica. En este caso, calcular las actividades a partir de la cantidad absoluta de glucosa liberada por la enzima sin diluir como sigue:

- FPU = mg de glucosa liberados x 0.185

Derivación:

$$\frac{1 \mu\text{mol}}{0.18 \text{ mg}} \cdot \frac{1}{0.5 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{60 \text{ min}} = 0.185 \frac{\text{Unidades}}{\text{mL} \cdot \text{mg}}$$

- CMC = mg de glucosa liberados x 0.37

Derivación:

$$\frac{1 \mu\text{mol}}{0.18 \text{ mg}} \cdot \frac{1}{0.5 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{30 \text{ min}} = 0.37 \frac{\text{Unidades}}{\text{mL} \cdot \text{mg}}$$

En todos los casos, si se desea obtener resultados precisos, la enzima sin diluir debe ser usada únicamente cuando la cantidad de glucosa producida sea igual o menor a la cantidad crítica de la reacción correspondiente.

#### 4.3.4. Actividad de xilanasas

##### Análisis de xilanasas por método de DNS (Bailey et al., 1992)

En la Figura 4.4 se muestra un diagrama del método de análisis de xilanasas, realizado a una escala diez veces menor con la finalidad de reducir costos y residuos contaminantes.

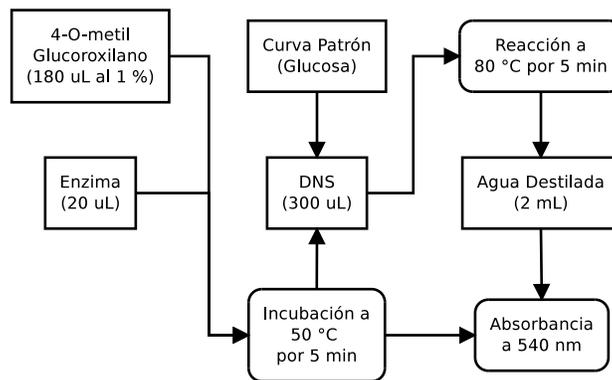


Figura 4.4: Análisis de xilanasas

##### Sustrato

4-O-metil glucoroxilano al 1.0 % en buffer de Na-Citrato 0.05 M, pH 5.3. Se homogeniza 1.0 g de xilano en 80 mL de buffer a 60 °C, y se calienta a punto de ebullición. Se enfría con agitación continua, se cubre y se agita lentamente durante una noche. Se afora a 100 mL con buffer y se almacena a 4 °C por un máximo de una semana o se congelan alícuotas a -20 °C. Se agita bien después de descongelar.

##### Procedimiento

1. Añadir 1.8 mL de solución de sustrato a un tubo de ensayo de 15 mL, preferentemente empleando una pipeta automática. Calentar a 50 °C.
2. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de enzima diluida apropiadamente en el buffer de citrato, mezclar.

3. Incubar 300 s (5 min) a 50 °C.
4. Añadir 3.0 mL de DNS, mezclar y retirar el tubo del baño de agua. Hervir por 5 min, enfriar en agua helada (Nota 1).
5. Medir el color producido a 540 nm contra el blanco de reactivo.
6. Corregir la absorbancia para el color del blanco de enzima si es necesario (Nota 2).
7. Usando la línea estándar, convertir la absorbancia corregida a unidades de actividad enzimática (nkat/mL) (Nota 3).
8. Calcular la actividad en la muestra original (sin diluir) multiplicando las unidades de actividad por el factor de dilución.

**Blanco de reactivo:** Se utiliza para calibrar el espectofotómetro en absorbancia cero. Esta solución no contiene enzima.

**Blanco de enzima:** Se mide el color contra el blanco cero y se sustrae del valor del tubo de reacción apropiado. No contiene sustrato.

### Estándar de xilosa

El estándar es una solución de xilosa pura 0.01 M (=0.15 g por 100 mL de buffer). Puede ser almacenada en alícuotas a -20 °C. Después de descongelar los tubos deben ser agitados vigorosamente, ya que la solución se separa en capas al congelarse. Una solución mezclada pobremente resultará en un estándar inaceptable (Nota 4).

La solución de xilosa se diluye (en buffer) como sigue:

1:1 (Sin diluir)	= 10.0 $\mu\text{mol/mL}$	= 33.3 nkat/mL *
1:2	= 5.0	= 16.7
1:3	= 3.33	= 11.1
1:5	= 2.0	= 6.7

\* **Ejemplo:** Si el color producido en la reacción enzimática corresponde al color en el mayor punto estándar (10  $\mu\text{mol/mL}$ ), la producción de xilosa (azúcares reductores) es:

$$\frac{10 \mu\text{mol/mL}}{300 \text{ s}} = 0.033 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{s}} = 33.3 \frac{\text{nmol}}{\text{mL} \cdot \text{s}} = 33.3 \text{ nkat/mL}$$

La línea estándar se construye usando los cuatro puntos estándar, con la absorbancia en la ordenada y la concentración de xilosa convertida a nkat/mL en la abscisa.

**Notas:**

1. Cuando se use la receta modificada de DNS, se requiere un tiempo de ebullición de 15 min, no de 5 min como en el reactivo original.
2. Se requieren los blancos de enzima si la dilución es baja y/o la muestra contiene niveles altos de azúcares reductores
3. La línea estándar está basada en una reacción puramente química y es lineal a una absorbancia elevada. La linealidad de la reacción enzimática debe ser comprobada usando un lote representativo de enzima, con diluciones del 1% de solución de xilanasa que den absorbancias entre el rango de los cuatro puntos estándar.
4. Es recomendable construir una línea estándar para cada serie de análisis, con objeto de minimizar las variaciones debidas al uso de distintos lotes de sustrato y DNS, condiciones de ebullición, calibración de las pipetas, etc.

## 4.4. Pruebas de estabilidad enzimática

El coctel enzimático elegido durante este proyecto como el más adecuado para la hidrólisis de material lignocelulósico es nacional y sumamente activo. Sin embargo, no existen muchos estudios reportados en la literatura sobre sus características. Por esta razón fue necesario realizar algunas pruebas para conocer con mayor detalle las condiciones a las que se puede utilizar este coctel.

### 4.4.1. Método

1. Se incuban muestras de enzima a diferentes temperaturas durante 24 horas.
2. Se mide su actividad de celulasa mediante el método de análisis de papel filtro descrito en la sección 4.3.
3. Se traza una gráfica de actividad de celulasa contra temperatura de incubación.

## 4.5. Explosión de dióxido de carbono supercrítico

Se utilizó un reactor de acero de manufactura local, con capacidad de 40 mL y presión nominal mayor a 30 MPa. En las Figuras 4.5 y 4.6 se muestran una fotografía y un diagrama del reactor, respectivamente.

En el presente proyecto, la explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>-E) se utiliza como método de pretratamiento de material lignocelulósico. En la Figura 4.7 se muestra un diagrama esquemático del proceso.



Figura 4.5: Reactor utilizado para la SC-CO<sub>2</sub>-E

#### 4.5.1. Procedimiento

1. Se coloca 1 g de bagazo de agave seco con un tamaño de partícula de malla 40 dentro de una canastilla metálica.
2. Se introduce la canastilla en el reactor. Si es el caso, se introducen también las cantidades elegidas de agua y cosolvente.
3. Se carga la bomba de tipo jeringa a partir de un cilindro de CO<sub>2</sub> (5 MPa, Praxair, grado alimenticio).
4. Se alimenta el reactor empleando la bomba y se presuriza hasta alcanzar 7.5 MPa.
5. Se mide la temperatura interna del reactor mediante un termopar conectado a una pantalla, lo que permite su registro en línea. Se eleva empleando una camisa de calentamiento, y se controla por medio de un sistema electrónico de ajuste de temperatura.
6. Al llegar a la temperatura deseada, se inicia el conteo del tiempo de residencia establecido. En caso de que la presión se eleve demasiado, se puede liberar el exceso abriendo cuidadosamente la válvula de salida.
7. Una vez concluido el tiempo seleccionado, el reactor se despresuriza violentamente abriendo la válvula de salida, liberando el CO<sub>2</sub> a la atmósfera.

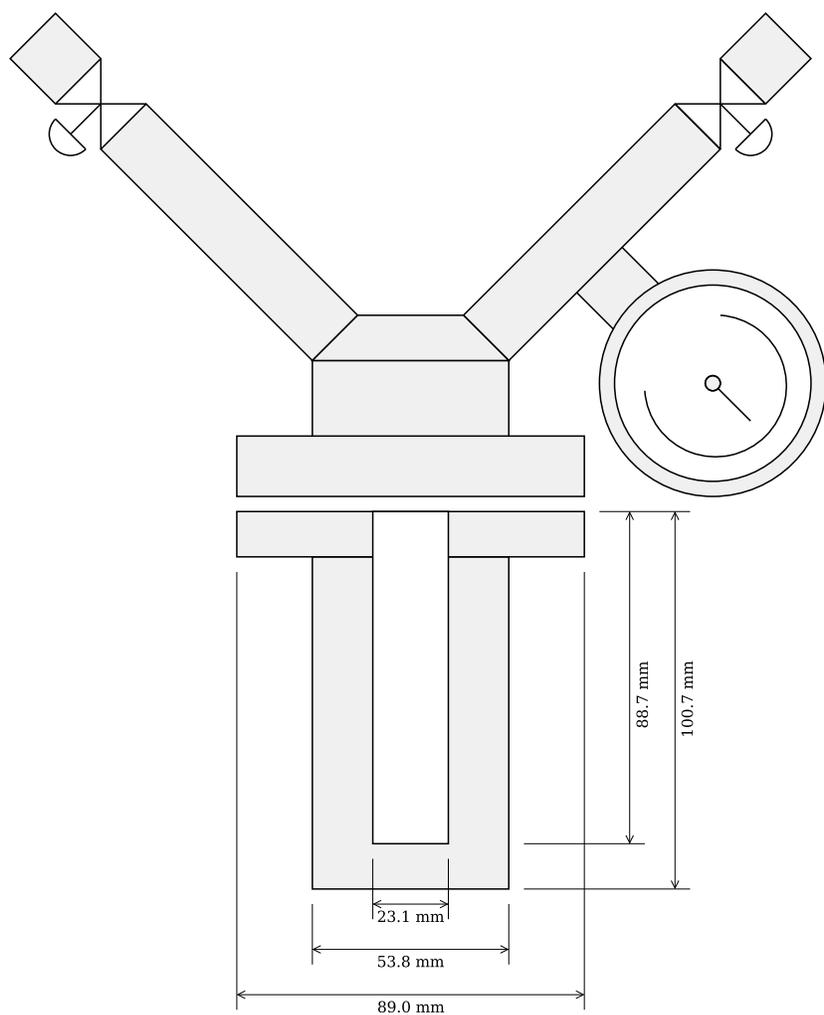


Figura 4.6: Diagrama del reactor utilizado para la SC-CO<sub>2</sub>-E

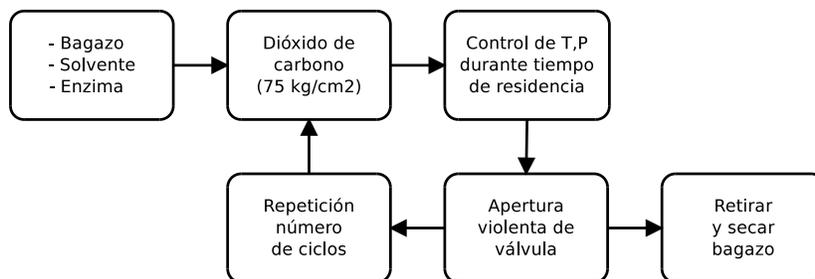


Figura 4.7: Explosión de CO<sub>2</sub> supercrítico (procedimiento)

8. Según sea el caso, se repite el proceso el número de ciclos determinado.
9. Al enfriarse el reactor, se retira la muestra de bagazo y se seca a 105 °C para su posterior análisis.

#### **4.5.2. Explosión y sacarificación simultáneas**

Se realiza de manera similar a la SC-CO<sub>2</sub>-E regular. Con la diferencia de que, en el paso 2, en lugar de agua se introduce el coctel enzimático elegido, a una concentración de 10 FPU por cada gramo de celulosa, diluido en buffer de citrato 0.05 M.

### **4.6. Análisis del bagazo de agave**

Se llevaron a cabo diversas pruebas al bagazo de agave, tanto crudo como bajo las diferentes condiciones de pretratamiento e hidrólisis. Esto con la finalidad de determinar con la mayor precisión posible el efecto de las distintas condiciones de pretratamiento sobre las diferentes propiedades del material.

#### **4.6.1. Isotermas de desorción de humedad**

Se realizaron mediciones de actividad de agua del bagazo de agave a diferentes concentraciones de agua, y con los valores obtenidos se construyeron isotermas de desorción de humedad. Esto con la finalidad de conocer las características físicas del bagazo, tales como la porosidad; y de esta manera poder determinar el efecto del pretratamiento sobre el material.

#### **Procedimiento**

1. Se secaron las muestras durante un mínimo de 12 horas a 105 °C. Posteriormente se pesaron empleando una balanza analítica.
2. Se añadieron a las muestras concentraciones conocidas de agua destilada.
3. Se cerraron herméticamente las muestras y se dejaron equilibrar durante 24 horas.
4. Se midió la actividad acuosa de las muestras a cada concentración de agua elegida, empleando un higrómetro de punto de rocío.
5. Utilizando estos datos, se trazaron isotermas de desorción de humedad para el bagazo de agave crudo y sometido a diferentes condiciones de pretratamiento.

#### 4.6.2. Análisis al microscopio

Las muestras de bagazo de agave fueron analizadas en un microscopio óptico a un aumento de 66x con la finalidad de observar los cambios sobre la estructura física del material ocasionados por las diferentes condiciones de pretratamiento.

Adicionalmente, se empleó floroglucina para teñir los tejidos lignificados, de manera que mediante este análisis fue posible también observar el efecto deslignificante del pretratamiento.

##### Procedimiento

1. Colocar la muestra sobre un portaobjetos.
2. Añadir una gota de floroglucina alcohólica al 1 %.
3. Dejar secar al aire.
4. Añadir una gota de HCl concentrado.
5. Observar al microscopio. Los tejidos lignificados adquieren una coloración rojiza.

#### 4.6.3. Valoración de azúcares reductores

Para la determinación de la cantidad de azúcares reductores disponibles para la fermentación, se empleó el método de DNS. Este método se describe con mayor detalle en la sección 4.3, ya que es el mismo que fue utilizado para determinar las diferentes actividades enzimáticas

##### Método

1. Introducir 125 mg de la muestra de bagazo a analizar en un tubo de ensayo de 10 mL de capacidad.
2. Añadir 2.5 mL del coctel enzimático elegido, diluido en buffer de citrato 0.05 M, a una concentración de 10 FPU por cada gramo de celulosa presente en la muestra de bagazo. <sup>1</sup>
3. En un baño de temperatura controlada incubar a la temperatura deseada durante el tiempo de sacarificación determinado. <sup>2</sup>
4. Centrifugar la muestra a 10,000 rpm durante 10 minutos.

---

<sup>1</sup>Las muestras pretratadas y sacarificadas simultáneamente ya fueron hidrolizadas, por lo que se agrega únicamente el buffer, es decir, no se añade la enzima.

<sup>2</sup>Saltar este paso para las muestras pretratadas y sacarificadas simultáneamente.

5. Tomar 25  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y agregarlos a 100  $\mu\text{L}$  de buffer de citrato 0.05 M.
6. Añadir 300  $\mu\text{L}$  de solución de DNS y hervir durante 5 minutos.
7. Agregar 3 mL de agua destilada para diluir el color y medir absorbancia a 540 nm.
8. Estimar la concentración de azúcares reductores empleando una curva patrón de glucosa (ver sección 4.3).

### Cálculo del porcentaje de sacarificación

Se determina de la siguiente manera:

$$\text{Sac (\%)} = 2 \cdot \frac{[A_r]}{X_c} \quad (4.1)$$

Donde  $[A_r]$  es la concentración de azúcares reductores obtenida, expresada en mg/mL; y  $X_c$  es la fracción masa de celulosa en el bagazo.

**Deducción:** Conociendo la composición del bagazo, las condiciones de operación y la cantidad de azúcares reductores en la muestra, se tiene:

$$\text{Sac (\%)} = \frac{[A_r] \left( \frac{\text{mg}_{\text{azúcar}}}{\text{mL}} \right) \cdot 100(\%)}{X_c \left( \frac{\text{mg}_{\text{celulosa}}}{\text{mg}_{\text{bagazo}}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ mg}_{\text{bagazo}}}{20 \text{ mL}}}$$

Realizando las reducciones pertinentes, esto se simplifica obteniendo la ecuación 4.1.

## Capítulo 5

# Resultados

### 5.1. Caracterización del bagazo de agave

En la Figura 5.1 se muestra la composición del bagazo de agave. Como se puede observar, la materia prima utilizada durante este proyecto contiene una cantidad importante de celulosa, misma que teóricamente puede convertirse en etanol.

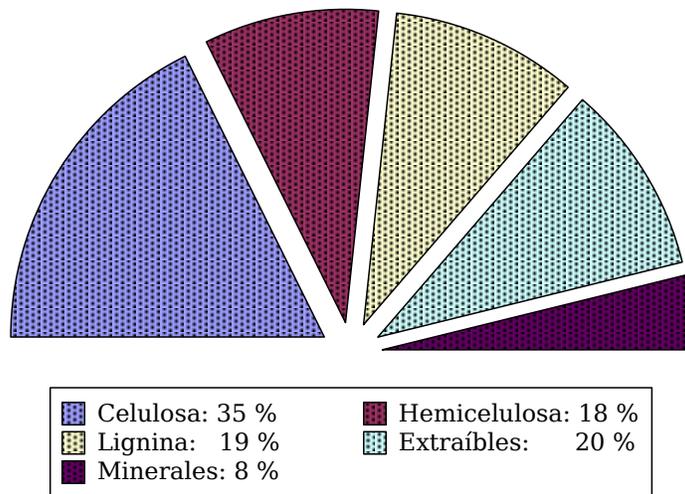


Figura 5.1: Composición del bagazo de agave

Sin embargo, el bagazo de agave contiene también una proporción considerable de lignina, parte de la cual deberá ser removida para que sea posible alcanzar rendimientos elevados durante la sacarificación.

## 5.2. Determinaciones de concentración de proteína

Se analizaron nueve diferentes cocteles enzimáticos comerciales para determinar su concentración, así como su actividad enzimática para tres reacciones importantes durante la hidrólisis del material lignocelulósico. Los cocteles analizados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Cocteles enzimáticos analizados

Coctel Enzimático	Nombre Comercial
1	Accelerase 1500
2	Accelerase XC
3	Advanced Enzyme
4	Cellic CTec2
5	Cellic HTec2
6	Celluclast
7	Celluzyme BL
8	Celluzyme XB
9	Viscozyme

En la Figura 5.2 se muestra la concentración de proteína que presentan los nueve diferentes cocteles enzimáticos analizados durante el presente proyecto.

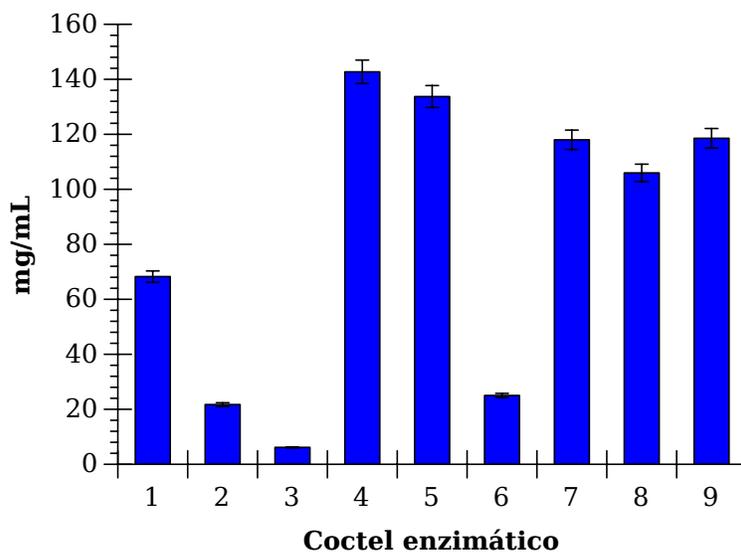


Figura 5.2: Concentración de proteína

## 5.3. Determinaciones de actividad enzimática

### 5.3.1. Actividad de celulasa

En la Figura 5.3 se muestran las actividades de celulasa volumétricas y específicas de los nueve diferentes cocteles enzimáticos analizados durante el presente proyecto.

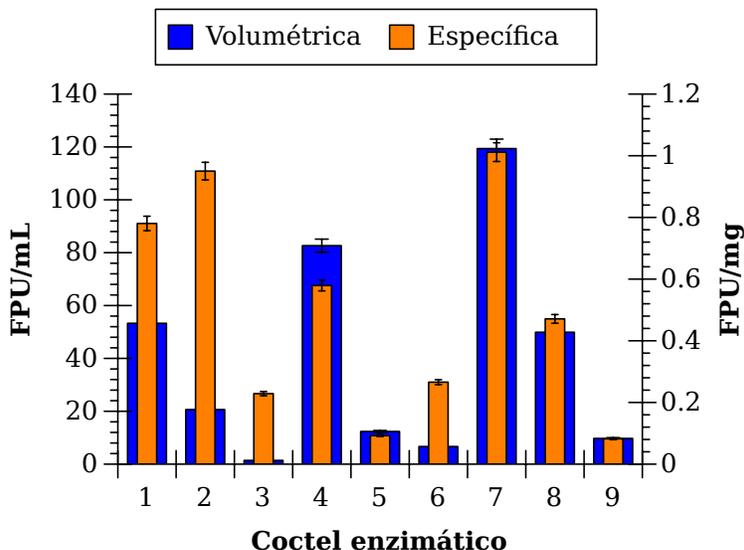


Figura 5.3: Análisis de papel filtro

Como se puede observar en la Figura 5.3, el coctel con mayor actividad, tanto volumétrica como específica, es el número 7, correspondiente al denominado “Celluzyme BL”.

Adicionalmente, “Celluzyme BL” es un coctel enzimático de producción nacional, lo que ofrece diferentes ventajas, principalmente económicas.

Además de la actividad en la sacarificación de celulosa, se midieron particularmente dos actividades enzimáticas importantes:

**Endoglucanasa:** Importante durante la hidrólisis de la celulosa, ya que se encarga de cortar las cadenas en puntos intermedios, dejando un mayor número de extremos libres para las exoglucanasas.

**Xilanasa:** Importante durante la hidrólisis de la hemicelulosa, ya que se encarga de degradar los polisacáridos que la conforman, produciendo xilosa y otros azúcares.

### 5.3.2. Actividad de endoglucanasa

En la Figura 5.4 se muestran los resultados del análisis de actividad como endoglucanasa de los nueve cocteles enzimáticos analizados.

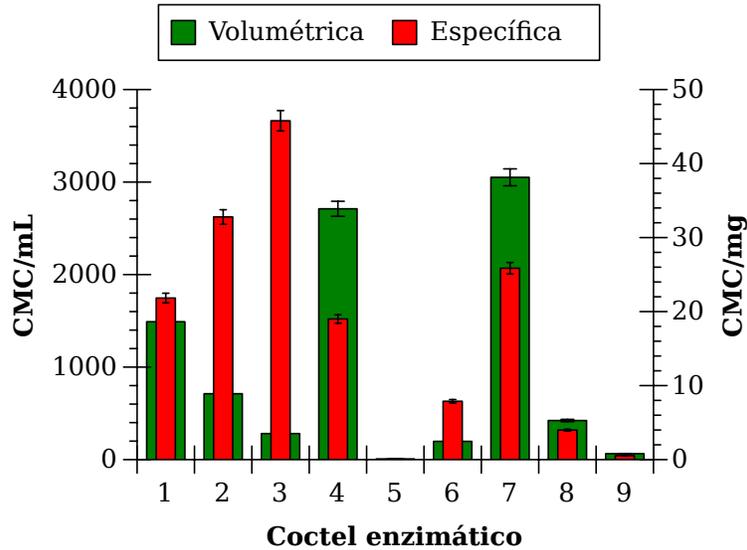


Figura 5.4: Análisis de carboximetilcelulasa

Se puede observar en la Figura 5.4 que el coctel número 3 (Advanced Enzyme) contiene la enzima más activa. Sin embargo, dada su baja concentración, el coctel número 7 (Celluzyme BL) presenta la mayor actividad.

### 5.3.3. Actividad de xilanasa

En la Figura 5.5 se muestran los resultados del análisis de actividad como xilanasa de los nueve cocteles enzimáticos analizados. Se observa que el coctel con mayor actividad de xilanasa es “Cellic HTec2”, y la enzima más activa es la que contiene el coctel “Accelerase XC”.

## 5.4. Pruebas de estabilidad enzimática

Como ya se ha mencionado anteriormente, la celulasa elegida para este proyecto fue el coctel enzimático “Celluzyme BL”. Se trata de una enzima comercial producida en México y su costo es relativamente bajo. Sin embargo, no se han reportado ampliamente algunas de sus características de operación.

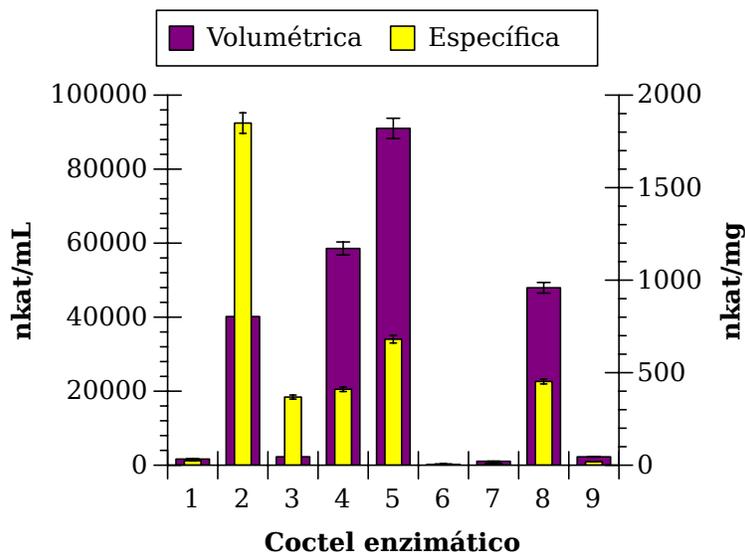


Figura 5.5: Análisis de xilanasa

Una característica particularmente importante es la estabilidad térmica de las celulasas que contiene el coctel. Se sabe que las celulasas comerciales tienen un rango óptimo de temperaturas de entre 30 y 60 °C, por lo que en este proyecto fue el rango que se estudió para esta enzima en particular, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 5.6. Como se puede observar, se presenta una estabilidad máxima a 30 °C.

Por otro lado, como regla general, se sabe que un incremento de aproximadamente 10 °C duplica la velocidad de una reacción enzimática, y se observa que este incremento no ocasiona una pérdida sustancial de actividad enzimática. Por esta razón, se decidió que la temperatura de sacarificación para el coctel “Celluzyme BL” sería de 40 °C.

## 5.5. Análisis del bagazo de agave

### 5.5.1. Isotermas de desorción de humedad

Para la construcción de las isotermas de desorción de humedad se llevaron a cabo dos diferentes series de experimentos.

La primera serie fue para bagazo de agave pretratado a diferente número de ciclos, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.7. La segunda fue para bagazo de agave pretratado a diferentes temperaturas, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.8.

Como se muestra en ambos casos (figuras 5.7 y 5.8), más allá del 30% de agua ya no

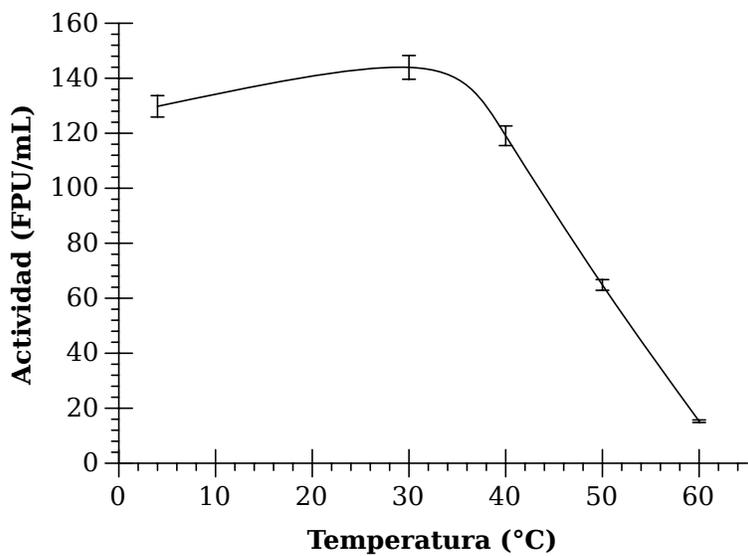


Figura 5.6: Estabilidad enzimática del coctel “Celluzyme BL”

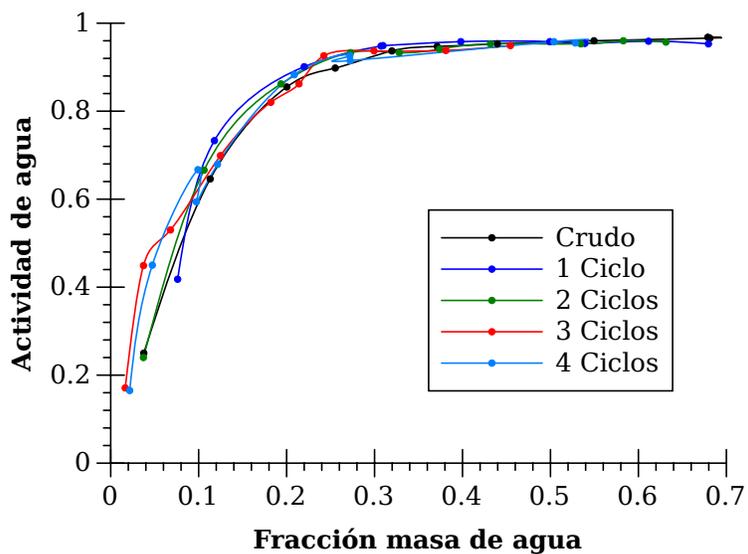


Figura 5.7: Isothermas de humedad para bagazo pretratado a diferentes ciclos

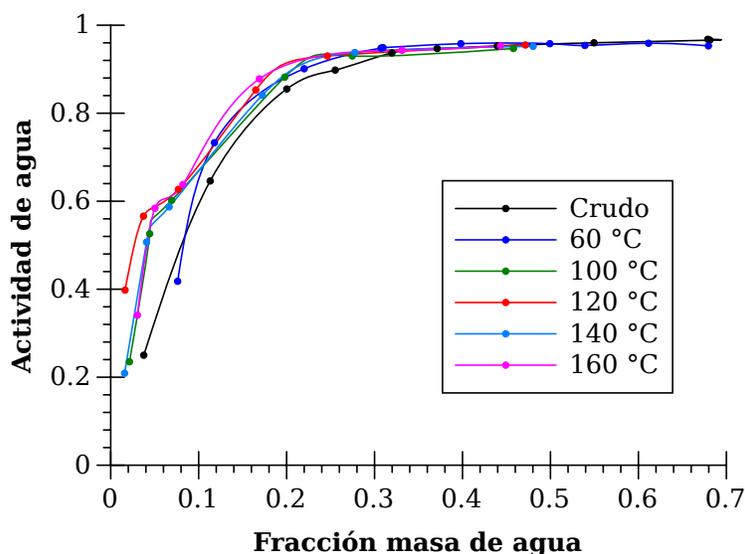


Figura 5.8: Isotermas de humedad para bagazo pretratado a diferentes temperaturas

se observa diferencia en la actividad acuosa de las muestras; alcanzando prácticamente la unidad, hayan sido pretratadas o no.

Por otro lado, debajo de este valor (30%) sí existen diferencias notables dependiendo del pretratamiento empleado. Esto sugiere cambios morfológicos importantes en los microporos y mesoporos del material.

### 5.5.2. Adecuación de las condiciones de operación

A excepción de la variable de estudio, o en caso de que se exprese explícitamente lo contrario, todos los pretratamientos fueron realizados durante media hora a las siguientes condiciones de operación:

<b>Ciclos:</b> 1	<b>Presión:</b> 12 MPa	<b>Líquido iónico:</b> No
<b>Malla:</b> 50	<b>agua/bagazo:</b> 1	<b>Temperatura:</b> 120 °C

A menos que se indique lo contrario, todas las muestras fueron sacarificadas a 50 °C durante 72 horas.

#### Dependencia con el número de ciclos de pretratamiento

Como se puede observar en las fotografías al microscopio (Figura 5.9), el daño a las fibras lignocelulósicas aumenta a medida que se incrementa el número de ciclos de

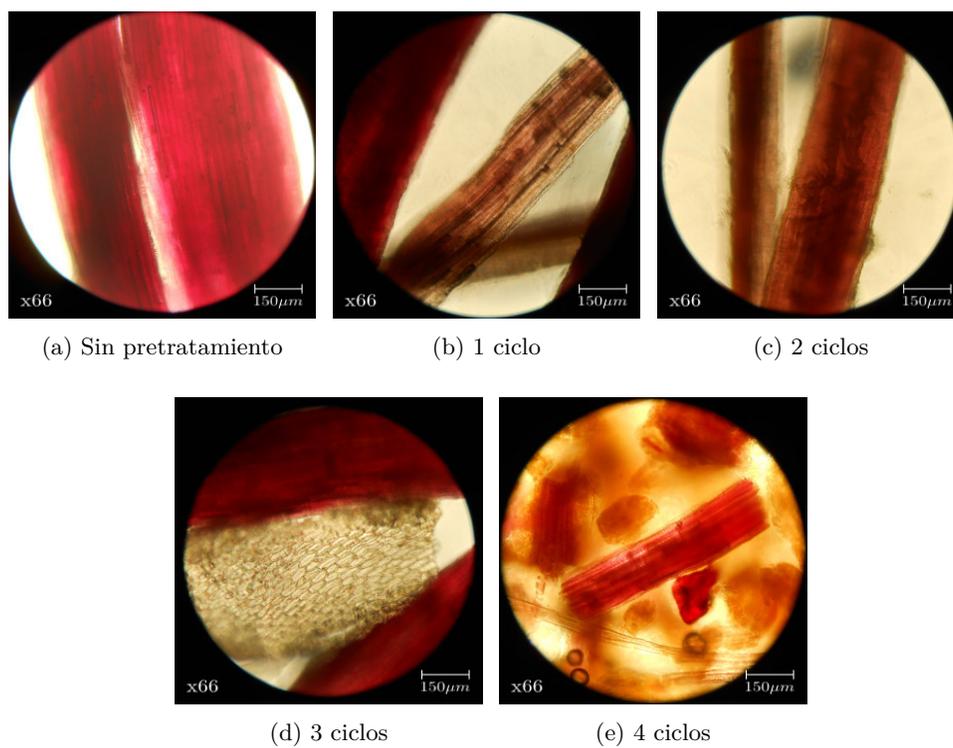


Figura 5.9: Efecto del número de ciclos de pretratamiento sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

pretratamiento. Sin embargo, cabe destacar que el mayor cambio ocurre durante el primer ciclo de operación.

De la misma manera, en la valoración de azúcares reductores (Figura 5.10) se muestra también que el mayor efecto del pretratamiento sobre el bagazo de agave ocurre durante el primer ciclo. El incremento en la sacarificación después de los ciclos subsecuentes no es del todo significativo y no compensa el costo de los mismos.

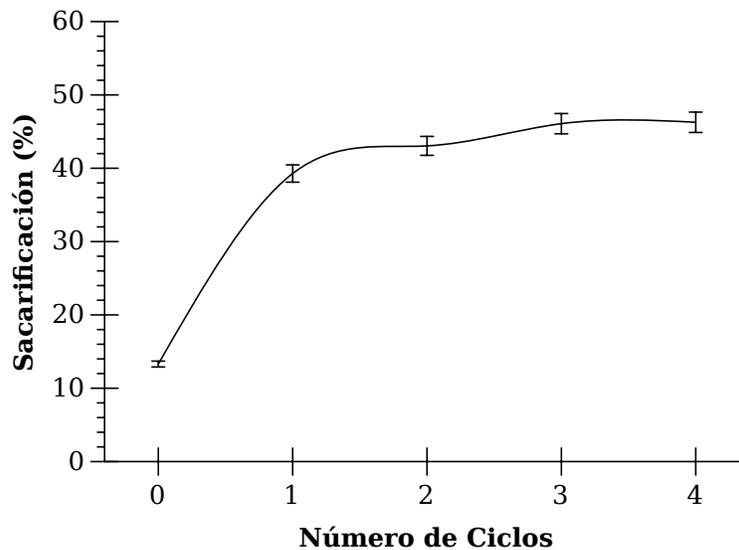


Figura 5.10: Dependencia de la sacarificación con el número de ciclos de pretratamiento

De las figuras 5.9 y 5.10, se puede concluir que es suficiente un único ciclo de pretratamiento a las condiciones de operación adecuadas, mismas que serán explicadas con mayor detalle posteriormente.

### **Dependencia con el tamaño de partícula**

Para determinar el efecto de esta variable, el bagazo de agave fue molido utilizando un molino de café, y tamizado a diferentes números de malla.

En la Figura 5.11 se muestra claramente la diferencia en el tamaño de partícula entre cada una de las muestras. Asimismo, se puede observar la importancia de esta variable en la deslignificación de la fibra, que se muestra como una reducción de la coloración roja.

De la misma manera, en la Figura 5.12 se muestra que el tamaño de partícula también tiene un efecto notable en el deterioro de las fibras de bagazo. Esto se ve reflejado en el rendimiento de la sacarificación del material pretratado.

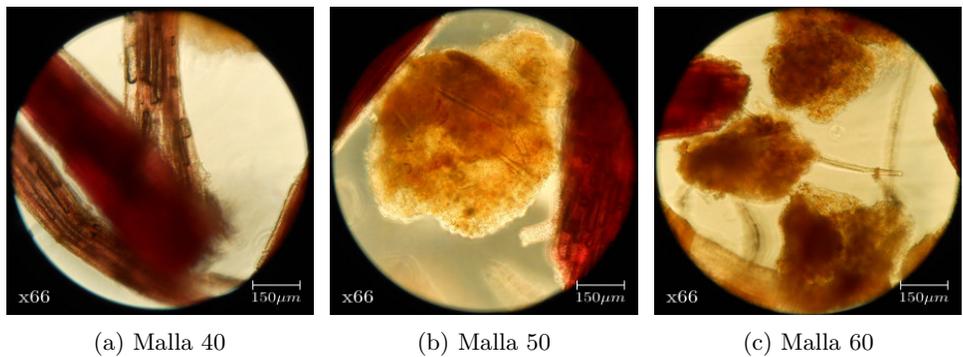


Figura 5.11: Efecto del tamaño de partícula sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

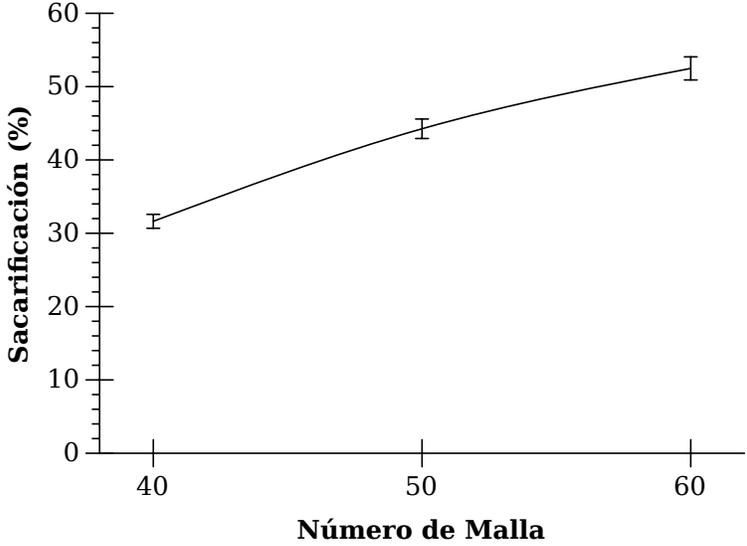


Figura 5.12: Dependencia de la sacarificación con el tamaño de partícula

Por dichas razones, se determinó que el pretratamiento se deberá realizar utilizando la materia prima a un tamaño de partícula tan pequeño como sea posible.

### Dependencia con la presión de pretratamiento

En las fotografías al microscopio (Figura 5.13) se puede observar claramente que la presión de pretratamiento ejerce un efecto importante en la estructura de la fibra, pero no así en el nivel de deslignificación. De manera similar, en la Figura 5.14 se muestra que a medida que se incrementa la presión de pretratamiento, se incrementa también el nivel de sacarificación del bagazo pretratado.

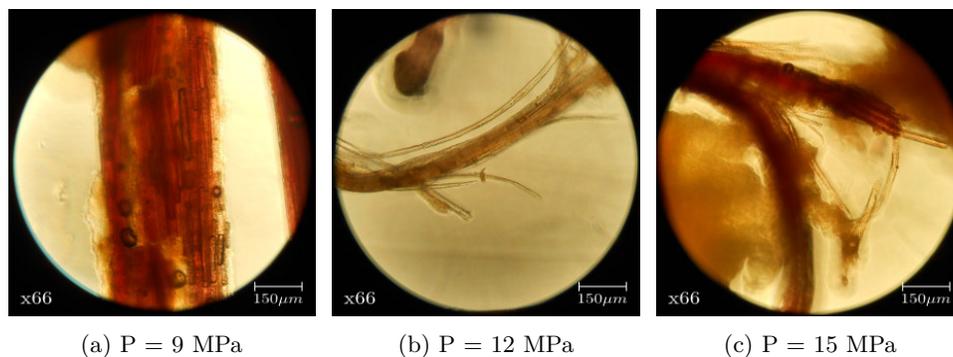


Figura 5.13: Efecto de la presión de pretratamiento sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

Conociendo lo anterior, se determinó que el pretratamiento se debe llevar a cabo a la presión máxima de operación para el equipo en el que se realizará la explosión.

### Dependencia con la humedad

En la Figura 5.15 se muestran las fotografías al microscopio de bagazo de agave pretratado a diferentes concentraciones de agua. Como se puede observar, la humedad del bagazo tiene un fuerte efecto en la deslignificación de las fibras, y un efecto menor en la estructura del material.

En la Figura 5.16 se muestran los resultados de la sacarificación de bagazo de agave pretratado a diferentes condiciones de humedad. Como se puede observar, a mayor concentración de agua, se eleva también el nivel de sacarificación.

Dada la deslignificación observada en las fotografías al microscopio (Figura 5.15), existe un incremento de sacarificación al aumentar la humedad del bagazo. Sin embargo, en la Figura 5.16 se muestra que este efecto disminuye para relaciones agua/bagazo mayores a la unidad.

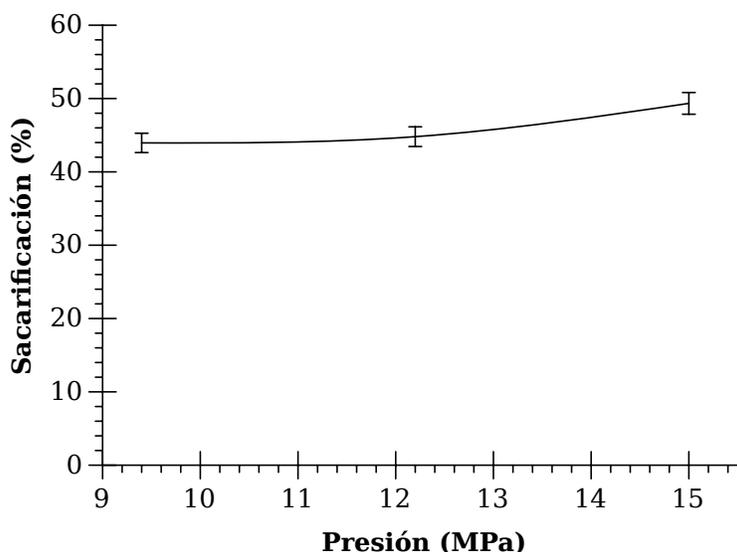


Figura 5.14: Dependencia de la sacarificación con la presión de pretratamiento

Debido a esta disminución y a las consecuencias ambientales que conlleva el elevado consumo de agua, se decidió que el contenido de humedad apropiado para el pretratamiento fuera de un gramo de agua por cada gramo de bagazo.

#### Dependencia con la cantidad de líquido iónico

Se utilizó el líquido iónico [bmim]Cl como cosolvente para facilitar la extracción de la lignina presente en el bagazo de agave. En la Figura 5.17 se muestran las fotografías al microscopio de bagazo de agave pretratado a diferentes concentraciones de este líquido iónico.

Como se puede observar (Figura 5.17), este líquido iónico cumple su propósito, removiendo la lignina (visible en color rojo) casi por completo desde que se añade un gramo de LI por cada cuatro de bagazo.

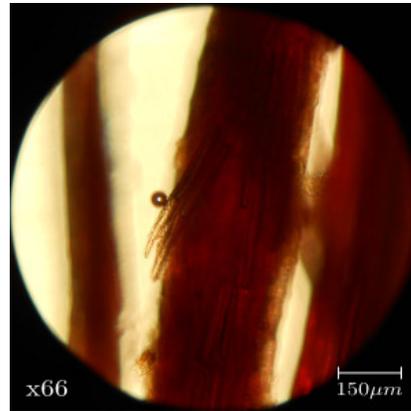
En la gráfica de la Figura 5.18 se muestran los resultados de la sacarificación de bagazo de agave pretratado a diferentes concentraciones de [bmim]Cl.

Como se puede observar en la Figura 5.18, se presenta un punto máximo de sacarificación a una relación LI/bagazo de 0.25. Esto coincide con el valor observado en las fotografías al microscopio (Figura 5.17).

Sin embargo, esta proporción corresponde a una concentración muy elevada de [bmim]Cl, la cual no es compensada por el incremento en la sacarificación que se obtiene al utilizar este líquido iónico.



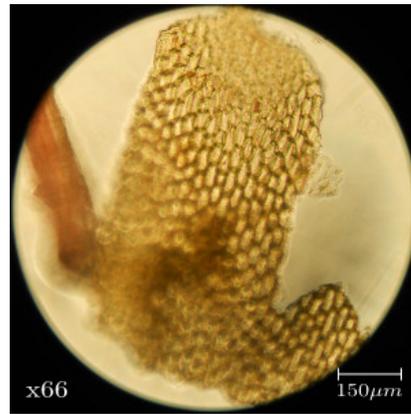
(a) Bagazo seco



(b) 0.5 g agua / g bagazo



(c) 1 g agua / g bagazo



(d) 2 g agua / g bagazo

Figura 5.15: Efecto de la humedad de pretratamiento sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

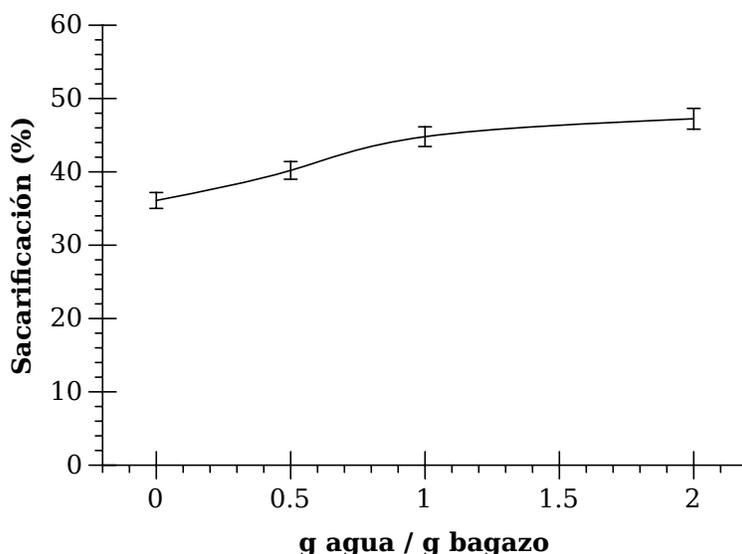


Figura 5.16: Dependencia de la sacarificación con la humedad del pretratamiento

Debido a lo anterior, y considerando el costo del LI, así como el de su recuperación después del pretratamiento, se determinó que no es del todo recomendable utilizarlo como cosolvente para los fines del presente proyecto.

### Dependencia con el tiempo de residencia

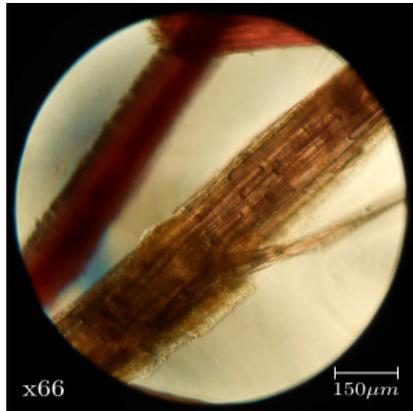
El tiempo de residencia se mide a partir de que se alcanza la temperatura deseada en el reactor presurizado.

La Figura 5.19 muestra las fotografías al microscopio de bagazo de agave pretratado a diferentes tiempos de residencia. Como se puede observar, el principal efecto del tiempo de residencia es sobre el nivel de deslignificación, visible en color rojo.

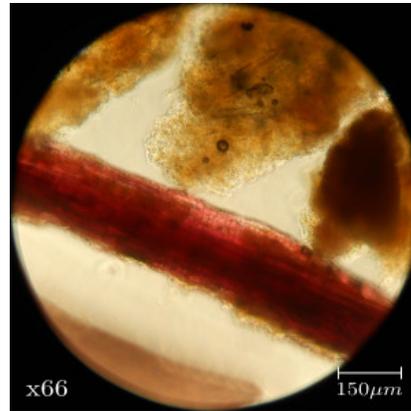
Lo anterior ocurre debido a que es necesaria la difusión de la lignina desde la fase sólida (fibra de bagazo) hacia la fase supercrítica ( $\text{CO}_2$ ); ocasionando que la velocidad de extracción de la lignina sea relativamente baja. Por esta razón, se requieren tiempos de residencia prolongados para lograr niveles de deslignificación elevados.

En este caso se realizaron dos series de experimentos, uno sin líquido iónico y uno con una relación másica LI/bagazo de 0.25. Esto se decidió debido a que la cinética de extracción depende del cosolvente utilizado, cambiando el efecto del tiempo de residencia.

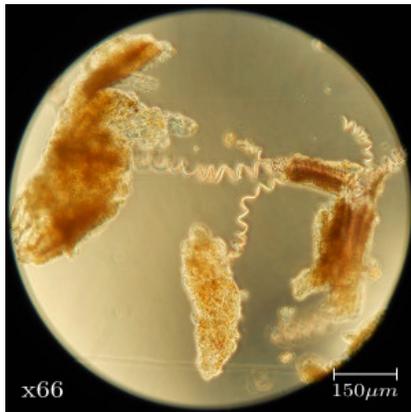
Como se puede observar en la Figura 5.20, para el pretratamiento sin LI, lo mejor es abrir la válvula inmediatamente al alcanzar la temperatura deseada. Por otro lado, para el pretratamiento con LI, el tiempo de residencia para el que se obtuvo un mayor



(a) Sin líquido iónico



(b) 0.1 g LI / g bagazo



(c) 0.25 g LI / g bagazo



(d) 0.5 g LI / g bagazo

Figura 5.17: Efecto de la cantidad de líquido iónico sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

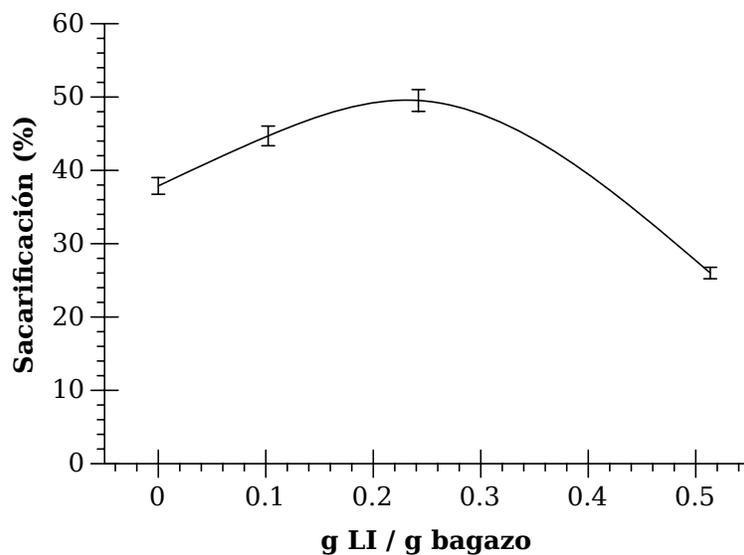


Figura 5.18: Dependencia de la sacarificación con la cantidad de LI

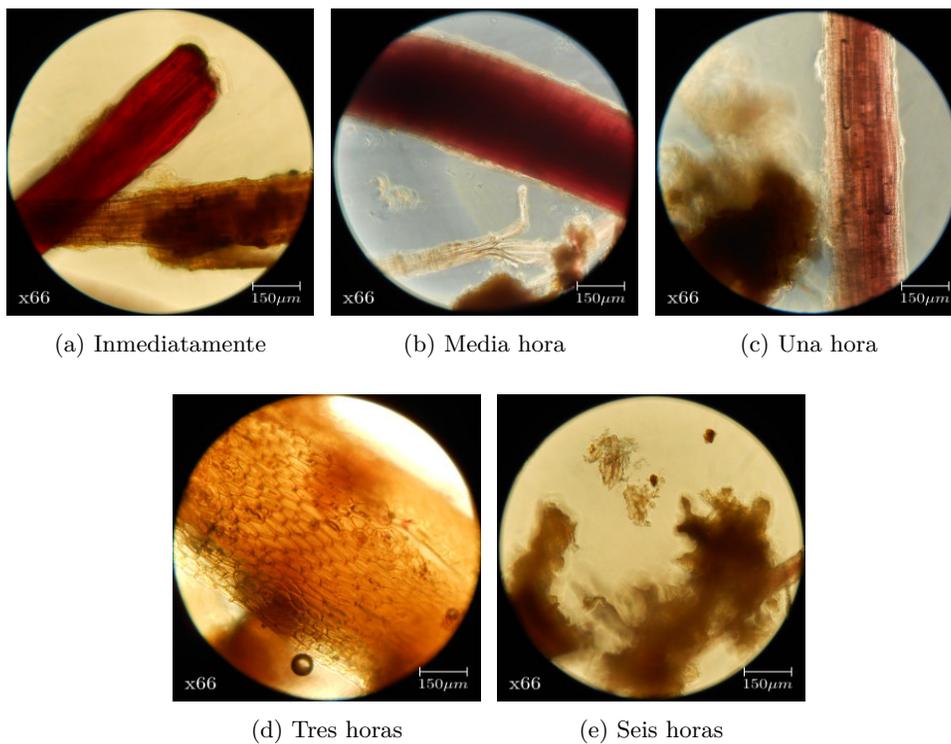


Figura 5.19: Efecto del tiempo de residencia sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

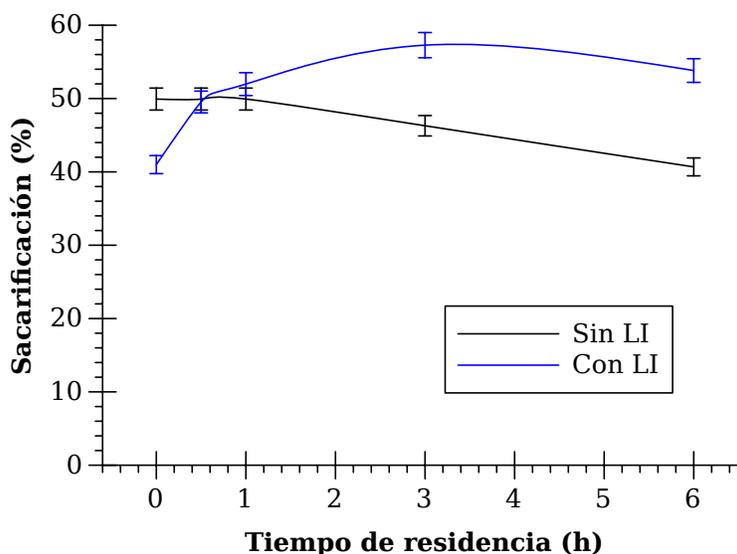


Figura 5.20: Dependencia de la sacarificación con el tiempo de residencia

rendimiento fue de 3 horas.

Lo anterior reitera la decisión de realizar el pretratamiento sin [bmim]Cl, ya que al utilizarlo se requerirían tres horas más de proceso, correspondientes al tiempo de residencia para el pretratamiento con LI.

#### Dependencia con la temperatura de pretratamiento

En la Figura 5.21 se muestran las fotografías tomadas al microscopio de bagazo de agave pretratado a diferentes temperaturas. Como se puede observar, al incrementar la temperatura de pretratamiento hasta 160 °C aumenta el daño ocasionado a las fibras lignocelulósicas del bagazo de agave.

Por otro lado, por encima de 160 °C, se pueden observar las fibras de un color más oscuro. Esto ocurre debido a que las elevadas temperaturas queman el tejido, degradando los componentes del material, como los azúcares reductores, haciendo imposible recuperarlos para su fermentación posterior. Por esta razón, se debe procurar que el pretratamiento se lleve a cabo a una temperatura elevada, pero garantizando que no alcance la temperatura de degradación de los azúcares reductores.

Para el caso de la sacarificación a diferentes temperaturas de pretratamiento se llevaron a cabo cuatro series de experimentos:

**Seco:** Se secó el bagazo de agave en una estufa a 120 °C antes de cargarlo al reactor

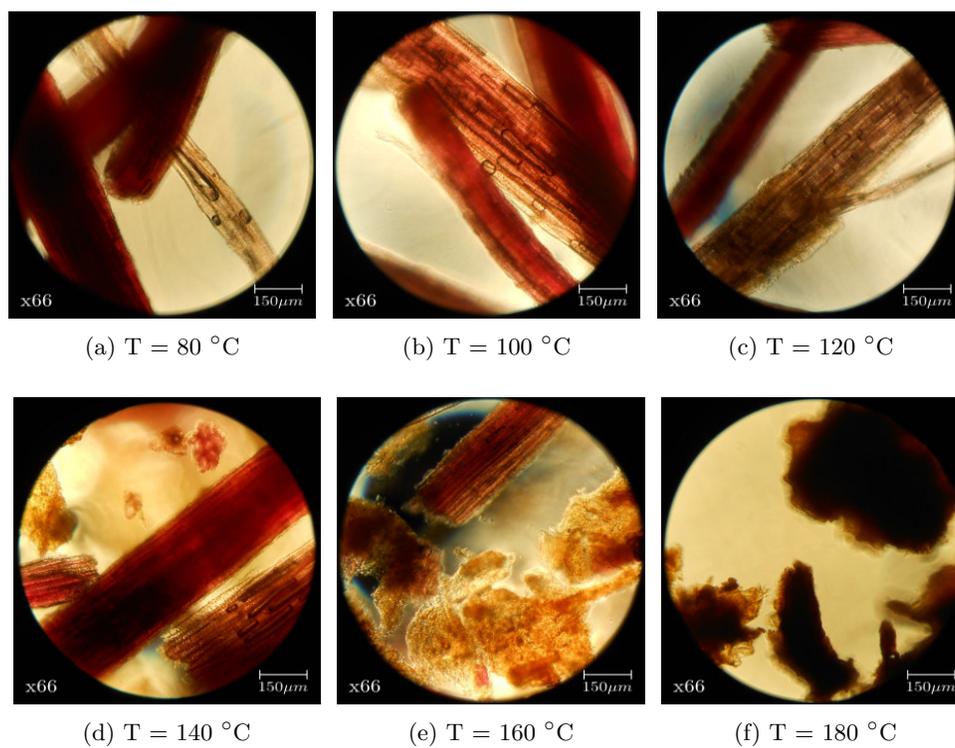


Figura 5.21: Efecto de la temperatura de pretratamiento sobre la estructura y deslignificación del bagazo pretratado

**Húmedo:** Se utilizó una relación agua/bagazo de 1

**Empapado:** El bagazo de agave fue suergido en agua antes de cargarlo al reactor

**Con LI:** Se utilizó una relación LI/bagazo de 0.25

Esto se decidió porque la temperatura es un factor de suma importancia para el pretratamiento, pero puede afectar el rendimiento de diferentes maneras, dependiendo de las otras condiciones de operación. La Figura 5.22 muestra los resultados obtenidos.

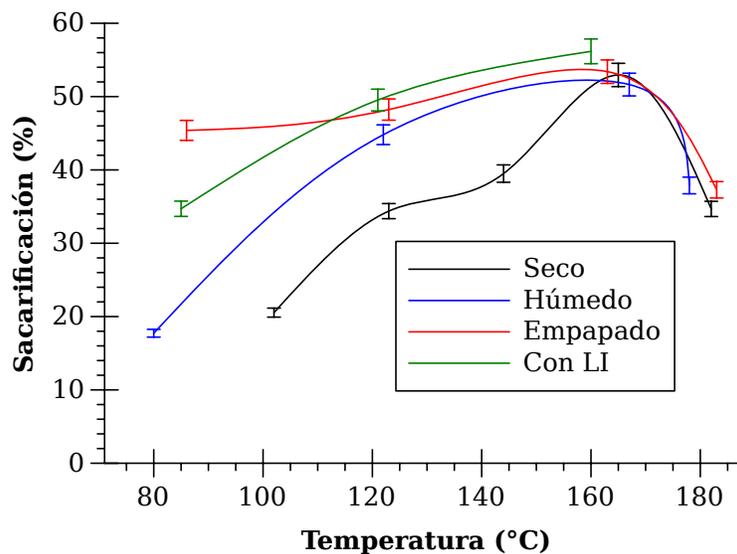


Figura 5.22: Dependencia de la sacarificación con la temperatura de pretratamiento

En la Figura 5.22 se puede observar que en todos los casos se presenta un rendimiento óptimo de sacarificación a 160 °C. Esto ocurre debido a que, como se muestra en las fotografías al microscopio, por encima de esta temperatura las fibras se degradan térmicamente.

#### Pretratamiento y sacarificación simultáneos

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una concentración de enzima de 10 FPU por cada gramo de celulosa, disuelta en el mismo buffer de citrato 0.05 M pH 4.8 empleado a lo largo de este proyecto, bajo las siguientes condiciones de operación:

**Ciclos de pretratamiento:** 1

**Presión en el reactor:** 12 MPa

**Número de malla:** 60

**Relación buffer/bagazo:** 1

**Líquido iónico:** No

**Tiempo de residencia:** 24 horas

En la Figura 5.23 se muestran los resultados obtenidos de la operación mediante el pretratamiento y la sacarificación simultáneos. Como se puede observar, la temperatura de explosión a la que se obtiene el mayor rendimiento es de 40 °C. Esta temperatura corresponde a la elegida para la sacarificación, considerando la estabilidad del coctel enzimático.

### **Combinación de pretratamiento y acción enzimática óptimos**

Habiendo determinado las mejores condiciones para cada tipo de operación, se llevó a cabo una serie de experimentos con fines comparativos bajo dichas condiciones.

Por otro lado, se pudo observar una sacarificación máxima de alrededor de 60 %. Con la finalidad de determinar si este es un límite superable mediante un tratamiento más exhaustivo, se realizaron experimentos en los que se llevó a cabo un pretratamiento seguido de una explosión con enzima, ambos a las mejores condiciones encontradas.

En todos los experimentos, a excepción que se indique lo contrario, las condiciones de operación generales fueron las siguientes:

**Ciclos:** 1

**Malla:** 50

**Presión:** 12 MPa

**agua(o buffer)/bagazo:** 1

**Líquido iónico:** No

**Temperatura:** Óptima (160 ó 40 °C, dependiendo si se trata de pretratamiento o explosión con enzima)

**Tiempo de residencia:** Óptimo (expansión inmediata ó 24 h, según el caso)

**Sacarificación:** A 40 °C por 72 horas

Se llevaron a cabo experimentos a tres condiciones particulares diferentes para cada tipo de operación:

#### **Pretratamiento:**

- (a) Exactamente como se indica en las condiciones generales.
- (b) La sacarificación se llevó a cabo durante únicamente 24 horas.
- (c) Se utilizó una relación LI/bagazo de 0.25, a un tiempo de residencia de 3 h.

#### **Explosión con enzima:**

- (a) Exactamente como se indica en las condiciones generales.
- (b) Se utilizó una relación LI/bagazo de 0.25.

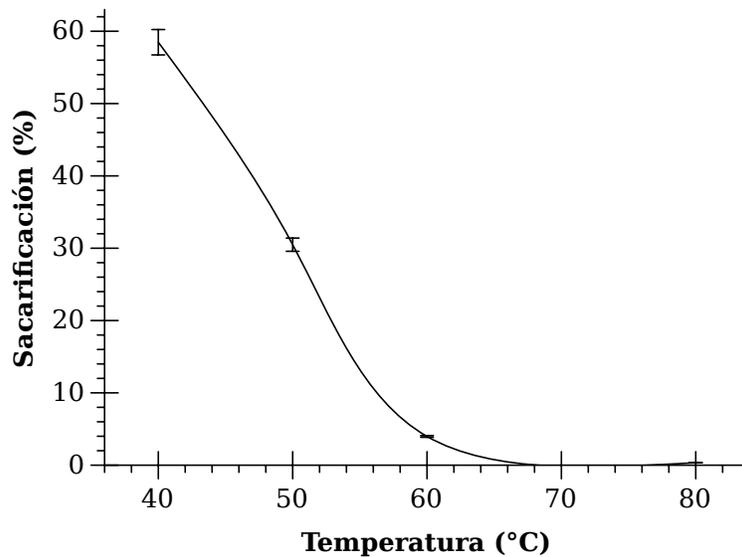


Figura 5.23: Explosiones con enzima

(c) Se incrementó el tiempo de residencia a 72 horas.

**Pretratamiento - explosión con enzima:**

- (a) Exactamente como se indica en las condiciones generales.
- (b) Se utilizó una relación buffer/bagazo de 5 para la explosión con enzima.
- (c) Se utilizó una relación buffer/bagazo de 10 para la explosión con enzima.

En la Figura 5.24 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, el rendimiento máximo de sacarificación alcanzado ( $\sim 60\%$ ) no se logra superar mediante pretratamientos sucesivos. Sin embargo, se observa que una explosión a las condiciones de operación adecuadas es suficiente para obtenerlo.

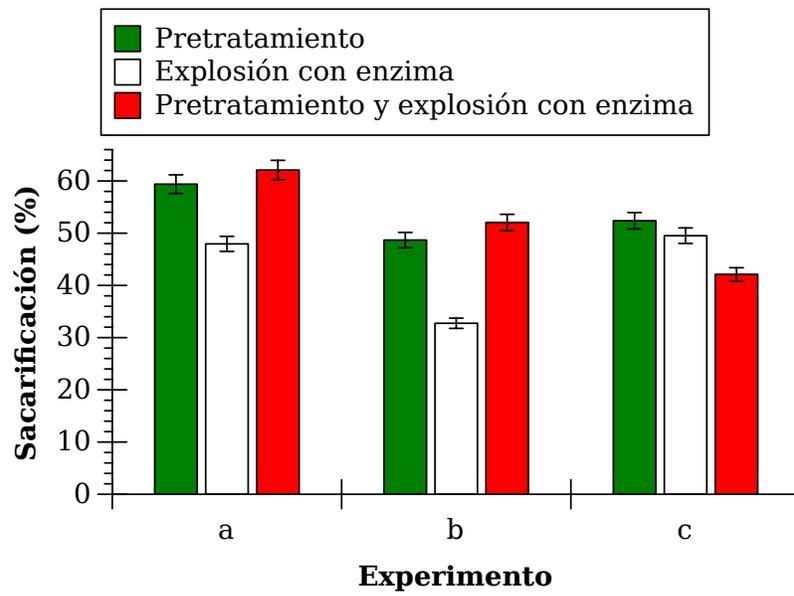


Figura 5.24: Operaciones en condiciones óptimas

# Capítulo 6

## Discusión

### 6.1. Bagazo de agave

Además de las ventajas que presentan las plantas CAM mencionadas en la sección 2.7.4, a partir del agave se pueden obtener diferentes productos alimenticios, como son: miel, mermelada, aguamiel, pulque y tequila. Pero tiene otra posibilidad de aprovechamiento; que es mediante la obtención de celulosa y subproductos (lignina y azúcares) a partir de las pencas que sobran después de haber extraído el aguamiel, lo cual representa una alternativa para proporcionar un uso integral de la planta (Gumeta Chávez et al., 2007).

Teniendo en cuenta el porcentaje de residuos producidos durante la elaboración del tequila, así como la extensión de superficie dedicada al cultivo de *Agave tequilana*, se ha considerado de interés el estudio del aprovechamiento de un residuo importante generado por la industria tequilera: el bagazo de agave.

Debido a las numerosas ventajas ya mencionadas, en el presente proyecto se propone utilizar este residuo como materia prima lignocelulósica para la obtención de bioetanol de segunda generación.

### 6.2. Dióxido de carbono supercrítico

El dióxido de carbono usualmente se comporta como un gas en el aire a condiciones estándar, o como un sólido llamado “hielo seco” cuando se congela. Pero si la temperatura y presión se incrementan por encima de su punto crítico, adopta propiedades de entre líquido y gas.

Recientemente ha recibido una gran atención debido a diversas razones:

- Tiene un bajo costo
- Es muy abundante
- No es inflamable
- Posee baja toxicidad
- No contamina
- Es producido a partir de corrientes residuales de proceso
- Permite la operación a temperaturas cercanas a la ambiental
- Permite la operación a presiones no muy elevadas

El dióxido de carbono se convierte en un fluido supercrítico por encima de 304.1 K y 72.8 atm, expandiéndose como un gas, pero con una densidad similar a la de un líquido. En la Figura 6.1 se muestra el punto crítico del dióxido de carbono en un diagrama de fases.

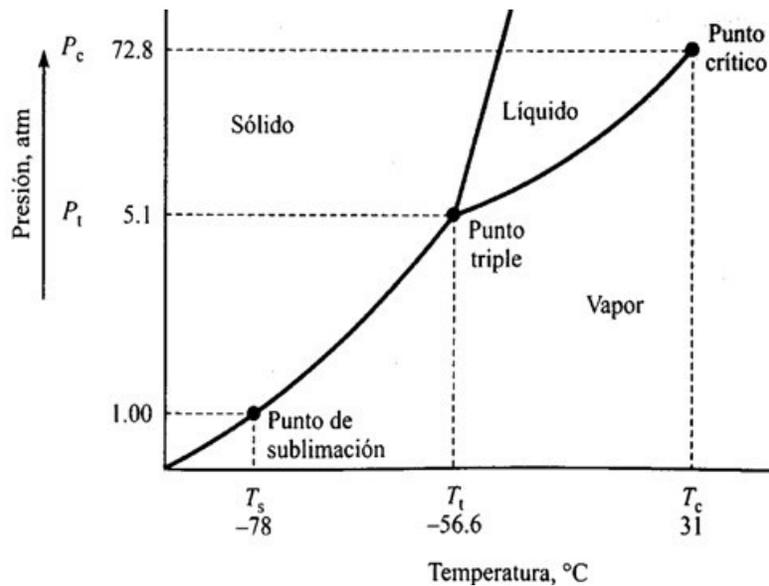


Figura 6.1: Diagrama de fases del dióxido de carbono. Fuente: <http://rodas.us.es>

Por encima de su punto crítico, el dióxido de carbono posee la difusividad y viscosidad de un gas, pero la densidad de un líquido, y se comporta como un disolvente no polar. Puede disolver compuestos hidrofóbicos como aceites, grasas e hidrocarburos, pero no así los hidrofílicos, como sales, azúcares y proteínas. Por esta razón, se emplean diferentes cosolventes, generalmente alcoholes de cadena corta, ésteres o acetonas, para incrementar su capacidad de disolver compuestos polares.

### 6.2.1. Usos

En muchas aplicaciones, se usa el dióxido de carbono, ya sea puro o acompañado de un cosolvente. En extracciones químicas, el dióxido de carbono supercrítico se ha convertido en un importante solvente comercial e industrial, debido a su baja toxicidad e impacto ambiental. La temperatura requerida, relativamente baja, y la estabilidad de la molécula permiten extraer la mayoría de los compuestos con daños mínimos. Adicionalmente, la solubilidad de muchos compuestos extraídos con CO<sub>2</sub> varía con la presión, permitiendo extracciones selectivas. Actualmente algunos de sus principales usos son:

**Disolvente:** Lavado en seco, remoción de cafeína, extracción de aceites esenciales y otros destilados herbales, determinación de hidrocarburos en suelos y aguas residuales

**Antisolvente:** Producción de micro- y nano- partículas

**Agente químico:** En sustitutos para cerámicos y termoplásticos o como agente espumante en polímeros

**Fluido de operación:** Turbinas de gas de ciclo cerrado, refrigeración, recuperación de petróleo, producción de energía eléctrica, sistemas geotérmicos mejorados

**Medicina:** Esterilización de materiales biomédicos

### 6.2.2. Pretratamiento de material lignocelulósico

La aplicación de fluidos supercríticos en el tratamiento de material lignocelulósico existe desde finales de los años setenta. Se reporta se requieren altas presiones para la reacción del solvente con la lignina.

Como primera ventaja, en este procedimiento se obtienen los productos extraídos en fase sólida, por lo que se pueden eliminar costosos pasos de purificación para la recuperación de compuestos inorgánicos.

Recientemente, el dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>), que había sido empleado principalmente como disolvente para extracciones, dadas sus numerosas ventajas, se ha utilizado en aplicaciones no extractivas (Kim y Hong, 2000). Tal es el caso del pretratamiento de materiales lignocelulósicos.

Existen reportes de experimentos en los que se emplea el CO<sub>2</sub> como disolvente principal para el pretratamiento de madera. En la Tabla 6.1 se muestra una comparación de los resultados reportados bajo diferentes condiciones de operación.

Se han realizado estudios sobre el pretratamiento de paja de trigo, empleando mezclas de dióxido de carbono supercrítico con vapor de agua, donde se reporta que la existencia de moléculas de agua, tanto en fase líquida como en fase vapor, causa importantes mejoras en los rendimientos obtenidos (Alinia et al., 2010).

Tabla 6.1: Pretratamiento de madera a diferentes condiciones

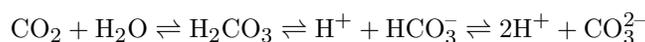
t (h)	T (°C)	P (bar)	Cosolvente	Masa Perdida (%)	Deslignificación (%)
-	40	81	No	3.9	-
3	180	250	Acético 73 %	53	93
2	167	325	Etanol	4.8	-
-	190	290	Agua	35.9	-
-	190	290	Etanol 9 %	41.4	-
2	185	275	Metilamina	28	75
1	200	272	Amoníaco 80 %	-	70
5	180	170	Dioxano	11	49

Fuente: Pasquini et al. (2005)

En todos los casos se obtiene un mejor desempeño a mayor temperatura; pero existen análisis termogravimétricos y de espectroscopía infrarroja que muestran que los polisacáridos presentes en la madera empiezan a degradarse a partir de los 200 °C, y se vuelven muy significativos a partir de los 250 °C. Considerar este límite es de suma importancia, ya que la fracción de celulosa debe ser preservada para que pueda obtenerse la mayor cantidad posible de azúcares fermentables. Asimismo, se sabe que la temperatura y la alcalinidad tienen un efecto favorable sobre la velocidad de deslignificación.

Se reportó también que, cuando la lignocelulosa se procesa térmicamente con altos contenidos de agua pero sin CO<sub>2</sub>, el rendimiento de azúcar es considerablemente menor que el obtenido en el pretratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.

Lo anterior sugiere que el efecto de las interacciones entre el SC-CO<sub>2</sub> y el agua es más pronunciado que el efecto del agua a temperatura elevada por sí misma. Esto se atribuye a la formación de ácido carbónico durante el proceso, lo que ocasiona la decristalización de la celulosa:



Conociendo esto, se pueden evitar las desventajas de otros tipos de pretratamiento, incluyendo los ácidos minerales, mediante la sustitución de los compuestos ácidos con CO<sub>2</sub>. Mientras se mantienen las ventajas de un proceso catalizado por un ácido, se reduce la corrosión significativamente. Asimismo, el CO<sub>2</sub> es un componente “verde” de proceso, puede ser removido fácilmente mediante despresurización y no genera productos residuales. Además, si se logra un pretratamiento de lignocelulosa con CO<sub>2</sub> a bajas temperaturas, se puede reducir la degradación de xilosa, aumentando el rendimiento.

Basados en todo lo anterior, se puede decir que el proceso de pretratamiento con dióxido de carbono supercrítico tiene grandes ventajas, como son su nula toxicidad y

el bajo costo del disolvente ( $\text{CO}_2$ ), elevadas concentraciones de sólidos en el material pretratado y la temperatura de pretratamiento relativamente baja. Sin embargo, la baja efectividad para maderas suaves y el alto costo para el equipo de alta presión pueden obstaculizar la comercialización del pretratamiento lignocelulósico mediante  $\text{SC-CO}_2$ .

### Explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC- $\text{CO}_2$ -E)

Debido a las ventajas mencionadas anteriormente, en este proyecto, se propone como método fisicoquímico de pretratamiento la  $\text{SC-CO}_2$ -E de material lignocelulósico (Figura 6.2).

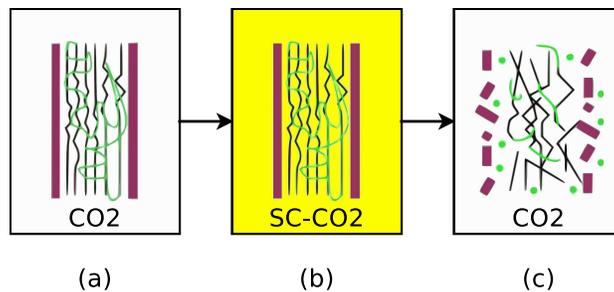


Figura 6.2: Explosión de  $\text{CO}_2$  supercrítico. (a) Se introduce la fibra vegetal en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ . (b) Se lleva el  $\text{CO}_2$  a condiciones supercríticas, haciendo que impregne en la fibra vegetal. (c) Explosión súbita, causante de daños físicos a la fibra.

Durante el proceso, la fibra se somete a una atmósfera de  $\text{CO}_2$  en condiciones supercríticas, ya sea con o sin cosolvente. Las características difusivas del  $\text{SC-CO}_2$  en estas condiciones le permiten penetrar en las fibras vegetales con facilidad, impregnando por completo el material. Asimismo, le es posible extraer fragmentos de lignina y hemicelulosa debido a su capacidad de disolver compuestos hidrofóbicos, incrementada por la operación a temperaturas elevadas.

Habiendo transcurrido el tiempo de residencia determinado, la presión se libera de manera violenta, y el  $\text{SC-CO}_2$  pasa súbitamente a  $\text{CO}_2$  en fase gaseosa, expandiéndose de manera explosiva dentro de las fibras lignocelulósicas y por consiguiente causándoles daños físicos notables.

Adicionalmente, se pueden emplear cosolventes como mezclas de agua y disolventes orgánicos o líquidos iónicos. El agua interactúa con el  $\text{CO}_2$  formando ácido carbónico, ocasionando un pretratamiento más severo. La función del disolvente orgánico o iónico es incrementar la extracción de la lignina o fragmentos de esta, dejando la celulosa más propensa a un ataque enzimático.

### 6.3. Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio

El cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim]Cl) es un líquido iónico investigado recientemente como posible sustituto de disolventes orgánicos en procesos industriales y de laboratorio. En la Figura 6.3 se muestra la estructura química del [Bmim]Cl.

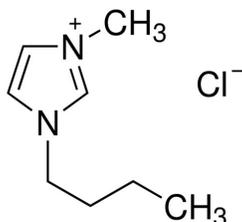


Figura 6.3: Estructura del [bmim]Cl

Existe en dos formas polimórficas y se caracteriza por ser sólido a temperatura ambiente, haciendo posible su uso en reacciones de intercambio aniónico para preparar sales líquidas. A temperatura ambiente, es soluble en acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, alcohol isopropílico, cloruro de metileno y agua. Por otro lado, es inmisible en hexano y tolueno.

Los campos de aplicación en los que se centran las investigaciones sobre este líquido son, fundamentalmente, como reactivo, como catalizador o parte de catalizador, y especialmente como disolvente. Uno de los ejemplos más importantes es el uso de [bmim]Cl en el craqueo de hidrocarburos y en la producción de otros líquidos iónicos como tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio. También se ha estudiado su uso como fase estacionaria en separaciones por cromatografía de gas y como fase móvil en cromatografía líquida.

#### 6.3.1. Pretratamiento de material lignocelulósico

Recientemente, el uso de líquidos iónicos (LIs) ha llamado la atención como pretratamiento de biomasa celulósica. Los LIs han probado ser altamente efectivos en la remoción de la lignina y la hemicelulosa, y también ayudan a reducir la cristalinidad. Asimismo, se pueden aplicar para disolver diversos tipos de biomasa, como son las maderas suaves, duras, materiales herbáceos, etc.

Adicionalmente, algunos LIs son compatibles con la sacarificación enzimática en medio acuoso-LI, y pueden ser reciclados y reutilizados. No obstante, es importante considerar que este tipo de compuestos por lo general presentan un efecto ligeramente inhibitorio en las celulasas, por lo que utilizarlos en concentraciones elevadas puede reducir la sacarificación.

Se han identificado diferentes líquidos iónicos que promueven la deslignificación como solventes efectivos para el pretratamiento sin necesidad de catalizador alguno y a temperaturas tan bajas como 90 °C. De esta manera se preserva la funcionalidad de la lignina, contribuyendo así con una materia prima adicional con valor potencial como precursor químico.

Estudios recientes reportan que en este tipo de pretratamiento elegir las condiciones correctas de temperatura y tiempo de incubación es crucial para obtener una sacarificación eficiente, ya que estas variables influyen en el suministro de energía y en la solubilidad de la celulosa (Uju et al., 2012). Y, por otro lado, que los LIs de tipo piridinio tienen el potencial para incrementar la eficiencia del pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Asimismo, se ha reportado que se puede superar el rendimiento obtenido mediante la adición de un catalizador ácido (Diedericks et al., 2012).

Por otro lado, el efecto del cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim]Cl) y de la presión alta en la actividad de la celulasa de *Aspergillus niger* se estudiaron por separado y en combinación. La actividad enzimática disminuyó con concentraciones crecientes de [bmim]Cl, alcanzando el 50 % del valor en buffer acuoso con 20 % [bmim]Cl. Sin embargo, cuando la enzima se mantiene en 10 % de [bmim]Cl y después se analiza en 1 % de [bmim]Cl, mostró sólo 8 % de reducción de la actividad.

Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la actividad de la enzima en [bmim]Cl está linealmente correlacionada con la disminución de la actividad termodinámica de agua ( $a_w$ ). Bajo presión la actividad de la enzima varió desde menos 60 % (a 200 MPa) hasta la misma (a 400 MPa), en comparación con la presión atmosférica.

En 10 % de [bmim]Cl y bajo presión, la actividad de celulasa es mejor comparada con la observada a presión atmosférica, variando de igual (a 600 MPa) a 1,7-veces mayor (a 100 MPa). Esto abre la posibilidad de mejorar la actividad de celulasa en líquidos iónicos, y posiblemente de otras enzimas, llevando a cabo la reacción a presiones elevadas.

Debido a las ventajas anteriormente descritas, en el presente proyecto se propuso estudiar este líquido iónico como cosolvente durante el pretratamiento de material lignocelulósico mediante la explosión de dióxido de carbono supercrítico.

## 6.4. Enzimas

Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, respectivamente (Ponce Noyola y Pérez Avalos, 2002).

### 6.4.1. Celulasas

El sistema enzimático de las celulasas consta de tres componentes principales. El modo de acción de cada uno de ellos está bien definido:

**Endoglucanasas:** Producen escisiones al azar de la cadena de celulosa, dando como productos glucosa, celobiosa y celotriosa

**Exoglucanasas:** Atacan por el extremo no reductor de la cadena de celulosa, generando celobiosa como producto primario

**Celobiasas:** Hidrolizan la celobiosa, produciendo glucosa.

Estas enzimas actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa (Figura 6.4); las endoglucanasas generan nuevos puntos de acceso para las exoglucanasas, mientras las celobiasas eliminan la celobiosa, evitando la inhibición por productos para las glucanasas (Alvira et al., 2011). La acción hidrolítica de las celulasas puede describirse como un proceso en dos etapas:

**Primera etapa:** Conversión de celulosa a celobiosa por la acción sinérgica de endo- y exo- glucanasas, que son fuertemente adsorbidas en la superficie de la celulosa sólida

**Segunda etapa:** Conversión de celobiosa a glucosa por la celobiasa, en la fase acuosa

Cuando la exoglucanasa actúa sola, puede tener lugar una fuerte competencia entre la unión enzima-sustrato y enzima-producto, ya que se conoce que esta enzima sufre una fuerte inhibición competitiva por la celobiosa. Por tanto, una cantidad elevada de celobiasa ayudaría a evitar la inhibición de la exo-enzima (Lázaro Belanche y Arauzo Pérez, 1994). Asimismo, añadir un tensoactivo mejora la solubilización de la celulosa, facilitando así la acción de las glucanasas. Otra posibilidad es llevar a cabo una prehidrólisis ácida, seguida de hidrólisis enzimática.

### 6.4.2. Xilanasas

Las xilanas son heteropolisacáridos y su degradación total para producir xilosa y arabinosa se lleva a cabo, como en la celulosa, por un grupo de enzimas que participan en conjunto (Ponce Noyola y Pérez Avalos, 2002). Las más conocidas son:

**Endoxilanasas:** Rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal.

**Arabinofuranosidasa:** Hidroliza las cadenas laterales de arabinosa.

**Acetil xilano esterasas:** Liberan grupos acetatos.

**Glucoronidasa:** Remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico.

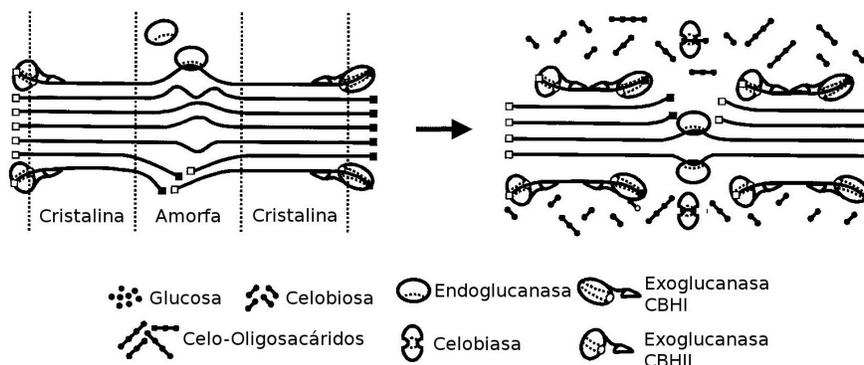


Figura 6.4: Representación esquemática de la hidrólisis de celulosa. Fuente: Lynd et al. (2002)

**Xilosidasas:** Hidrolizan oligosacáridos cortos, produciendo xilosa

### 6.4.3. Sacarificación de polisacáridos

De los nueve cocteles enzimáticos analizados en el presente proyecto, se determinó que ninguno presenta niveles elevados para las tres actividades enzimáticas cuantificadas (figuras 5.3, 5.4 y 5.5).

Esto ocurre porque la composición de sustratos para los que fueron diseñados los cocteles comerciales es distinta a la del bagazo de agave, y por consiguiente habrá cocteles que hidrolicen de manera eficiente las diferentes fracciones que componen al bagazo.

Debido a lo anterior, se decidió que será más adecuado utilizar una mezcla de cocteles enzimáticos que actúen en conjunto para hidrolizar más eficientemente los polisacáridos presentes en el bagazo de agave, por lo que será necesario estudiar por separado la hidrólisis de celulosa y la de hemicelulosa. Durante el presente proyecto se analizó únicamente la hidrólisis de celulosa, dejando la hidrólisis de hemicelulosa como trabajo posterior.

### 6.4.4. Celluzyme BL

Se determinó que el coctel más adecuado para la hidrólisis de la celulosa presente en el bagazo de agave fue el denominado "Celluzyme BL" (ver figuras 5.3 y 5.4). Se trata de un coctel de celulasas sumamente activo y de producción nacional, por lo que ofrece numerosas ventajas.

## **Estabilidad enzimática**

La principal restricción del uso de enzimas como biocatalizadores de proceso radica en su inherente labilidad derivada de su compleja estructura molecular.

La estabilidad de una enzima puede definirse como la capacidad de retener su actividad en una condición ambiental determinada. Puesto que la estructura proteica es la que determina la actividad enzimática, cualquier causa que perturbe esta estructura puede llevar a una pérdida de actividad. Son particularmente importantes la temperatura y la presencia de compuestos químicos inactivantes.

Aunque el rango general de temperaturas adecuadas para las reacciones enzimáticas es muy estrecho, los cambios ligeros suelen tener una considerable influencia. Al aumentar la temperatura, la velocidad de reacción aumenta. Como regla general para muchas enzimas, dada la disminución de la energía de activación, un incremento de 10 °C duplica la velocidad de reacción. Sin embargo, el mismo aumento de temperatura acelera también la inactivación de la enzima por desnaturalización térmica.

Para muchas enzimas la región de inactivación térmica está muy próxima a la temperatura óptima de actividad. Por esta razón, es de suma importancia conocer el intervalo de temperatura que garantice velocidades elevadas, pero sin comprometer la estabilidad de la enzima.

En la literatura, la información detallada sobre el coctel “Celluzyme BL” es escasa, por lo que se optó por realizar un estudio de estabilidad térmica para el mismo (Figura 5.6), en el que se determinó que este coctel presenta una estabilidad térmica máxima a 30 °C.

Por otro lado, a pesar de que por encima de los 30 °C la enzima pierde cierta actividad, predomina el aumento en la rapidez de sacarificación obtenido al incrementar la temperatura 10 °C. Por esta razón, la sacarificación se llevó a cabo a 40 °C.

## **6.5. Isothermas de desorción de humedad**

Se construyeron isothermas de desorción de humedad para bagazo de agave pretratado a diferentes condiciones. Como se puede observar en las figuras 5.7 y 5.8, existen cambios importantes a concentraciones de agua menores a 30%. Sin embargo, estos cambios no son suficientemente apreciables, dificultando determinarlos adecuadamente mediante el método utilizado en el presente proyecto.

Debido a lo anterior, será necesario realizar estudios posteriores con equipos de mayor precisión para poder determinar de manera cuantitativa el efecto del pretratamiento sobre la porosidad del bagazo de agave.

## 6.6. Sacarificación de celulosa

La celulosa presente en el bagazo de agave se sacarificó con un rendimiento superior al mínimo deseado (50%), por lo que se puede concluir que el pretratamiento mediante la explosión de dióxido de carbono supercrítico es factible.

### 6.6.1. Ciclos de pretratamiento

Resulta evidente que a mayor número de explosiones, el pretratamiento será más drástico, y por consiguiente se obtendrá un mejor rendimiento en la sacarificación (figuras 5.9 y 5.10). No obstante, esto deja de ser viable a partir del tercer ciclo.

Lo más probable es que esto ocurra debido a que existen factores, como la estabilidad inherente de la celulosa, que no se ven afectados por el número de ciclos de pretratamiento. Por esta razón, los daños físicos causados al bagazo de agave sólo pueden mejorar el rendimiento hasta cierto límite, y el efecto de cada ciclo de pretratamiento es menor que el del anterior.

### 6.6.2. Tamaño de partícula

Se puede intuir que, entre más pequeñas sean las partículas a sacarificar, la hidrólisis enzimática será más eficaz, lo cual se corrobora con los resultados mostrados en las figuras 5.11 y 5.12.

El tamaño de partícula es una variable de suma importancia, ya que ejerce efecto sobre dos fenómenos que se dan sobre la superficie de las partículas del bagazo de agave:

**Sacarificación:** Por tratarse de hidrólisis enzimática de un sustrato insoluble, se requiere que la celulosa migre desde la fase supercrítica ( $\text{CO}_2$ ) hacia la superficie de las partículas de bagazo de agave.

**Deslignificación:** De manera similar, para extraer la lignina presente en el bagazo se requiere que esta se difunda desde la fase sólida (bagazo de agave) hacia la fase supercrítica y el cosolvente.

Estos fenómenos son determinantes en el pretratamiento del bagazo, y es por esto que, a menor tamaño de partícula, mayor será la superficie de bagazo disponible, y la sacarificación será más eficiente.

### 6.6.3. Presión de pretratamiento

Dada la naturaleza de la explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC- $\text{CO}_2$ -E), es de esperarse la presión ejerza un efecto favorable en el grado de sacarificación de las fibras;

pero no así en el nivel de deslignificación. Esto se confirma con los resultados mostrados en las figuras 5.13 y 5.14.

La razón de esto es que, al incrementar la presión, la caída de esta será mayor al abrir la válvula del reactor. Esto genera un pretratamiento más severo, lo que ocasiona mayores daños al bagazo, y por consiguiente un mayor rendimiento en la sacarificación.

Por otro lado, la presión es un factor puramente físico que no afecta en gran medida la extracción de la lignina, y es por esto que la coloración roja es similar en las fotografías de la Figura 5.13.

#### **6.6.4. Humedad de pretratamiento**

Se determinó que la humedad dentro del reactor influye de manera importante sobre el nivel de deslignificación (Figura 5.15), y un menor efecto en el rendimiento de sacarificación (Figura 5.16).

Esto ocurre debido a que la cantidad de agua en el reactor no altera de manera importante los daños físicos al bagazo de agave causados por el pretratamiento. Sin embargo, permite extraer con mayor facilidad los fragmentos de lignina presentes en el material, dejando las fibras de polisacáridos menos protegidas ante el ataque enzimático de las celulasas.

#### **6.6.5. Concentración de [bmim]Cl**

De manera similar, y por las mismas razones que en el caso de la humedad, la concentración de este líquido iónico ejerce un mayor efecto sobre la deslignificación que sobre el rendimiento de la sacarificación (Figura 5.17).

Por otra parte, en la Figura 5.18 se observa un punto máximo de sacarificación a una proporción de 1 g de LI por cada 4 g de bagazo, más allá del cual el rendimiento decae notablemente.

Lo anterior ocurre debido a que los LIs tienden a presentar un efecto inhibitorio en las celulasas, y por esta razón se debe evitar utilizarlos en concentraciones elevadas.

#### **6.6.6. Tiempo de residencia**

El principal efecto de esta variable de pretratamiento es sobre el nivel de deslignificación, como puede observarse en la Figura 5.19.

Por otro lado, el efecto sobre el rendimiento de la sacarificación, mostrado en la Figura 5.20, puede explicarse debido a que dentro del reactor ocurren dos fenómenos diferentes:

**Extracción** de compuestos derivados de la lignina, lo que facilita la hidrólisis de los polisacáridos y por consiguiente incrementa la sacarificación final.

**Degradación** térmica de los carbohidratos, ocasionando una pérdida de azúcares reductores potenciales y reduciendo la sacarificación final.

Conociendo esto, se puede explicar la diferencia de comportamiento que presentan los dos tipos de pretratamiento estudiados (Figura 5.20):

**Sin LI:** El cosolvente en este caso agua pura, la cual tiene poca capacidad de extraer los compuestos derivados de la lignina. Por esta razón, predomina la degradación térmica de los carbohidratos, ocasionando que la sacarificación disminuya al incrementar el tiempo de residencia.

**Con LI:** Durante las primeras tres horas, predomina la extracción de los compuestos derivados de la lignina, dejando la celulosa más expuesta a la hidrólisis enzimática, y por consiguiente incrementando la sacarificación. Sin embargo, después de tres horas de pretratamiento, el fenómeno predominante es la degradación térmica de los carbohidratos, provocando una reducción en el rendimiento a partir de ese momento.

### 6.6.7. Temperatura de pretratamiento

Se determinó que la temperatura dentro del reactor no influye de manera notoria sobre el nivel de deslignificación (Figura 5.21), lo cual era de esperarse, puesto que no es un factor determinante en el proceso de extracción. Por el contrario, la importancia que tiene esta variable sobre el rendimiento de la sacarificación es evidente, como se muestra en la Figura 5.22.

Asimismo, se puede observar (Figura 5.22) que se alcanza un rendimiento máximo de sacarificación a una temperatura de 160 °C. Por arriba de este valor, los carbohidratos se degradan por calor, reduciendo drásticamente el rendimiento.

Del mismo modo, se puede notar que el efecto de la temperatura por debajo de 160 °C es diferente para cada serie de experimentos, siendo crucial para el caso de bagazo seco, pero no tan determinante para el bagazo empapado.

De manera similar, se confirma también el efecto de la humedad del bagazo sobre el pretratamiento, siendo este más eficiente a mayor contenido de agua. Sin embargo, este efecto disminuye a medida que se acerca a la temperatura óptima, alcanzando casi el mismo rendimiento a 160 °C independientemente del cosolvente, confirmando que no es necesario utilizar el líquido iónico.

Debido a lo anterior, el pretratamiento adquiere un carácter versátil; es decir, dependiendo de los recursos disponibles, es posible aumentar el rendimiento ya sea mediante la adición de agua, de otro cosolvente, o bien incrementando la temperatura de pretratamiento.

Por estas razones, se determinó que la temperatura de pretratamiento, tentativamente, será de 160 °C. No obstante, dependiendo de las condiciones, puede reducirse si se considera más factible compensar la disminución del rendimiento utilizando algún cosolvente.

#### 6.6.8. Pretratamiento e hidrólisis simultáneos

En este proyecto se propone también la opción de realizar simultáneamente el proceso de pretratamiento de lignocelulosa y el de hidrólisis de celulosa. Esto reduce apreciablemente el tiempo requerido para el proceso global.

Se debe considerar que usualmente se requieren temperaturas de pretratamiento superiores a las que soportan las enzimas convencionales. Sin embargo, se pueden emplear enzimas provenientes de organismos extremófilos (extremozimas). Estas muestran actividad y estabilidad a temperaturas extremas, actividades de agua bajas y presiones hidrostáticas elevadas. (Adams y Kelly, 1998; Sellek y Chaudhuri, 1999; Unsworth et al., 2007)

Conociendo el rango de estabilidad del coctel enzimático utilizado, resulta evidente que el pretratamiento con sacarificación simultánea (explosión con enzima) no se puede llevar a cabo a la misma temperatura que el pretratamiento ordinario, ya que es demasiado elevada para las enzimas.

Debido a esto, se llevaron a cabo explosiones con enzima a diferentes temperaturas, con la finalidad de determinar la mejor temperatura para el pretratamiento con sacarificación simultánea. Se determinó que, de la misma manera que para la sacarificación, la temperatura más adecuada para llevar a cabo la explosión con enzima es de 40 °C.

Por otro lado, es importante destacar que el rendimiento alcanzado mediante este método a 40 °C durante 24 horas es muy similar al obtenido sacarificando a 50 °C durante 72 horas. Teniendo esto en cuenta, se puede concluir que existen dos tipos adecuados de operación: uno mediante la sacarificación después del pretratamiento, y el otro llevando a cabo los dos procesos simultáneamente.

En ambos casos se alcanza un porcentaje de sacarificación cercano al 60 %, por lo que el tipo de operación elegido dependerá del equipo con el que se disponga.

#### 6.6.9. Pretratamiento y acción enzimática óptimos

La finalidad de esta serie de experimentos fue determinar si es posible superar el 60 % de rendimiento en la sacarificación utilizando explosiones sucesivas. En la Figura 5.24 se muestra que esto no es posible. No obstante, en estos resultados se puede observar lo siguiente:

**Pretratamiento:** El líquido iónico reduce la sacarificación. Por otro lado, la mayor parte de la hidrólisis ocurre durante las primeras 24 horas, por lo que el tiempo de sacar-

ificación elegido (72 horas); puede reducirse en función de la eficiencia global.

**Explosión con enzima:** Se confirma que el líquido iónico reduce la sacarificación, muy probablemente debido a que inhibe a las celulasas. Por otro lado, en este caso es suficiente un tiempo de residencia de 24 horas.

**Pretratamiento - explosión con enzima:** Por lo general, las celulasas trabajan más adecuadamente en soluciones diluidas, pero en este caso, y en el rango de concentraciones estudiado, ocurre lo contrario.

De manera adicional, se pueden hacer otras observaciones importantes. La Figura 6.5 muestra parte de los resultados de la Figura 5.24, ordenados de tal manera que se puede notar lo siguiente:

- El rendimiento alcanzado en el pretratamiento y en la explosión con enzima a un tiempo de residencia de 24 horas es muy similar.
- En el pretratamiento, el incremento del tiempo de residencia hasta 72 horas aumenta de manera apreciable el porcentaje de sacarificación.
- En la explosión con enzima, al triplicar el tiempo de residencia no se genera un incremento considerable en rendimiento obtenido.

El comportamiento anterior se puede atribuir a que, de la celulosa hidrolizable por este método, existe una fracción amorfa y otra cristalina. Esta última presenta una estructura más cerrada, y por consiguiente es más difícil de hidrolizar.

Conociendo esto, lo más probable es que un tiempo de residencia de 24 horas sea suficiente para sacarificar la fracción amorfa de la celulosa en cualquiera de los dos tipos de operación. Sin embargo, la fracción cristalina, que es mucho más estable, requiere condiciones más drásticas para hidrolizarse, como las del pretratamiento a 160 °C durante 72 horas.

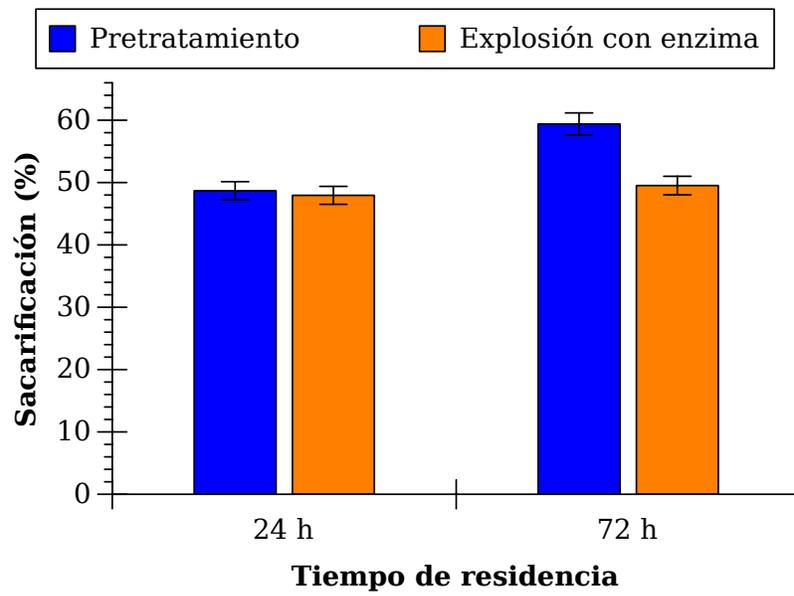


Figura 6.5: Operaciones en condiciones óptimas

# Conclusiones

1. Teniendo en cuenta el rendimiento de azúcares reductores alcanzado ( $\sim 60\%$ ), se puede concluir que la explosión de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>-E) es, en efecto, un método de pretratamiento viable para la obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos.
2. El coctel enzimático comercial más adecuado para la sacarificación de la celulosa presente en los residuos lignocelulósicos es el llamado “Celluzyme BL”. Queda por determinar con mayor precisión el coctel más adecuado para sacarificar la hemicelulosa, pero tentativamente será el coctel “Cellic HTec2”, o el coctel “Accelerase XC”.
3. Se encontraron dos tipos de operación diferentes para la SC-CO<sub>2</sub>-E, y las condiciones de operación determinadas para cada uno fueron:

## **Pretratamiento:**

- Ciclos de operación: 1
- Tamaño de partícula: Mínimo
- Cosolvente: Agua pura en relación agua:bagazo de 1:1
- Expansión: Inmediatamente después de alcanzar la temperatura deseada
- Presión: Máxima
- Temperatura: 160 °C

## **Explosión con enzima:**

- Ciclos de operación: 1
- Tamaño de partícula: Mínimo
- Cosolvente: Buffer de citrato 0.05 M pH 4.8 en relación 1:1 con el bagazo
- Enzima: “Celluzyme BL” a 10 FPU por gramo de celulosa
- Expansión: 24 horas después de alcanzar la temperatura deseada
- Presión: Máxima
- Temperatura: 40 °C

# Capítulo 7

## Trabajo posterior

### 7.1. Continuación al proyecto

#### 7.1.1. Isotermas de desorción de humedad

Realizar las isotermas de desorción de humedad realizando las mediciones con equipos de mayor precisión, de manera que sea posible determinar adecuadamente el efecto del pretratamiento en la estructura morfológica, superficie específica, porosidad, y otras propiedades del bagazo de agave.

#### 7.1.2. Modelo cinético

Llevar a cabo un estudio cinético de la hidrólisis enzimática del bagazo, con la finalidad de determinar con mayor precisión y confiabilidad la temperatura y el tiempo de residencia más adecuados para la sacarificación del material.

El desarrollo de un modelo cinético confiable para la hidrólisis enzimática de la celulosa es útil para el entendimiento de su mecanismo y el subsecuente diseño de reactores.

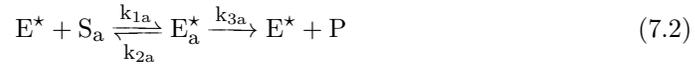
Los materiales celulósicos están compuestos por una fracción cristalina altamente ordenada y una fracción amorfa permeable. En algunos casos se considera esta multiplicidad de la estructura de la celulosa y en otros se asume que es un material homogéneo.

En lo referente a la acción de la enzima sobre el sustrato, en algunos casos se consideran los tres componentes del sistema de las celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas). Sin embargo, puesto que los comportamientos cinéticos de los tres tipos de enzimas son diferentes y no son completamente entendidos, se sugirió emplear modelos simplificados, asumiendo que el sistema de celulasas se puede representar cuantitativamente como si fuera una sola enzima (Dutta, 2008).

A continuación se muestra un modelo cinético empleado frecuentemente para la hidrólisis enzimática de la celulosa, basado en las siguientes suposiciones:

1. El material celulósico ( $S_0$ ) está compuesto por celulosa amorfa ( $S_a$ ), celulosa cristalina ( $S_c$ ) y material no hidrolizable ( $S_n$ ), y sus velocidades de degradación son diferentes.
2. El sistema de celulasas puede ser representado cuantitativamente por una enzima ( $E$ ).
3. La enzima primero se adsorbe en la superficie de la celulosa ( $E^*$ ), y posteriormente se forma el complejo enzima-sustrato ( $E^*S$ ). Finalmente se hidroliza el sustrato y se libera el producto y la enzima.
4. Los productos ( $P$ ), glucosa y celobiosa, inhiben la enzima competitivamente.

El mecanismo de reacción, basado en las suposiciones anteriores, se puede escribir como sigue:



La adsorción de la enzima (ecuación 7.1) puede ser descrita como una isoterma de adsorción de Langmuir:

$$\frac{[E^*]}{[E_{\max}^*]} = \frac{K_e[E]}{1 + K_e[E]} \quad (7.6)$$

Donde  $[E_{\max}^*]$  representa la concentración máxima de enzima adsorbida y  $K_e$  la constante de adsorción. A bajas concentraciones de enzima ( $K_e[E] \ll 1$ ), la ecuación 7.6 se reduce a:

$$[E^*] = K_e[E_{\max}^*][E] = K_d[E] \quad (7.7)$$

Realizando un balance de materia diferencial para el producto, empleando las ecua-

ciones 7.2 y 7.3, se tiene:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{3a}[E_a^*] + k_{3c}[E_c^*] \quad (7.8)$$

Se asume que la cantidad total de enzima es constante:

$$[E_0] = [E] + [E^*] + [E_a^*] + [E_c^*] + [E_n^*] + [E_p] \quad (7.9)$$

Para obtener una expresión para la velocidad de reacción, se emplea la aproximación de estados estacionarios, en la que se asume que el cambio de la concentración de los intermediarios es despreciable. De esta manera se obtiene:

$$\frac{d[E_a^*]}{dt} = k_{1a}[E^*][S_a] - (k_{2a} + k_{3a})[E_a^*] \approx 0 \quad (7.10)$$

$$\frac{d[E_c^*]}{dt} = k_{1c}[E^*][S_c] - (k_{2c} + k_{3c})[E_c^*] \approx 0 \quad (7.11)$$

$$\frac{d[E_n^*]}{dt} = k_{1n}[E^*][S_n] - k_{2n}[E_n^*] \approx 0 \quad (7.12)$$

$$\frac{d[E_p]}{dt} = k_{1p}[E][P] - k_{2p}[E_p] \approx 0 \quad (7.13)$$

De la ecuación 7.10 se obtiene:

$$[E_a^*] = \frac{[S_a]}{K_a}[E^*] \quad (7.14)$$

De manera análoga, de la ecuación 7.11:

$$[E_c^*] = \frac{[S_c]}{K_c}[E^*] \quad (7.15)$$

De la ecuación 7.12 se obtiene:

$$[E_n^*] = \frac{[S_n]}{K_n}[E^*] \quad (7.16)$$

Y de la ecuación 7.13:

$$[E_p] = \frac{[P]}{K_p}[E] \quad (7.17)$$

Donde:

$$K_a = \frac{k_{2a} + k_{3a}}{k_{1a}} \quad , \quad K_c = \frac{k_{2c} + k_{3c}}{k_{1c}} \quad , \quad K_n = \frac{k_{2n}}{k_{1n}} \quad , \quad K_p = \frac{k_{2p}}{k_{1p}}$$

Sustituyendo las ecuaciones 7.14 y 7.15 en la ecuación 7.8 se obtiene:

$$\frac{d[P]}{dt} = \left( \frac{k_{3a}}{K_a} [S_a] + \frac{k_{3c}}{K_c} [S_c] \right) [E^*] \quad (7.18)$$

Por otro lado, sustituyendo las ecuaciones 7.7, 7.14, 7.15, 7.16 y 7.17 en la ecuación 7.9:

$$[E^*] = \frac{[E_0]}{1 + \frac{[S_a]}{K_a} + \frac{[S_c]}{K_c} + \frac{[S_n]}{K_n} + \frac{1}{K_d} \left( 1 + \frac{[P]}{K_p} \right)} \quad (7.19)$$

Sustituyendo la ecuación 7.19 en la 7.18, se obtiene:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{\left( \frac{k_{3a}}{K_a} [S_a] + \frac{k_{3c}}{K_c} [S_c] \right) [E_0]}{1 + \frac{[S_a]}{K_a} + \frac{[S_c]}{K_c} + \frac{[S_n]}{K_n} + \frac{1}{K_d} \left( 1 + \frac{[P]}{K_p} \right)} \quad (7.20)$$

Se definen las siguientes variables:

$$\phi = \frac{[S_c]}{[S_a] + [S_c]} \quad , \quad \gamma = \frac{[S_n]}{[S_a] + [S_c] + [S_n]} = \frac{[S_n]}{[S]}$$

Finalmente, sustituyendo esto en la ecuación 7.20 se obtiene:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{\left( \frac{k_{3a}}{K_a} (1 - \phi) + \frac{k_{3c}}{K_c} \phi \right) (1 - \gamma) [E_0] [S]}{1 + \frac{1}{K_d} \left( 1 + \frac{[P]}{K_p} \right) + \left[ \left( \frac{1 - \phi}{K_a} + \frac{\phi}{K_c} \right) (1 - \gamma) + \frac{\gamma}{K_n} \right] [S]} \quad (7.21)$$

Esta ecuación general se puede simplificar para velocidades iniciales sustituyendo:

$$[S] = [S_0] \quad , \quad [P] = 0 \quad , \quad \phi = \Phi$$

$$\left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = \frac{\left( \frac{k_{3a}}{K_a} (1 - \Phi) + \frac{k_{3c}}{K_c} \Phi \right) (1 - \gamma) [E_0] [S_0]}{1 + \frac{1}{K_d} + \left[ \left( \frac{1 - \Phi}{K_a} + \frac{\Phi}{K_c} \right) (1 - \gamma) + \frac{\gamma}{K_n} \right] [S_0]} \quad (7.22)$$

Que puede simplificarse más empleando celulosa pura como sustrato ( $\gamma = 0$ ):

$$\left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = \frac{\left( \frac{k_{3a}}{K_a}(1-\Phi) + \frac{k_{3c}}{K_c}\Phi \right) [E_0][S_0]}{1 + \frac{1}{K_d} + \left( \frac{1-\Phi}{K_a} + \frac{\Phi}{K_c} \right) [S_0]} \quad (7.23)$$

La ecuación 7.23 puede ser simplificada a una ecuación de Michaelis-Menten como:

$$\left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = \frac{r_{\max}^{\text{ap}}[S_0]}{K_M^{\text{ap}} + [S_0]} \quad (7.24)$$

Donde  $r_{\max}^{\text{ap}}$  y  $K_M^{\text{ap}}$  representan la rapidez máxima y constante de Michaelis aparentes, respectivamente. Las cuales equivalen a:

$$r_{\max}^{\text{ap}} = \frac{\left( k_{3a} \frac{1-\Phi}{K_a} + k_{3c} \frac{\Phi}{K_c} \right) [E_0]}{\frac{1-\Phi}{K_a} + \frac{\Phi}{K_c}}, \quad K_M^{\text{ap}} = \frac{1 + \frac{1}{K_d}}{\frac{1-\Phi}{K_a} + \frac{\Phi}{K_c}}$$

## 7.2. Xilanasas

Realizar un estudio similar al de las celulasas para el caso de las xilanasas más eficientes, como por ejemplo el coctel llamado “Cellic HTec2”, o el “Accelerase XC”. De esta manera será posible utilizar una mezcla de celulasas y xilanasas para el pretratamiento de material lignocelulósico.

Finalmente, esto permitirá aprovechar al máximo los carbohidratos presentes en el bagazo de agave, así como en otras fuentes potenciales de bioetanol de segunda generación.

## 7.3. Recomendaciones

### 7.3.1. Reciclaje de residuos sólidos

Cerca de 40 % de los desechos sólidos a nivel global puede ser atribuido al papel, del cual se puede recuperar alrededor del 20 % de azúcares reductores fermentables (Marcano et al., 2010). Aprovecharlos representaría una producción considerable de biocombustible; al tiempo que se reduce la cantidad de contaminantes sólidos.

### 7.3.2. Bioprocusamiento consolidado (Lynd et al., 2002)

En términos generales, cuatro eventos mediados biológicamente ocurren en el transcurso de la conversión de biomasa celulósica en combustibles y otros productos de valor agregado.

1. Producción de celulasas
2. Hidrólisis de celulosa y otros polisacáridos insolubles
3. Fermentación de productos solubles de la hidrólisis de celulosa
4. Fermentación de productos solubles de la hidrólisis de hemicelulosa

Los procesos de producción de dichos productos a partir de biomasa celulósica se pueden categorizar con base en el grado de consolidación de estos eventos. Como se muestra en la Figura 7.1, la hidrólisis y fermentación por separado (SHF) involucra cuatro pasos separados y cuatro diferentes biocatalizadores. La sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) consolidan la hidrólisis de celulosa y la fermentación de sus productos en un mismo proceso, siendo la producción de celulasas y fermentación de los productos de la hidrólisis de hemicelulosa dos procesos adicionales. La sacarificación y cofermentación simultáneas (SSCF) se lleva a cabo en dos pasos: siendo el primero la producción de celulasas, y el segundo en el que se hidroliza la celulosa y se fermentan los productos de hidrólisis tanto de celulosa como de hemicelulosa. En el bioprocusamiento consolidado (CBP), los cuatro procesos se ejecutan en una sola operación.

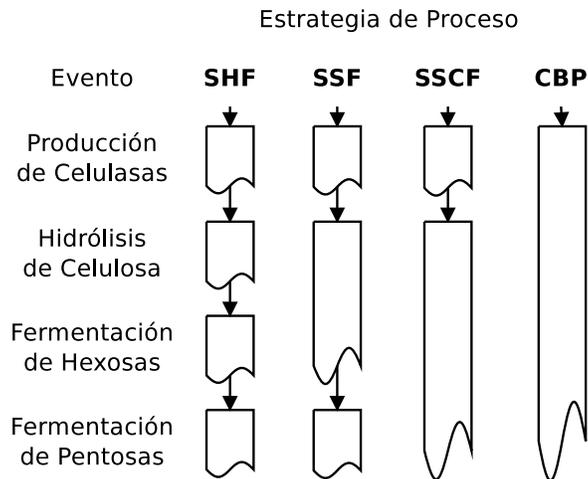


Figura 7.1: Configuraciones de procesamiento de biomasa celulósica. Fuente: Lynd et al. (2002)

En la Figura 7.2 se muestra un ejemplo de un proceso de tratamiento de material lignocelulósico en configuración SHF; como se puede observar, en esta configuración se requiere un alto número de procesos para producir bioetanol.

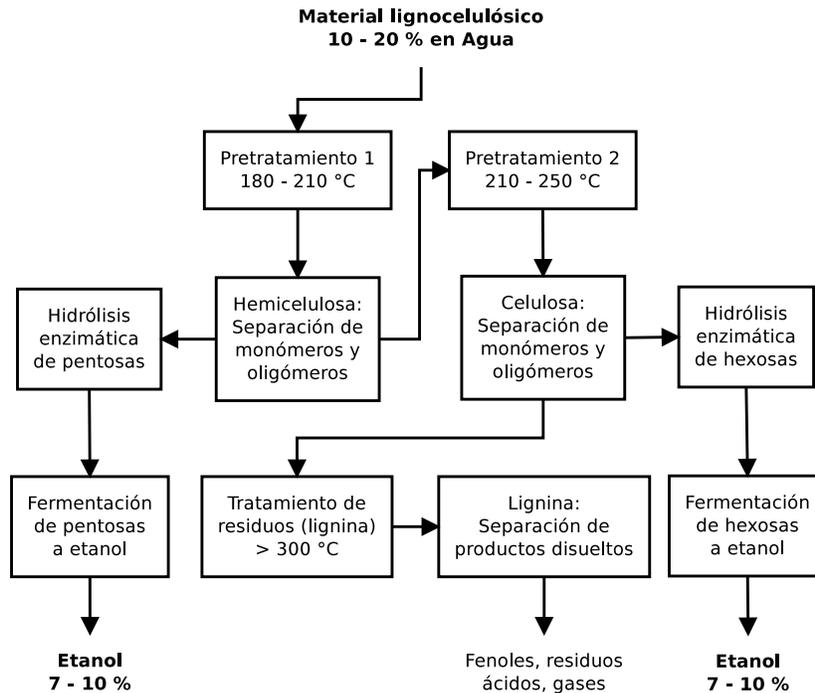


Figura 7.2: Tratamiento de material lignocelulósico empleando agua líquida caliente. Fuente: Schacht et al. (2008)

Esto conlleva un elevado número de biorreactores, con sus costos asociados de inversión inicial, operación, mantenimiento, etc. Adicionalmente, la duración de las operaciones por separado, así como el trayecto de un biorreactor al siguiente, elevan considerablemente el tiempo requerido globalmente para el proceso de producción.

Dichos costos y tiempos de operación se pueden reducir sustancialmente al disminuir el número de operaciones. Potencialmente, esto representa una de las principales ventajas que ofrece el bioprocésamiento consolidado, y es por esta razón que su desarrollo ha recibido una notable atención recientemente por parte de investigadores e inversionistas.

## Desarrollo

Para el bioprocésamiento consolidado se requiere un cultivo microbiano que combine las propiedades relativas tanto al uso del sustrato como a la formación del producto. Las

propiedades deseables incluyen:

**Para el uso del sustrato:** La producción de un sistema enzimático hidrolítico que permita ritmos elevados de hidrólisis y uso de sus productos bajo condiciones anaerobias con un medio de crecimiento práctico.

**Para la formación del producto:** Alta selectividad y concentración del producto.

Sin embargo, un cultivo celulolítico con esta combinación de propiedades no se ha descrito aún. El desarrollo de microorganismos para la conversión de celulosa vía CBP puede ser buscado de acuerdo a dos estrategias:

**Nativa:** Implica el uso de microorganismos celulolíticos existentes en la naturaleza con la finalidad de mejorar las propiedades relativas a los productos, como el rendimiento y la tolerancia.

**Recombinante:** Implica la ingeniería de microorganismos no celulolíticos que exhiban rendimientos y tolerancias elevados, permitiéndoles utilizar la celulosa como sustrato empleando un sistema de celulasas heterólogo.

Asimismo, las dos estrategias presentadas anteriormente se han aplicado exitosamente a la conversión de xilosa. El desarrollo de microorganismos capaces de convertir xilosa y otros azúcares derivados de la hemicelulosa a etanol con rendimientos altos ha sido uno de los avances más significativos en los campos de conversión de biomasa e ingeniería metabólica.

Por otro lado, la consideración de las propiedades de materias primas pretratadas sugiere que no se requiere necesariamente que los organismos usados en el CBP posean un sistema enzimático específico para la hidrólisis de hemicelulosa insoluble. La capacidad de utilizar los productos de la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa en un mismo proceso podría ser alcanzada mediante un cocultivo de dos organismos compatibles, uno con la capacidad de usar celulosa y otro con la de usar pentosas. Puede esperarse que dicho cultivo sea estable, puesto que cada organismo tendría un sustrato que no puede utilizar el otro. Cocultivos entre microorganismos celulolíticos y que utilizan pentosas son comunes en la naturaleza y ofrecen hidrólisis mejoradas en comparación con las de cultivos puros.

Alternativamente, la maquinaria metabólica para el uso de celulosa y pentosas podría ser incorporada en un solo organismo. En este caso, la utilización simultánea de la celulosa y las pentosas sería deseable. Esto podría ser logrado usando un enfoque molecular, diseñando el organismo huésped de manera que no presente represión catabólica. El empleo de un biorreactor también es prometedor en este contexto, permitiendo elegir condiciones de operación de manera que la concentración de los productos solubles de la hidrólisis sean mantenidos por debajo de los niveles que provocan la represión catabólica.

## **Biotecnología**

Diversos factores motivan el desarrollo de microorganismos que posean las propiedades requeridas para la implementación del CBP a escala industrial. Los ahorros primarios anticipados para el CBP comparados con otros procesos resultan de la eliminación de los costos asociados con el paso de proceso dedicado a la producción de celulasas. Otros beneficios importantes incluyen los altos rendimientos, altas velocidades y estabilidad mejorada de cultivos y cepas.

Sin embargo, estos beneficios siguen siendo inciertos. Los rendimientos elevados de productos de fermentación podrían ser alcanzados debido a la ausencia de metabolismo oxidativo en la configuración del CBP. Las velocidades altas podrían ser logradas mediante:

- Disponibilidad de toda la materia prima para las celulasas en el CBP
- Posibilidad de usar celulasas complejas de alta especificidad y actividad en organismos desarrollados para el CBP
- Sinergia célula-celulasa

La estabilidad mejorada de los cultivos puede resultar para el CBP, puesto que se espera que las bacterias celulolíticas adherentes empleadas desplacen diversos contaminantes por productos de la hidrólisis de celulosa. Asimismo, la presión selectiva podría mantener o mejorar la velocidad de hidrólisis en una configuración de CBP. Adicionalmente, se debe apreciar que el CBP es en principio aplicable en la producción de cualquier producto de fermentación obtenido a partir de biomasa celulósica.

No obstante, la factibilidad del CBP será completamente establecida únicamente cuando un microorganismo o consorcio microbiano que satisfaga los requerimientos discutidos anteriormente sea desarrollado. A falta de esta demostración definitiva, el análisis de viabilidad del CBP puede ser aproximado, ya sea considerando datos de anaerobios celulolíticos naturales, o empleando modelos cuantitativos.

### **7.3.3. Otros biocombustibles (Somerville, 2007)**

El etanol no es un combustible ideal en algunos aspectos, y puede no ser el principal biocombustible en 25 años. El mayor problema es su miscibilidad con el agua, que impone un costo energético para la destilación, crea problemas en el transporte del combustible por tuberías, y conduce a la intoxicación de los microorganismos que lo producen. Por lo tanto, existe interés en el desarrollo de biocombustibles que sean más hidrofóbicos y que se separen espontáneamente de la fase acuosa.

Aunque el butanol es tóxico a concentraciones bajas, es un biocombustible promisorio en otros aspectos. Se deshidrata espontáneamente en torno al 9 % en solución, tiene muy baja presión de vapor y un calor latente similar al del octano, de modo que la oxigenación a baja temperatura no es problemática. Es importante destacar que, cuando se añaden pequeñas cantidades de butanol al etanol, se disminuye la presión de vapor, reduciendo el riesgo de explosiones durante la manipulación del combustible.

Recientemente, diferentes compañías han anunciado planes para producir butanol por fermentación de los azúcares de la remolacha azucarera en Inglaterra. Además, se ha reportado que algunos microorganismos secretan alcanos, lo que sugiere el posible desarrollo de otros tipos de biocombustibles con propiedades físicas similares a los combustibles de uso actual.

Por otro lado, una ruta diferente al biodiésel implica la conversión térmica de la biomasa en un gas enriquecido en CO y H<sub>2</sub>. Este gas de síntesis se puede convertir en combustible diésel de alta calidad utilizando el proceso de Fischer-Tropsch desarrollado en Alemania en la década de 1920. Sin embargo, el rendimiento del combustible es únicamente de unos 40 galones por tonelada de biomasa. Por lo tanto, este enfoque hace un uso menos eficiente de la biomasa que el de la fermentación a etanol, y el balance energético neto es incierto.

# Bibliografía

- Adams, M. W. W. y Kelly, R. M. (1998). Finding and using hypertermophilic enzymes. *TIBTECH*, 16:329–332.
- Alinia, R., Zabihi, S., Esmailzadeh, F., y Kalajahi, J. F. (2010). Pretreatment of wheat straw by supercritical co<sub>2</sub> and its enzymatic hydrolysis for sugar production. *Biosystems Engineering*, 107:61–66.
- Alvira, P., Negro, M., y Ballesteros, M. (2011). Effect of endoxylanase and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresource Technology*, 102:4552–4558.
- Bailey, M. J., Biely, P., y Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23:257–270.
- Contreras Lara, D., Gutiérrez Chávez, I., Valdivia Macedo, R., Casares, G., y Ramírez Carrillo, J. (1999). Two techniques for measuring neutral detergent (ndf) and acid detergent (adf) fibers in forages and by-products. *Arch. Zootec.*, 48(183):351–354.
- Cuervo, L., Folch, J. L., y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3):11–25.
- Diedericks, D., van Rensburg, E., del Prado García-Aparicio, M., y Görgens, J. F. (2012). Enhancing the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse through the application of an ionic liquid in combination with an acid catalyst. *Biotechnology Progress*, 28(1):76–84.
- Domínguez Domínguez, M. M., Álvarez Castillo, A., Castrejón Rosales, T., Granados Baeza, M. J., Hernández Campos, F. J., Alcalá Octaviano, V. H., y Tapia Picazo, J. C. (2011). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(3):153–159.
- Dutta, R. (2008). *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Ane Books India, Springer.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59(2):257–268.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., y Miranda, I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *trichoderma spp.* promisorios como agentes de control biológico. ii. expresión de actividad glucanasa. *Rev. Protección Veg.*, 26(1):23–29.

- Gumeta Chávez, C., Chanona Pérez, J., Vega, A., Ligeró, P., Mendoza Pérez, J. A., y Gutiérrez López, G. (2007). Obtención de celulosa y lignina mediante el proceso organosolv. En *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Hernández Meléndez, O., Bárzana, E., Arriaga, S., Hernández Luna, M., y Revah, S. (2008). Fungal removal of gaseous hexane in biofilters packed with poly(ethylene carbonate) pine sawdust or peat composites. *Biotechnology and Bioengineering*, 100:864–871.
- Johnson, K. E. (2007). What's an ionic liquid? *The Electrochemical Society Interface*, páginas 38–41.
- Kim, K. H. y Hong, J. (2000). Supercritical co<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 77:139–144.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3):506–577.
- Lázaro Anell, A. C., Maqueda Gálvez, A. P., Arana-Cuenca, A., y Alejandro, T.-J. (2009). Deslignificación de la paja de cebada por hongos basidiomicetos. En *XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería; VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*.
- Lázaro Belanche, L. y Arauzo Pérez, J. (1994). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. hidrólisis enzimática. *Zubía*, 12:227–240.
- Marcano, E., Padilla, A., y Calderón, D. (2010). Obtención de azúcares a partir de celulosa kraft mediante hidrólisis con ácido sulfúrico diluido. *Agricultura Andina*, 17:33–42.
- Mason, W. (1926). Process and apparatus for disintegration of wood and the like. US Patent 1,578,609.
- Morales Huerta, J. C. (2011). Pretratamiento de residuos lignocelulósicos en extrusores de doble husillo corrotantes. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Moreno González, M. (2011). Pretratamiento de residuos lignocelulósicos (bagazo de agave) para su enriquecimiento en celulosa y valoración de azúcares reductores. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., y Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96:673–686.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega, 4a edición.
- Overend, R. y Chornet, E. (1994). Severity parameters: an update. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 207.

- Pasquini, D., Borges Pimienta, M. T., Ferreira, L. H., y da Silva Curvelo, A. A. (2005). Extraction of lignin from sugar cane bagasse and pinus taeda wood chips using ethanol–water mixtures and carbon dioxide at high pressures. *Journal of Supercritical Fluids*, 36:31–39.
- Ponce Noyola, T. y Pérez Avalos, O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva*, 21:273–277.
- Pérez, J., Gilarranz, M., Rodríguez, F., Oliet, M., y García, J. (2000). Estudio sobre la cinética de la designificación en la fase residual de las cocciones kraft. En *Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*.
- Quintero, J., Feijoo, G., y Lema, J. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13(2):61–67.
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., et al. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311:484–489.
- Reid, R., Prausnitz, J., y Poling, B. (1987). *Properties of gases and liquids*. McGraw Hill, N.Y., 4a edición.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454:841–845.
- Salvador, A. C., Santos, M. d. C., y Saraiva, J. A. (2010). Effect of the ionic liquid [bmim]cl and high pressure on the activity of cellulase. *Green Chem.*, 12(4):632–635.
- Schacht, C., Zetzl, C., y Brunner, G. (2008). From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 46:299–321.
- Sellek, G. A. y Chaudhuri, J. B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:471–482.
- Somerville, C. (2007). Biofuels. *Current Biology*, 17(4):R115–R119.
- Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S. C., y Long, S. P. (2010). Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*, 329:790–792.
- Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83:1–11.
- Uju, Shoda, Y., Nakamoto, A., Goto, M., Tokuhara, W., Noritake, Y., Katahira, S., Ishida, N., Nakashima, K., Ogino, C., y Kamiya, N. (2012). Short time ionic liquids pretreatment on lignocellulosic biomass to enhance enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 103:446–452.
- Unsworth, L. D., van der Oost, J., y Koutsopoulos, S. (2007). Hyperthermophilic enzymes - stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. *FEBS Journal*, 274:4044–4056.
- Vidal, P. F. y Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin, improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16:1–17.

# Apéndice A

## Tablas de resultados

Tabla A.1: Caracterización del bagazo de agave

<b>Componente</b>	<b>Fracción</b>
Celulosa	0.3536
Hemicelulosa	0.18010
Lignina	0.19255
Extraíbles	0.19679
Minerales	0.07694

Tabla A.2: Determinaciones de concentración de proteína

<b>Coctel Enzimático</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>
Accelerase 1500	68.26
Accelerase XC	21.72
Advanced Enzyme	6.150
Cellic CTec2	142.71
Cellic HTec2	133.72
Celluclast	25.03
Celluzyme BL	117.99
Celluzyme XB	105.96
Viscozyme	118.55

Tabla A.3: Determinaciones de actividad de celulasa

<b>Coctel Enzimático</b>	<b>Actividad Volumétrica</b> (FPU/mL)	<b>Actividad Específica</b> (FPU/mg)
Accelerase 1500	53.28	0.7805
Accelerase XC	20.64	0.9502
Advanced Enzyme	1.4066	0.2287
Cellic CTec2	82.65	0.5792
Cellic HTec2	12.352	0.09237
Celluclast	6.653	0.2659
Celluzyme BL	119.37	1.0117
Celluzyme XB	49.90	0.4710
Viscozyme	9.725	0.08204

Tabla A.4: Determinaciones de actividad de endoglucanasa

<b>Coctel Enzimático</b>	<b>Actividad Volumétrica</b> (CMC/mL)	<b>Actividad Específica</b> (CMC/mg)
Accelerase 1500	1490.2	21.83
Accelerase XC	712.1	32.78
Advanced Enzyme	281.5	45.78
Cellic CTec2	2711	19.000
Cellic HTec2	7.708	0.05764
Celluclast	197.31	7.884
Celluzyme BL	3051	25.86
Celluzyme XB	422.5	3.988
Viscozyme	64.10	0.5407

Tabla A.5: Determinaciones de actividad de xilanasa

<b>Coctel Enzimático</b>	<b>Actividad Volumétrica</b> (nkat/mL)	<b>Actividad Específica</b> (nkat/mg)
Accelerase 1500	1653.7	24.23
Accelerase XC	40160	1848.9
Advanced Enzyme	2265	368.2
Cellic CTec2	58560	410.4
Cellic HTec2	91020	680.7
Celluclast	176.82	7.066
Celluzyme BL	1052.4	8.919
Celluzyme XB	47940	452.5
Viscozyme	2261	19.070

Tabla A.6: Pruebas de estabilidad enzimática

Temperatura (°C)	Actividad (FPU/mL)
4	129.79
30	143.95
40	119.09
50	64.83
60	15.279

Tabla A.7: Sorción de humedad a diferentes ciclos de pretratamiento

Crudo		1 Ciclo		2 Ciclos		3 Ciclos		4 Ciclos	
$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$
0.03762	0.25	0.07613	0.418	0.03719	0.24	0.016501	0.171	0.02161	0.165
0.11312	0.646	0.11792	0.733	0.10616	0.666	0.03726	0.449	0.0473	0.45
0.2002	0.855	0.22	0.901	0.19361	0.862	0.06789	0.53	0.09921	0.667
0.2553	0.898	0.3074	0.948	0.2727	0.933	0.12479	0.699	0.0974	0.594
0.3197	0.937	0.3096	0.949	0.3281	0.933	0.18198	0.82	0.12136	0.679
0.3712	0.947	0.3981	0.958	0.374	0.941	0.2141	0.862	0.2088	0.883
0.4396	0.953	0.4993	0.958	0.4318	0.953	0.2424	0.926	0.2719	0.926
0.5495	0.96	0.5391	0.954	0.5345	0.953	0.2994	0.937	0.2723	0.915
0.6812	0.966	0.6115	0.959	0.5828	0.96	0.3811	0.938	0.504	0.958
0.6789	0.968	0.6796	0.953	0.6313	0.957	0.4545	0.949	0.5283	0.955

Tabla A.8: Sorción de humedad a diferentes temperaturas de pretratamiento

60 °C		100 °C		120 °C		140 °C		160 °C	
$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$	$X_w$	$a_w$
0.07613	0.418	0.02133	0.235	0.016321	0.398	0.015787	0.209	0.03041	0.341
0.11792	0.733	0.04437	0.526	0.03726	0.566	0.04075	0.507	0.05035	0.584
0.2	0.901	0.0693	0.602	0.07698	0.627	0.0664	0.587	0.0821	0.638
0.3074	0.948	0.19794	0.882	0.16491	0.853	0.17241	0.841	0.16903	0.878
0.3096	0.949	0.2747	0.93	0.2464	0.93	0.2775	0.938	0.3313	0.943
0.3981	0.958	0.4579	0.947	0.4715	0.955	0.4803	0.952	0.4433	0.953
0.4993	0.958								
0.5391	0.954								
0.6115	0.959								
0.6796	0.953								

Tabla A.9: Sacarificación a diferentes ciclos de pretratamiento

<b>Ciclos</b>	<b>Sacarificación (%)</b>
0	13.299
1	39.28
2	43.05
3	46.08
4	46.27

Tabla A.10: Sacarificación a diferentes presiones de pretratamiento

<b>Presión (MPa)</b>	<b>Sacarificación (%)</b>
9.4	43.95
12.2	44.8
15.0	49.34

Tabla A.11: Sacarificación a diferentes tamaños de partícula

<b>Número de Malla</b>	<b>Sacarificación (%)</b>
40	31.63
50	44.25
60	52.48

Tabla A.12: Sacarificación a diferentes cosolventes de pretratamiento

<b>agua/bagazo</b>	<b>Sacarificación (%)</b>	<b>LI/bagazo</b>	<b>Sacarificación (%)</b>
0	36.1	0	37.88
0.5	40.2	0.1022	44.7
1	44.8	0.242	49.53
2	47.24	0.5135	26

Tabla A.13: Sacarificación a diferentes tiempos de residencia

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Sacarificación (%)</b>	
	<b>Sin LI</b>	<b>Con LI</b>
0	49.93	40.99
0.5	49.93	49.53
1	49.93	51.97
3	46.29	57.28
6	40.68	53.82

Tabla A.14: Sacarificación a diferentes temperaturas de pretratamiento

<b>Seco</b>		<b>Húmedo</b>		<b>Empapado</b>		<b>Con LI</b>	
<b>T (°C)</b>	<b>Sac (%)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Sac (%)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Sac (%)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Sac (%)</b>
102	20.54	80	17.729	86	45.39	85	34.7
123	34.38	122	44.8	123	48.23	121	49.53
144	39.5	167	51.64	163	53.4	160	56.17
165	52.95	178	37.88	183	37.29		
182	34.68						

Tabla A.15: Explosiones con enzima a diferentes temperaturas

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Sacarificación (%)</b>
40	58.48
50	30.49
60	3.977
80	0.3487

Tabla A.16: Operaciones en condiciones óptimas

<b>Tipo de Operación</b>	<b>Sacarificación (%)</b>		
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
Pretratamiento (P)	59.39	48.68	52.38
Explosión con Enzima (EE)	47.95	32.75	49.52
P-EE	62.09	52.05	42.12