



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

***ACONDICIONAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO  
PREVIO A SU EXTRUSIÓN/SACARIFICACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ARMANDO NAVARRO CID DEL PRADO**

TUTOR

**DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

MÉXICO, CDMX, FEBRERO 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ACONDICIONAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS CON CO<sub>2</sub>  
SUPERCRÍTICO PREVIO A SU EXTRUSIÓN/SACARIFICACIÓN PARA LA  
OBTENCIÓN DE BIOETANOL**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. ARMANDO NAVARRO CID DEL PRADO**

**DR EDUARDO BÁRZANA GARCÍA  
FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



Ciudad de México, febrero del 2022

## **AGRADECIMIENTOS OFICIALES**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mi carrera profesional en sus aulas e instalaciones. Es para mi un orgullo ser egresado de una de las mejores universidades de México y el mundo.**

**Al Dr Eduardo Bárzana García por la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, la guía y las pautas para la culminación de este trabajo de investigación.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para estudios de Doctorado con número 603689.**

**A la Dra Tatiana Klimova del Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química UNAM por los diligentes estudios de porosimetría del bagazo de agave.**

**Al Comité Tutorial: Dr Jose Gracia Fadrique y Dr Alberto Tecante Coronel, por su guía, consejos y aportaciones para la realización de este trabajo de investigación.**

**Al Jurado por el tiempo para la revisión y sugerencias para la mejora del trabajo escrito.**

**Al personal de la USAII, UNAM por los estudios de Difracción de Rayos X, Análisis Térmico, Espectroscopía de Infrarrojo y Microscopía Electrónica de Barrido.**

# DEDICATORIA

A mi esposa **Brenda**, a mi hijo **Paulo**,  
a mamá y papá y a mi sobrino **Bruno**.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi esposa Brenda, por el apoyo y amor incondicional a pesar de las adversidades durante el tiempo que duro esta etapa. Gracias por las porras cuando más se necesitaban. Brenda, este logro también forma parte de tu esfuerzo de cada día como mamá, mi pareja y profesional. ¡Te amo!**

**A mi hijo Paulo por darle la parte inocente y divertida a esta etapa. Pequeño, que este logro sirva de ejemplo de que todo lo que te propongas se puede conseguir. Nunca dejes tus sueños.**

**A mi mamá y papá, por el estar al pendiente para terminar este ciclo. Nunca me han dejado de apoyar en cada paso de mi carrera profesional. Ustedes son mi mayor ejemplo en la vida.**

**A mi sobrino Bruno, por los ratos de juegos y videojuegos que aligeran la carga adulta. Bruno, en tí y en Paulo veo todas las cualidades que se necesitan para que alcancen sus sueños. Si yo pude, ustedes también, nunca lo olvides.**

**A mi hermano Rodrigo y mi cuñada Ana, como parte mi familia y de la familia de Químicos también son fuente de inspiración para ser un mejor Químico.**

**A mi suegra Paty, por la paciencia y tiempo para ayudar a cuidar a Paulo cuando este trabajo lo necesitaba. En esta ayuda también se incluyen los residentes de Molina.**

**A mi guía para la realización de mi Doctorado Dra Carmina Montiel, gracias por toda la ayuda, consejos y regaños, eres parte importante de este trabajo.**

**A mis amigos de vida: Nayeli, Paz, Fer, Iván, Alejandro Reyes y Alejandro Vaca, Aidée y Magali por estar cerca en la parte más difícil de este trabajo.**

**A los del laboratorio 314 que estuvieron durante mi camino por ahí, hicieron más ameno el viaje: Irwin, Edna, Alejandra, Miryam, Frederick, Gabs, Alam, Ángelito Pimentel, Isa, John, Sam, Nataly, Belen, Chamol, Mariana, Naby, Cris, Jesús, Miguel Ángel y Carmen.**

## **Jurado**

<b>Presidente</b>	Dra. Laura Patricia Martínez Padilla
<b>Vocal</b>	Dr. Jesús Gracia Fadrique
<b>Vocal</b>	Dr. Rodolfo Zanella Specia
<b>Vocal</b>	Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo
<b>Secretario</b>	Dr. José Federico del Río Portilla

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 314 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.

El trabajo realizado se presentó en la modalidad de cartel en XV Reunión Nacional de la Red Mexicana de Bioenergía con el trabajo “Pretratamiento de bagazo de agave azul con CO<sub>2</sub> supercrítico previo a su sacarificación para la obtención de bioetanol”. Morelia, Michoacana. 2019.

El trabajo realizado fue publicado en:

Navarro, A., Montiel, C., Gracia-Fadrique, J. Tecante, A., Bárzana, E. Supercritical carbon dioxide “explosion” on blue agave bagasse to enhance enzymatic digestibility. *Biomass Conv. Bioref.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01557-z>

## Resumen

El uso de la biomasa lignocelulósica para la obtención de etanol de la lignocelulosa lleva una etapa determinante denominado pretratamiento, debido a su resistencia a la digestión enzimática de la celulosa y la hemicelulosa presente, previo a la posterior fermentación de los azúcares resultantes. El pretratamiento utilizado para la biomasa lignocelulósica debe mejorar la accesibilidad para las enzimas hidrolíticas, aumentar el área superficial del material y disminuir el contenido de lignina, sin pérdidas de los polímeros después del tratamiento.

El CO<sub>2</sub> en su estado supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) se evaluó en el presente trabajo como pretratamiento del bagazo de agave para obtener el máximo rendimiento de azúcares reductores después de realizar la hidrólisis enzimática. Durante el pretratamiento se evaluaron las variables operativas presión y temperatura, junto con el tiempo del pretratamiento. La mejor condición fue establecida con base en el rendimiento de azúcares reductores. Adicionalmente, se modificó la actividad de agua ( $a_w$ ) del bagazo de agave bajo la hipótesis que la hidratación del CO<sub>2</sub> podría producir ácido carbónico, ayudando a la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa.

Después del pretratamiento e hidrólisis enzimática del bagazo se obtuvieron incrementos en los rendimientos de azúcares reductores hasta de un 40% de aumento comparado con el del bagazo sin ningún tratamiento. Las variables operacionales que dieron lugar a este incremento minimizaron los tiempos del pretratamiento, a alta temperatura y presión asegurando el efecto CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico con valores bajos de actividad de agua ( $a_w$ ). El valor de  $a_w$  resultó ser una importante variable por su efecto en la promoción (o inhibición) del contacto enzima (celulasa) y sustrato (celulosa).

El incremento del rendimiento de azúcares reductores se correlacionó mediante análisis estructural del bagazo pretratado y sin pretratamiento con espectroscopía de infrarrojo, análisis termogravimétricos, de dispersión de rayos X, microscopía electrónica de barrido y estudios de porosimetría con nitrógeno. De esta manera, se determinó que el pretratamiento con CO<sub>2</sub>, cambia principalmente la composición química mediante modificación de la lignina y la estructura morfológica de la superficie de la matriz lignocelulósica, lo que deriva en la mejora de la digestibilidad enzimática.



# Índice General

1. Introducción .....	10
2. Antecedentes.....	12
2.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. BAGAZO DE AGAVE OPORTUNIDADES EN BIOCOMBUSTIBLES Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO .....	12
2.2 BAGAZO DE AGAVE. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL .....	13
2.3 PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	17
2.3.1 TRANSFORMACIÓN DE BIOMASA A BIOETANOL Y PRODUCTOS DE VALOR AGREGADO .....	17
2.3.2 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS.....	18
2.3.3 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS .....	19
2.3.4 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS.....	21
2.3.5 PRETRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS.....	21
2.4 DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO (CO <sub>2</sub> -SC) EN BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	23
2.5 EFECTO DE LA HUMEDAD EN MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS CON CO <sub>2</sub> -SC.....	26
2.6 CO <sub>2</sub> -SC COMBINACIÓN CON OTROS PRETRATAMIENTOS.....	30
3 Hipótesis y Objetivos .....	32
3.1 HIPÓTESIS .....	32
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	32
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
4 Materiales y Métodos .....	33
4.1 PRETRATAMIENTO DEL BAGAZO DE AGAVE. PROCEDIMIENTO GENERAL.....	33
4.2 PRETRATAMIENTO DEL BAGAZO DE AGAVE. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA (A <sub>w</sub> ).....	34
4.3 HIDRÓLISIS DEL BAGAZO PRETRATADO .....	35
4.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES. MÉTODO DNS. ....	35
4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE FURANOS .....	36
4.6 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CRISTALINIDAD .....	36
4.7 DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	37
4.8 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO .....	37
4.9 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO DIFERENCIAL .....	37
4.10 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	37
4.11 POROSIMETRÍA ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE NITRÓGENO. ....	38
5. Resultados y Discusión .....	38

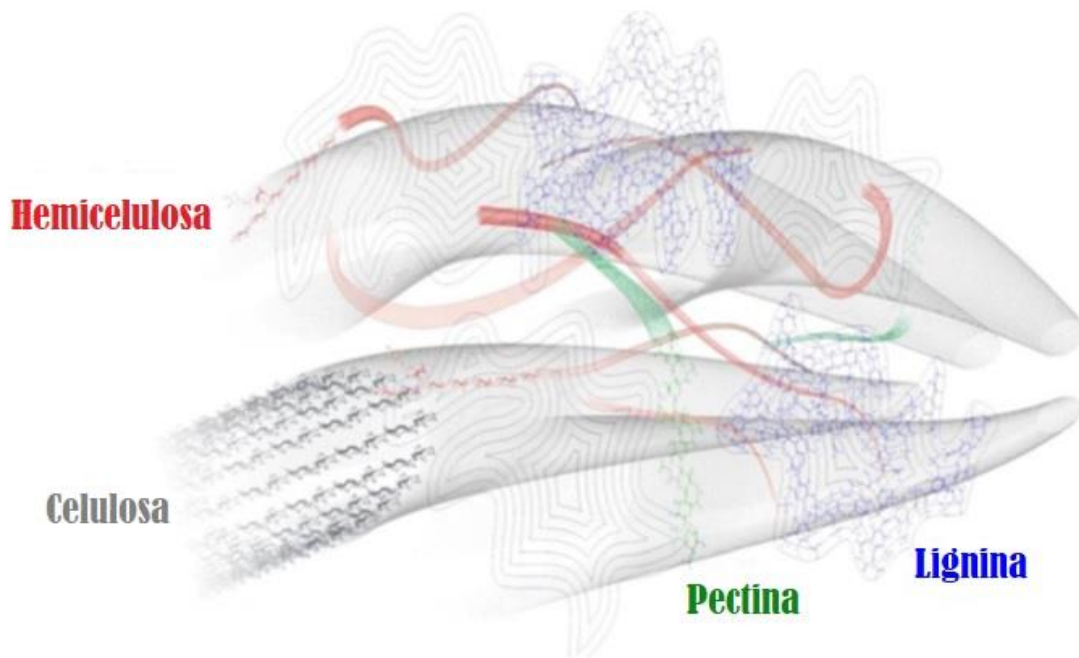
5.1	EFFECTO DEL TIEMPO DE RESIDENCIA .....	38
5.2	EFFECTO DE LA PRESIÓN.....	39
5.3	EFFECTO DE LA TEMPERATURA.....	41
5.4	EFFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA ( $A_w$ ).....	43
5.5	CONCENTRACIÓN RELATIVA DE FURANOS .....	45
5.6	CARACTERIZACIÓN DE BAGAZO SIN PRETRATAMIENTO Y BAGAZOS PRETRATADOS. ....	47
5.6.1	DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	47
5.6.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR).....	49
5.6.3	ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO DIFERENCIAL .....	51
5.6.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	53
5.6.5	POROSIMETRÍA ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE NITRÓGENO .....	54
6.	Conclusiones .....	56
7.	Referencias .....	57

# 1. Introducción

El alto consumo actual de energía a nivel global se basa mayoritariamente en la obtención de combustibles fósiles, lo que conlleva una alarmante emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera. Estas emisiones se identifican como la causa principal del cambio climático al que está sometida la humanidad entera. Como resultado, en las últimas dos décadas se ha intensificado la búsqueda de alternativas denominadas “verdes” para solventar esta problemática. Dentro de las tecnologías para generar energías renovables se encuentra el bioetanol generado por procesos fermentativos a partir de materia orgánica. En un principio los procesos se basaban en el empleo de azúcar de caña o almidón de cereales o tubérculos, lo que en forma genérica se conoce como bioetanol de 1ª generación. Sin embargo, dado que estas materias primas compiten o están orientados a la alimentación, se ha puesto un gran énfasis en aprovechar residuos y subproductos de bajo valor en la cadena alimenticia que resultan de la actividad agroindustrial, como pajas, rastrojos o residuos industriales de origen biológico. Estos materiales agroindustriales son de naturaleza lignocelulósica y son fuente del bioetanol de 2ª generación. Algunos ejemplos van desde las materias primas sin procesamiento a residuos de otros procesos industriales, como bagazo de caña de azúcar, residuos agrícolas de maíz arroz, trigo, cebada, recursos maderables de aserraderos, materia herbácea diversa, etc.[1]

La biomasa lignocelulósica está compuesta por redes poliméricas complejas (Figura 1) de lignina (20-30%), hemicelulosa (20-30%) y celulosa (40-50%) que se encuentran distribuidas en la pared celular. En principio las dos últimas pueden ser convertidos en azúcares fermentables o reductores.[1]

El proceso de conversión de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa se basa en su hidrólisis hasta los monómeros correspondientes. La hidrólisis se puede conducir con ácidos inorgánicos (o bases), pero pueden generarse otros componentes que llegan a inhibir la posterior fermentación de los azúcares a etanol.



**Figura 1.** Estructura lignocelulósica, modificado de Henrique, 2015.[1]

Pese a los beneficios mencionados, la eficiencia de las enzimas al interior de la matriz lignocelulósica está determinada por el área superficial y el tamaño de poro de dicha matriz. En condiciones adecuadas, las enzimas celulasas podrán entrar en contacto con la celulosa para su hidrólisis y causando con ello la desagregación del complejo lignina-hemicelulosa. El resultado es una disminución en la cristalinidad de la celulosa lo que favorece su proceso hidrolítico hasta glucosa.[2]

En resumen, la hidrólisis enzimática está limitada por las características del material lignocelulósico como son: la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, el área superficial disponible, la porosidad y el contenido de lignina.[3] Para alcanzar un proceso eficiente, los factores limitantes deben ser modificados para favorecer un aumento en la digestibilidad enzimática. Por ello es necesario iniciar con una etapa preparativa denominada “proceso de pretratamiento”.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Biomasa lignocelulósica. Bagazo de agave oportunidades en biocombustibles y productos de valor agregado

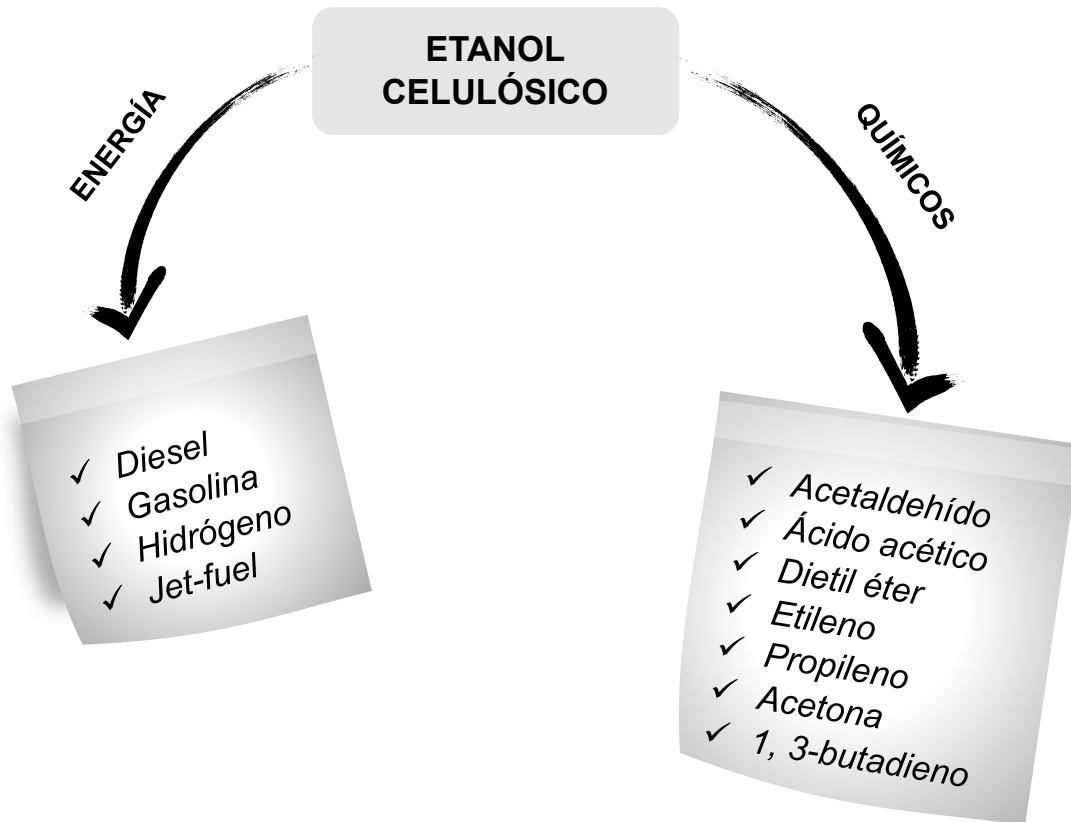
El uso de la biomasa lignocelulósica se hace presente en las últimas décadas derivado de los problemas de su uso como son: el cambio climático debido a la emisión de gases invernadero, la pérdida de biodiversidad, la licuefacción de los glaciares y el aumento de los niveles derivados del uso de combustibles fósiles que son la fuente primaria de energía para los procesos industriales.[4,5] La actual situación climática, la demanda de energía y la disminución de combustibles fósiles para satisfacer los requerimientos energéticos han resultado en la búsqueda de alternativas renovables, de bajo impacto ambiental y altamente disponibles. De esta manera, el bioetanol ha surgido como una alternativa debido a que este puede ser obtenido de la biomasa lignocelulósica.[6]

La biomasa renovable (por la actividad fotosintética de los vegetales) representa la fuente de materia orgánica más abundante en la Tierra, con 180 mil millones de toneladas generados cada año. Como se comentó, la preferencia por razones éticas es emplear la biomasa lignocelulósica de 2ª generación para producir biocombustibles. Las fuentes de biomasa lignocelulósica aprovechable que se generan anualmente ascienden a 3.5 mil millones de toneladas.[5,7]

El bioetanol como combustible presenta varias ventajas comparadas con los combustibles fósiles 1) puede ser extraído de la abundante biomasa, 2) se consideran sustentables debido a su fácil biodegradabilidad 3) su combustión está basada en el ciclo del bióxido de carbono 4) se considera más amigable con el medio ambiente. La Figura 2, muestra los diferentes combustibles propuestos a partir del etanol obtenido de la lignocelulosa. Además, este puede ser fuente para la producción de precursores e intermediarios químicos provenientes de fuentes renovables.[7,8]

Como alternativa, la hidrólisis enzimática con celulasas o cócteles enzimáticos con hemicelulasas ha ganado atención debido a que pueden utilizarse condiciones suaves de operación y costos razonables. Su mayor ventaja es la alta especificidad y un alto rendimiento

de conversión. Con este incentivo, diversas empresas fabricantes de enzimas desarrollan productos con mejoras constantes en estabilidad, selectividad y menores costos.



**Figura 2.** Propuesta de combustibles y derivados químicos a partir de etanol celulósico,. Kumar, 2016.[7]

## 2.2 Bagazo de agave. Biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol

En México, uno de los residuos generados dentro de la industria alimentaria es el bagazo de agave proveniente de la producción de tequila. Este residuo es comúnmente utilizado como fertilizante del mismo suelo donde crece y cosecha el agave o quemado para la generación de energía (eléctrica, térmica).[9]

El bagazo de agave es generado después de que las cabezas (piñas) de agave son cortadas, molidas y extraídas con agua para la obtención del polisacárido (i.e. fructanos) del monómero fermentable principal (fructosa). A partir de la denominación de origen del tequila, obtenido de *Agave tequilana* Weber azul, se ha presentado una creciente demanda de tequila en nuestro país y para exportación, resultando en un aumento notable de bagazo de agave (352,200 toneladas métricas/ año).[10] Lo anterior lleva a una problemática para su disposición,[11] haciendo necesaria la búsqueda de opciones tecnológicas para afrontar esta situación.

Distintas investigaciones se han conducido en el uso de otras partes de la planta de agave con nula o poca utilidad durante el proceso de producción de tequila. Por ejemplo, Lñiguez et al.[12], evaluaron la utilidad del uso de la cabeza de agave y de las hojas remanes después de la cosecha del agave como producto de ingesta de ganado y fibras para paneles vulcanizados. Posteriormente, determinó el contenido de azúcares y potencial del uso de *Agave tequilana* Weber azul como materia prima para fabricación de papel, principalmente de las hojas. Encontraron que, en la materia húmeda, el contenido de azúcares reductores era de entre 3-9%; y en base seca esta aumentaba a aproximadamente 16% en fracciones que pueden servir para obtener productos de valor agregado, después de remover la “piña”.

También, para aprovechar el residuo de las hojas no utilizadas después de la cosecha se estudiaron dos tipos de agave: *Agave tequilana* y *Agave americana*,[13] se halló que estas contienen alrededor de 36-64% de azúcares solubles en agua con un incremento del 5% comparado con *Panicum virgatum*, de estos 4.6% (*A. tequilana*) y 14% (*A. americana*) corresponde a glucosa. En las fracciones insolubles en agua, los valores de glucosa se incrementan para el caso de *A. tequilana* en más del 10%, mientras que en *A. americana* se mantienen constantes. Después de la hidrólisis enzimática, se pueden obtener entre 35% y 40% de azúcares totales sin pretratamiento de las hojas de agave; no obstante, un pretratamiento es necesario para mejorar los rendimientos de azúcares fermentables.

**Tabla 1.** Biomasa lignocelulósica investigada para la obtención de etanol celulósico, Gaurav et al., 2017.[8]

<b>Biomasa Lignocelulósica</b>	<b>Contenido de holocelulosa (%)</b>
Bagazo de azúcar de caña	50-78
Rastrojo de maíz	50-70
Paja de trigo	50-80
Cascara de arroz	60
Residuos de plátano	50
Semillas de canola	50
Residuos maderables	80

Recientemente, se utilizó un pretratamiento con ácido diluido a diferentes condiciones para optimizar la recuperación de azúcares de hojas de *Agave tequilana*,[14] las cuales tienen un contenido mayor a 30% de celulosa disponible. Los rendimientos de azúcares simples liberados por la hidrólisis después de un pretratamiento alcanzaron un máximo teórico de 69% de glucosa y sin la generación de sustancias inhibitorias de la fermentación.

De la misma manera, un pretratamiento con ácido diluido se realizó para comparar varias especies de agave (planta entera) como materia prima para la producción de bioetanol.[15] Esta opción es complementaria al tratamiento puramente enzimático con el objetivo de mejorar la accesibilidad a hemicelulosa y celulosa. El contenido de carbohidratos totales se calculó en un porcentaje mayor de 50, del cual 50% o más es glucosa disponible, y se estima un 75% de eficiencia para la conversión glucosa-etanol con el pretratamiento, disminuyendo este valor si existe la formación de productos inhibidores durante el pretratamiento.

Otras especies de agave se han sometido a pretratamientos, particularmente el uso de NaOH combinado con pretratamiento de vapor para bagazo de *Agave atrovirens*. [16] Después



de la hidrólisis enzimática, se alcanzó entre 36%-58% de azúcares reductores, valor dos veces mayor al encontrado para bagazo de caña bajo las mismas condiciones, y superior al alcanzado cuando se realiza la hidrólisis ácida a la muestra control.

Por su parte, distintas investigaciones se han realizado para aprovechar el gran potencial del bagazo de agave *A. tequilana* Weber azul generado en las plantas productoras de tequila a partir de la denominada piña de agave que corresponde al 54% del peso total de la planta de agave y que es llevada a planta para su procesamiento por cocción. [12] Si se pretende obtener del bagazo productos de valor agregado o biocombustibles. En promedio el bagazo contiene 43% de celulosa y bajos contenidos de hemicelulosa y lignina, 19% y 15%, respectivamente.[10]

Varios pretratamientos se han utilizado para mejorar la recuperación de azúcares del bagazo, Luna et al.[17] observaron que la composición de celulosa se incrementó cerca de un 20% comparado con el bagazo sin pretratar; composición análoga a la encontrada en el bagazo de caña. Durante la hidrólisis enzimática se determinó una recuperación de azúcares fermentables del 34%.

Caspeta et al. [18] utilizaron el enfoque de organosolvatación con etanol, denominado Etanosolv, y encontró que el porcentaje de deslignificación se incrementó de 21 a 70 con concentraciones de etanol del 50% con un aumento directo en el porcentaje de celulosa, alcanzando 80 en sólidos. La conversión de celulosa a glucosa superó valores de 85% después de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, se observaron menores porcentajes de hemicelulosa recuperada lo que puede reflejar un aumento en la generación de los productos de inhibición, predominantemente hidroximetil-furfural (HMF) similar a los observados en el pretratamiento con ácido diluido.

Otro enfoque para tratar bagazo de agave ha sido el uso de sales iónicas denominadas Líquidos Iónicos (LI),[19] por el cual los contenidos de azúcares totales aumentaron en cerca de 20% y un notable porcentaje de deslignificación. La conversión de azúcares reductores también se incrementó en un 183% comparado con muestras sin tratar después de la hidrólisis, un porcentaje mayor al encontrado en *Panicum virgatum*. Pérez-Pimienta et al.[20] también compararon tres pretratamientos: LI, hidrotérmico (autohidrólisis) y “explosión de amoníaco”.

En el caso de la explosión de amoníaco se observó la degradación inexistente de los azúcares donde más del 50% de hemicelulosa y lignina se recuperaron. Los mayores niveles de glucosa (98%) se determinaron durante el pretratamiento de autohidrólisis, además el uso de LI redujo la cantidad de lignina en un 25%.

Los rendimientos de conversión de azúcares se mejoraron para todos los pretratamientos comparados con muestras no pretratadas seguida de hidrólisis enzimática. En el caso del pretratamiento con LI, la conversión de celulosa a glucosa tuvo los porcentajes más altos (95%). Por su parte, durante la “explosión” con amoníaco se obtuvo la producción máxima total de monosacáridos (glucosa y xilosa), derivados de celulosa y hemicelulosa.

## **2.3 Pretratamiento de biomasa lignocelulósica**

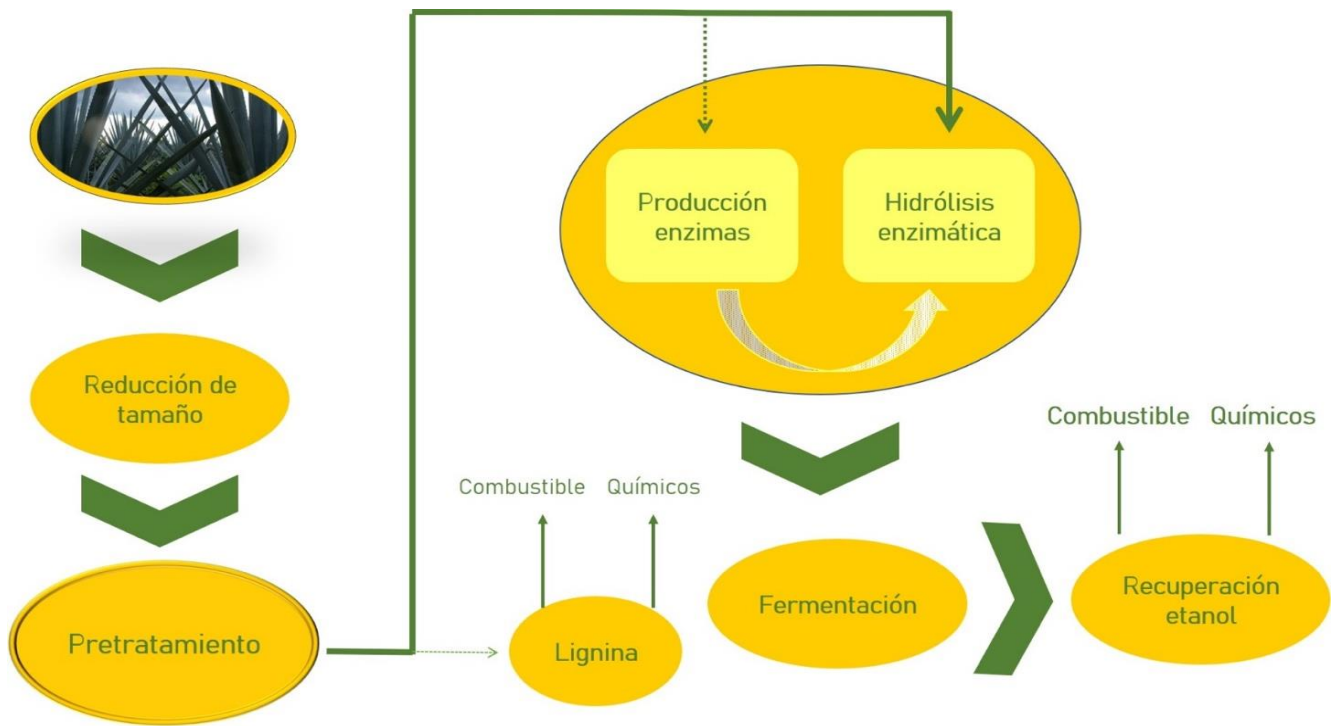
### **2.3.1 Transformación de biomasa a bioetanol y productos de valor agregado**

El proceso de conversión de la biomasa a etanol celulósico conlleva varias etapas que son: 1) selección de biomasa lignocelulósica, 2) reducción del tamaño de partícula, 3) pretratamiento, 4) producción/adquisición de enzimas, 5) hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados a azúcares fermentables, 6) fermentación de los azúcares a etanol y 7) recuperación por destilación y deshidratación del etanol (Figura 3).[7]

Durante el proceso de conversión algunas etapas pueden ser agregadas o eliminadas para minimizar costos y tiempos. Por ejemplo, después de la etapa de pretratamiento la lignina puede ser recuperada para la producción de químicos derivados de compuestos fenólicos de interés comercial. Así mismo, la etapa de producción de enzimas puede ser eliminada con el uso de enzimas comerciales disponibles (lo cual es generalmente el caso).

La ruta de conversión tiene 3 etapas esenciales que son: el pretratamiento, la hidrólisis enzimática y la fermentación. La etapa del pretratamiento es pieza clave debido al estado recalcitrante de la biomasa que refleja la resistencia a la degradación por ataque de patógenos, microorganismos o productos químicos. El pretratamiento acondiciona la biomasa lignocelulósica mejorando la accesibilidad enzimática y permitiendo la recuperación de los

azúcares fermentables. Además, esta etapa debe permitir la recuperación total de los sólidos y minimizar la producción de compuestos inhibitorios para la hidrólisis enzimática.



**Figura 3.** Proceso de conversión de la biomasa a etanol, Kumar, 2016.[7]

Los pretratamientos pueden clasificarse de acuerdo al mecanismo y uso de reactivos de acción como: físicos, químicos, biológicos y fisicoquímicos.[21]

### 2.3.2 Pretratamientos Físicos

Los pretratamientos físicos son métodos mecánicos como la pulverización, molienda y reducción del material a astilla, que tienen como consecuencia la disminución en el tamaño de partícula, el incrementando del área superficial y la modificación de la cristalinidad del material. Dentro de los pretratamientos físicos se ha utilizado la irradiación (gamma, haz de electrones o microondas)[21] como método previo a otro tratamientos. Debido a su alto costo y consumo de energía presenta la desventaja de uso a nivel comercial o en plantas piloto.

Por su parte, la extrusión es un método físico donde los materiales se someten a calor, mezcla y molienda mecánica, con la ventaja de poder operar en flujo continuo[22]. Se pueden agregar compuestos químicos o incluso cocteles enzimáticos al proceso (denominado bioextrusión).[23] Otras ventajas incluyen la capacidad de escalamiento, su operación continua y sin requerir otro acondicionamiento previo de la biomasa a utilizar.

### **2.3.3 Pretratamientos Químicos**

Durante el pretratamiento químico, el principal efecto en la biomasa es la remoción de lignina y hemicelulosa. Como consecuencia la celulosa pierde su estructura con lo que disminuye el grado de polimerización y cristalinidad. Los métodos más empleados son el pretratamiento ácido y el alcalino. El pretratamiento ácido hace uso de soluciones preferentemente diluidas, por ser menos corrosivas, no requiere recuperación del ácido y se llevan a cabo en condiciones de temperatura y presión atmosférica.[24] En el mecanismo el ácido hidroliza los enlaces glucosídicos de la hemicelulosa y en menor grado de la celulosa. Los ácidos minerales que se pueden utilizar son:  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $H_3PO_4$ ,  $HNO_3$ .

Uno de los problemas durante el pretratamiento es la producción de compuestos inhibidores de la hidrólisis enzimática como lo son furfural o hidroximetilfurfural (HMF)[3] ,observados en el pretratamiento con soluciones concentradas, lo cual incrementa en uno o dos etapas el proceso completo al ser requerida la neutralización del efluente o el lavado del material para retirar los compuestos de inhibición, incluso en condiciones de dilución.

El pretratamiento alcalino, como en el caso del pretratamiento ácido que remueve lignina y rompe los enlaces de la hemicelulosa, en condiciones menos drásticas (bajas temperaturas) produce sustratos con mayores rendimientos de azúcares, aparte de generar volumen en la biomasa para mejorar el acceso de las enzimas durante la hidrólisis.[2] Otra de las ventajas de este pretratamiento es la accesibilidad a los reactivos usados que disminuye el costo, en contraste con el pretratamiento ácido. Mayoritariamente se ocupa hidróxido de sodio, potasio y calcio.

No obstante, aunque se utilizan condiciones menos drásticas, se requiere mayor tiempo (horas o días) para obtener buenos resultados; así mismo se ha observado que la biomasa consume el reactivo incrementando la cantidad requerida de este y cambiando la concentración residual de álcali obtenida después del pretratamiento [3]; sumando al proceso una etapa de neutralización como en el caso del método con ácidos.

Por otra parte, el pretratamiento oxidativo hace uso de reactivos oxidantes que generan radicales libres que fragmentan y remueven una cantidad considerable de lignina, siendo un proceso de deslignificación de biomasa que no afecta la estructura de hemicelulosa y celulosa, [21,25] permitiendo de esta manera el acceso a la celulosa dentro de la matriz lignocelulósica. Los reactivos comúnmente utilizados son generalmente  $O_3$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $ClO_2$  y  $Cl_2$ . El inconveniente principal durante el pretratamiento son la poca selectividad de los reactivos por el sustrato generando una variedad de reacciones laterales no deseadas (sustitución electrofílica, acoplamiento oxidativo de éteres alquilo y arilo o de compuestos aromáticos) aumentando los posibles agentes inhibidores de la hidrólisis.[3] Aunado a esto el alto costo de los reactivos disminuye su uso, dejando su empleo sólo para la combinación con otros pretratamientos.[21]

De igual forma, el proceso de organosolvatación (organosolv) es usado principalmente para la deslignificación del material lignocelulósico, el cual incrementa el volumen del poro y aumenta el área superficial de este, obteniéndose sustratos con bajos contenidos de lignina, y como el pretratamiento oxidativo mejora la accesibilidad de las enzimas utilizadas.[21] En este proceso, la lignina puede ser recuperada para obtener compuestos derivados de esta.[22] El método se basa en el uso de mezclas de disolventes orgánicos con catalizadores inorgánicos ( $H_2SO_4$ ) en disoluciones acuosas.[24] Etanol, metanol, perácidos, ácidos orgánicos y acetona se utilizan para el proceso preferentemente el etanol y metanol son empleados debido a su relativo menor precio y recuperación más accesible. Sin embargo, la remoción del disolvente es necesaria para disminuir los efectos inhibitorios de estos durante la hidrólisis enzimática.[1]

Recientemente, el uso de líquidos iónicos (LI) para el tratamiento de residuos lignocelulósicos como acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, acetato de 1-butil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio[21,22,26] se utiliza debido a su carácter de disolventes “amigables” al medio ambiente, al tener valores inapreciables de presión de vapor y no ser

inflamables. El uso de LI permite la solubilización de lignina y carbohidratos de las biomasa y posterior recuperación, incrementando el valor agregado de los diferentes componentes de los materiales lignocelulósicos, además de que aumenta la digestibilidad enzimática como en el caso de otros pretratamientos.[1]

#### **2.3.4 Pretratamientos Biológicos**

Los pretratamientos biológicos se basan en el uso de microorganismos que producen enzimas degradantes de lignina y hemicelulosa de una manera selectiva[1]. De la misma manera el uso de otras enzimas se han probado para este fin como son lacasas y peroxidasas.[21] A pesar de ser una tecnología que no usa reactivos químicos y se lleva a cabo en condiciones suaves, su uso está limitado a la ingeniería de microorganismos o enzimas con las características necesarias para modificar o degradar la lignina, aunado a que el tiempo de pretratamiento puede ser de semanas dificultando su uso comercial.[24]

#### **2.3.5 Pretratamientos Fisicoquímicos**

Los pretratamientos fisicoquímicos se han evaluado principalmente para la modificación estructural del material lignocelulósico, buscando con ello incrementar el área superficial del material, así como remover la lignina y la hemicelulosa. Para ello se usan comúnmente temperaturas y presiones altas. Uno de los mecanismos observados dentro de los pretratamientos fisicoquímicos es el denominado efecto de “explosión”. Durante la “explosión” un gas comprimido a presiones altas es liberado rápidamente hasta presión atmosférica. La liberación del gas genera un gradiente de presión que colapsa por un alto flujo del gas la estructura principal del material. El resultado final es una ruptura y apertura de los espacios que mantienen a la estructura cerrada y compacta el cual es el efecto primordial observado dentro de estos pretratamientos.

Uno de los pretratamientos más utilizados es la “explosión de vapor de agua”. Se ha propuesto que, además del daño mecánico por la expansión del gas, el efecto destructivo en la estructura de la biomasa se debe a la producción de ácido acético formado por la liberación de grupos acetilo asociados a la hemicelulosa, y donde el agua actúa como un catalizador ácido en estas condiciones.[1,22] Otras propuestas para mejorar la digestibilidad enzimática del material incluyen el impregnado de la biomasa con reactivos como ácido sulfúrico o dióxido de azufre.[21]

De igual forma, como en el caso de “explosión de vapor” que utiliza las características únicas del agua, los pretratamientos denominados hidrotérmicos como agua líquida caliente, pretratamiento acuoso, hidro-termólisis o pre hidrólisis acuosa[1], también trabajan con agua a altas temperaturas y altas presiones cerca del punto crítico del agua (estado crítico). En estas condiciones la lignina y la hemicelulosa se degradan antes que la celulosa, permitiendo el incremento en el área superficial y la porosidad del material; como en muchos procesos mencionados el uso de catalizadores ácidos o alcalinos puede incrementar los resultados obtenidos.[21]

Dentro de los pretratamientos que aprovechan el efecto de “explosión de gases” se encuentra el amoniaco, donde la biomasa es expuesta a amoniaco líquido. El material lignocelulósico se hincha cambiando primordialmente la cristalinidad de este.[21] Así mismo rompe muchos de los enlaces entre los carbohidratos y la lignina. Adicionalmente existe poca solubilidad de sólidos, dando como resultado pérdidas mínimas de lignina y hemicelulosa, resultando en altos rendimientos de azúcares[1,24] y una limitada producción de materiales tóxicos. Otro aspecto importante de la “explosión de amoniaco” es que el proceso puede ser ajustado para llevar a cabo la hidrólisis enzimática o fermentación sin previo lavado o remoción de inhibidores.

A pesar de las múltiples ventajas que ofrecen los pretratamientos fisicoquímicos previamente mencionados como el bajo impacto en el medio ambiente al no ocupar reactivos peligrosos como ácidos, bases y perácidos; como lo es utilizar agua (“explosión de vapor”, pretratamientos hidrotérmicos) o que se reciclan después del pretratamiento (“explosión de amoniaco”). Además de obtener rendimientos de azúcares cuantitativos y mejorar la digestibilidad enzimática con poca o nula formación de productos de inhibición. Estos

pretratamientos tienen el inconveniente de usar equipo especializado para generar las condiciones de trabajo (pretratamientos hidrotérmicos) [2] o procesos de corrosión debido a las condiciones ácidas generadas durante el pretratamiento (“explosión de vapor”) o elevado costo del reactivo (“explosión de amoníaco”)[21], por lo que se requiere un método de recuperación y reciclaje en el proceso, para reducir costos. Otra desventaja, es el riesgo alto de producción de inhibidores por el uso de catalizadores ácidos (“explosión de vapor”).[2] Además del reducido intervalo de biomasa que se pueden pretratar (“explosión de amoníaco”/ pretratamientos hidrotérmicos).[1]

## **2.4 Dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) en biomasa lignocelulósica**

El uso de dióxido de carbono supercrítico que se basa en el efecto de la “explosión de gases” es un pretratamiento que puede ser ventajoso con respecto al pretratamiento de la biomasa que utilizan ácidos, bases o algún pretratamiento, biológico o fisicoquímico mencionado anteriormente. Esta aseveración cobra validez porque permite: 1) El uso de condiciones suaves de presión y temperatura (Presión crítica= 73 bar, Temperatura crítica= 31.1 °C); 2) El desgaste del equipo por corrosión se reduce significativamente; 3) Evita el uso de catalizadores o agentes externos. En este sentido se ha demostrado que el CO<sub>2</sub> está altamente disponible, no es inflamable, ni corrosivo es un solvente barato, inclusive es posible su recuperación durante la fermentación de los azúcares obtenidos y no contamina los materiales tratados.[27] Todo lo anterior lo justifica como un desarrollo de tecnología sustentable para el pretratamiento de biomasa.

El pretratamiento con CO<sub>2</sub> como método funcional para la desestructuración/despolimerización de la biomasa, conlleva el estudio de las variables termodinámicas de Presión (P) y Temperatura (T) junto con otros parámetros asociados:[1,2] En el pretratamiento con CO<sub>2</sub> las variaciones de la P y T cambia la densidad del gas, modificando el efecto de “explosión” tanto en condiciones por debajo de la región supercrítica como en la región supercrítica del CO<sub>2</sub> (Figura 4).[28] De esta manera, una vez alcanzada las condiciones del pretratamiento, una disminución repentina de la presión (y las consecuente liberación del CO<sub>2</sub> en forma de gas) modifica el “efecto de la explosión” afectando la estructura

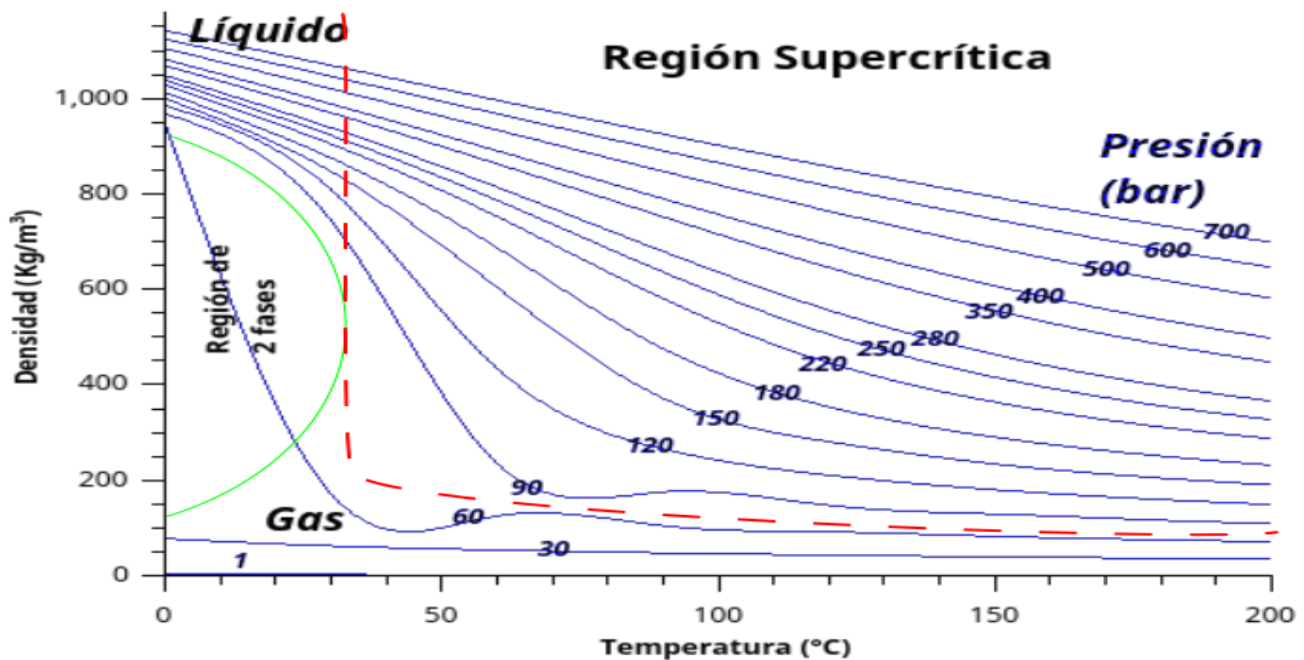


del material en lo que conoce como ruptura o “desestructuración” del material, mejorando la digestibilidad enzimática de los polímeros que lo componen (celulosa, hemicelulosa, lignina).[29]

De la misma manera, se evaluó su uso en condiciones supercríticas para la hidrólisis enzimática de celulosa donde se encontró que la presión es un factor predominante para favorecer la producción de glucosa.[30] Como ejemplo, se ha utilizado en la hidrólisis enzimática de fibras de algodón.[31] Stamenic et al.[32] también lo emplearon para demostrar que la extracción de aceites esenciales de varias plantas herbáceas puede mejorarse si se someten a lo que se denomina Extracción en Fluidos Supercríticos. En esta línea conceptual se ha ampliado el uso del CO<sub>2</sub> en el proceso de extrusión para la creación de biopolímeros en diferentes áreas de interés.[33] Lo resumido por Morais et al. [34] muestra las múltiples metodologías y tecnologías sobre el uso CO<sub>2</sub>-SC.

Las investigaciones en el pretratamiento con CO<sub>2</sub>-SC se han basado en desarrollar métodos que permitan mejorar y hacer más eficiente este tipo de tratamiento, no sólo dentro de un laboratorio de investigación, sino que pueda manejarse a nivel de una biorefinería. También se ha recurrido a la utilización del CO<sub>2</sub> en combinación con otros pretratamientos, sobre todo en condiciones en las que la biomasa tiene concentraciones significativas de humedad, buscando favorecer la hidrólisis de hemicelulosa con base en el equilibrio entre CO<sub>2</sub> y agua en condiciones supercrítica[35]. Un tema interesante es el tratamiento con CO<sub>2</sub>-SC con agua subcrítica para formar ácido carbónico *in situ* buscando con ello un efecto hidrolítico adicional.[36]

El desarrollo del uso de CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas ha sido ampliamente estudiado en una variedad de materiales lignocelulósicos, dando como resultado un nuevo enfoque en su uso como método de pretratamiento (Tabla 2). El primer estudio de las propiedades del CO<sub>2</sub> a altas presiones y temperaturas probó su uso como coadyuvante en el tratamiento de bagazo de caña y eucalipto. El objetivo era la producción de carbohidratos fermentables en un proceso que se denominó “explosión de CO<sub>2</sub>” de materiales lignocelulósicos.



**Figura 4.** Diagrama de fases de CO<sub>2</sub>. Densidad en función de la temperatura y presión, Bachu, 2003.[37]

Por otro lado, cuando se trató Avicel en condiciones subcríticas[35], el pretratamiento con CO<sub>2</sub> no mejoró la hidrólisis, en comparación con muestras no tratadas. Adicionalmente se observaron resultados negativos al usar otros gases (helio y nitrógeno) bajo las mismas condiciones. De esta manera, comprobaron que el pretratamiento con CO<sub>2</sub>-SC es un método efectivo para la mejora de los rendimientos de glucosa comparado con muestras sin tratar o pretratadas en condiciones subcríticas. Por el contrario, cuando se trataron materiales previamente procesados como papel obtenido de pulpa de celulosa no existe mejora significativa al tratar con CO<sub>2</sub>-SC debido al cambio estructural producido durante el tratamiento químico para la producción de la pulpa para papel. Para el bagazo de caña, al utilizar ácido diluido previo a su exposición con CO<sub>2</sub>-SC se incrementó el rendimiento de glucosa por la hidrólisis de la hemicelulosa, haciendo el material más poroso. Esta modificación mejoró la difusividad del gas, permitiendo su mayor penetración en la biomasa.

Gao et al.[38] estudiaron el pretratamiento de paja de arroz con CO<sub>2</sub>-SC para probar su efecto después de la hidrólisis enzimática, obteniendo mejoras de alrededor de 10% en rendimiento de glucosa en comparación con muestras no tratadas. Los autores sugieren que aumentos en la temperatura, presión y tiempo de duración del pretratamiento mejoran los resultados. Por otra parte, cuando compararon los valores de glucosa obtenidos en paja de arroz y Avicel bajo las mismas condiciones, observaron que en el caso de Avicel existía un porcentaje más alto de glucosa, sugiriendo que la paja de arroz tiene una estructura más compleja. Claramente la estructura lignocelulósica de los materiales es afectada de manera diferente por el pretratamiento con CO<sub>2</sub>.

## **2.5 Efecto de la humedad en materiales lignocelulósicos con CO<sub>2</sub>-SC**

Aunque el uso CO<sub>2</sub>-SC ha ganado atención para la desconstrucción de material lignocelulósico y se ha demostrado que bajo ciertos valores en las propiedades del sistema (temperatura, presión y tiempo de duración del pretratamiento) es posible mejorar los rendimientos de azúcares totales que resultan de la hidrólisis, por lo que algunos investigadores han evaluado el papel que puede jugar la humedad de la biomasa.

La humedad del material, ya sea como agua retenida o adicionada a la matriz lignocelulósica puede tener un beneficio ya que se ha propuesto que la hidratación del CO<sub>2</sub> resulta en la formación de ácido carbónico que tiene un efecto catalítico en la prehidrólisis de la hemicelulosa.[39,40] El grado de hidrólisis depende de la temperatura y presión del sistema, lo que resulta en un pH entre 4 y 5 durante el tratamiento.[41] Una vez liberado el gas la muestra semisólida alcanza un pH cercano a 7 por lo que no se requiere una etapa de neutralización como ocurre con los tratamientos basados en ácido o base. Es posible también que se lleve a cabo la ruptura de otros enlaces del tipo enlace de hidrógeno entre la lignina, la hemicelulosa y la celulosa.[42]

**Tabla 2.** Materiales lignocelulósicos utilizados en el pretratamiento con CO<sub>2</sub>-SC.

Material Lignocelulósico	Referencia
Avicel	[37, 39, 40]
Arroz	
▪ Paja	[28, 41]
Caña de azúcar	
▪ Bagazo	[29, 37, 39, 42-46]
Guayule	
▪ Bagazo	[47]
Maíz	
▪ Rastrojo	[30, 32, 38, 40, 48, 49]
▪ Mazorca/tallo	[28, 30, 50]
Materiales maderables	[51]
▪ <i>Cryptomeria japonica</i>	[46, 51]
▪ Especies de <i>Eucalyptus</i>	[52]
▪ <i>Pinus taeda</i>	[38, 52]
▪ Especies de <i>Populus</i>	[38, 52]
Mezcla de papel reciclado	[37]
Trigo	
▪ Paja	[46, 53]
Pastos	
▪ <i>Panicum virgatum</i>	[30, 40 48]
▪ <i>Andropogon gerardii</i>	[48]

Este enfoque demostró que es posible la hidrólisis de recursos maderables, lo que se ejemplificó al pretratar *Pinus taeda* y álamo (Especie de *Populus*) [43], observando los mismos efectos reportados por Alinia et al. y Luterbacher et al. para otros materiales lignocelulósicos.

Durante la investigación, encontraron que en condiciones de 73% m/v de humedad, 165 °C, ~300 bar y 30 min es posible obtener rendimientos teóricos de azúcares fermentables de 79.4% y 36.6% para álamo y *Pinus taeda*, respectivamente. No obstante, las diferencias en rendimientos son resultado de la presencia de grupos guayacol en la estructura de la lignina de *Pinus taeda* que son más difíciles de hidrolizar.

Alinia et al. [39] probaron CO<sub>2</sub>-SC combinado con pretratamiento de vapor y compararon el efecto de la humedad en muestras de rastrojo de trigo con una humedad 23% m/v a las mismas condiciones, el efecto de la humedad aumenta en más de 100% el rendimiento total de los azúcares. Asimismo, el incremento en la presión del sistema potencializa la obtención de mayores rendimientos. El mejor resultado se obtuvo cuando se realizó una combinación de pretratamientos en un proceso de dos etapas: 200 °C y 15 min (inyección de vapor) para la primera etapa y condiciones de 120 bar, 190 °C y 60 min (“explosión de CO<sub>2</sub>-SC”) para la segunda etapa.

El uso de porciones significativas de agua para obtener mejoras en los rendimientos de azúcares fermentables ha sido demostrado para el guayule (arbusto de desierto del que se obtiene látex hipo alergénico y resinas comerciales).[44] Cuando se trata el material con CO<sub>2</sub>-SC, a concentraciones de humedad entre 60-75% m/v y presiones cercanas a 280 bar, se observó que el efecto de la “explosión” del gas es determinante en el procesamiento. A estas condiciones se alcanzan valores de concentración de glucosa después de la hidrólisis enzimática por arriba de 70% y de azúcares reductores por el orden de 80%. Adicionalmente, se minimiza la pérdida de celulosa y hemicelulosa de los sólidos durante el pretratamiento.

En estudios posteriores, estos autores determinaron que las mejores condiciones para tratar el guayule con altos rendimientos de glucosa eran T= 175 °C, P= 260 bar, humedad= 60% y tiempo de duración del pretratamiento= 30 min. Sin embargo, a valores mayores de los óptimos encontrados, se pueden generar efectos adversos en las variables de respuesta (rendimientos de glucosa y pentosas). Se cuenta entonces con los parámetros que minimizan la degradación de azúcares, reducen la cristalinidad de la celulosa y aumentan el daño sobre la estructura de la biomasa para este material. Además, propusieron que existen dos mecanismos principales involucrados en el uso de CO<sub>2</sub>-SC: 1) la “explosión” física, que afecta la exposición de la celulosa y hemicelulosa para la hidrólisis enzimática, 2) efecto de la hidrólisis

química (producción de ácido carbónico), que rompe la estructura lignocelulósica de la biomasa.

El mismo resultado se observó en el incremento del rendimiento de glucosa cuando muestras de rastrojo de maíz y *Panicum virgatum*[45] se condicionaron a una humedad de 75% m/v comparado con aquellas deshidratadas y/o que no se trataban. Después del pretratamiento encontraron que la concentración de glucosa se duplicaba de acuerdo con estudios anteriores[35,43], teniendo una obtención máxima de glucosa de 30% para el rastrojo de maíz a T= 150 °C, P= 240 bar y tiempo del pretratamiento=1 h. Para el caso de *Panicum virgatum*, el máximo de glucosa se encontró en 15% mejorándose muy ligeramente el rendimiento entre 1% y 2% en comparación con muestras no tratadas. De mismo modo, como lo propusieron Kim et al.[43], las diferencias en rendimientos entre materiales están relacionados con la estructura de estos, ya que *Panicum virgatum* contiene más cantidad de xilanos y lignina, lo cual contribuye al estado recalcitrante de la biomasa afectando la hidrólisis enzimática.

Si bien cierta cantidad de agua en muestras pretratadas puede tener un beneficio en el rendimiento de glucosa u otros azúcares, no es claro si el agua tiene un efecto primordial en el pretratamiento comparado con el efecto que tiene la temperatura .[29,38–40,43,45,46] Liu et al.[28], estudiaron las variables de temperatura, presión, tiempo del pretratamiento y humedad, para evaluar su influencia en la hidrólisis enzimática de tallo y mazorca de maíz. El intervalo experimental evaluado fue de T= 80-160 °C, P= 50-200 bar, tiempo= 15-60 min y humedad= 0-75%. Se observó que la temperatura tiene un efecto primordial en el pretratamiento pues mejora la transferencia de masa, degrada la lignina y la hemicelulosa.

La humedad es la siguiente variable más importante porque permite la hidrólisis de la hemicelulosa y el hinchado (por hidratación de grupos internos) de la biomasa. Sin embargo, un exceso en la cantidad de agua puede reducir el rendimiento de azúcares, sugiriendo que a estas condiciones se puede dar un bloqueo parcial en la transferencia de masa del gas.

Finalmente, distintos autores han utilizado esta aproximación del uso de agua, pero en condiciones cercanas a su punto crítico, y el CO<sub>2</sub>-SC.[40,41,47] Los resultados permiten comprobar que la formación de ácido carbónico es un factor importante para el incremento en

los rendimientos de glucosa aunado a las ventajas descritas del estado supercrítico del CO<sub>2</sub>. La desventaja principal de esta metodología reside en las condiciones operacionales requeridas para obtener agua subcrítica.

## **2.6 CO<sub>2</sub>-SC combinación con otros pretratamientos**

Como se ha señalado, el CO<sub>2</sub>-SC ha presentado varias ventajas. También se ha evaluado su uso en combinación con otros métodos. Ejemplo: ultrasonido, líquidos iónicos, peróxido de hidrógeno, co-solventes e hidróxido de sodio para la mejora en la producción de azúcares reductores.

El uso complementario de ultrasonido ha sido uno de los métodos más utilizados junto con dióxido de carbono supercrítico. Por ejemplo, Benazzi et al.[48], realizaron el pretratamiento de bagazo de caña comparando el uso de CO<sub>2</sub>-SC solamente y el proceso de someter las muestras a ultrasonido seguido de CO<sub>2</sub>-SC. Las condiciones iniciales del CO<sub>2</sub> se establecieron en P= 250 bar, T= 80 °C, tiempo del pretratamiento= 120 min, humedad= 65%. Para el ultrasonido fueron 40 kHz y 30 °C por 8 h. A estas condiciones se encontró que con la combinación de metodologías. Se incrementó en un 16% los azúcares reductores obtenidos.

El uso de esta combinación también se probó en bagazo de caña sometiendo las muestras primero a CO<sub>2</sub>-SC seguido de ultrasonido en similares condiciones que Benazzi et al.[49] En este experimento se incrementó la humedad y la temperatura del pretratamiento con CO<sub>2</sub>, y se disminuyó el tiempo en el ultrasonido, alcanzando un aumento de 4% en el rendimiento de glucosa.

Por otro lado, durante la prueba de esta combinación en mazorca y tallo de maíz[28] en un proceso de dos etapas: 1) CO<sub>2</sub>-SC, 2) ultrasonido, es posible aumentar la obtención de azúcares totales en 25% (mazorca) y 15% (tallo) si se compara sólo con CO<sub>2</sub>-SC. Los materiales se sometieron a CO<sub>2</sub> supercrítico en condiciones de 200 bar, 170 °C, 30 min y en el ultrasonido a 20 kHz, 80 °C, 2-8 h.

En el mismo sentido, se ha reportado el uso de CO<sub>2</sub> acoplado con pretratamiento alcalino para bagazo de caña, observando una mejora de 20% en la obtención de glucosa. Por otro lado, Phan et al.[49], utilizaron CO<sub>2</sub>-SC junto con peróxido de hidrógeno alcalino para mejorar

la obtención de glucosa en bagazo de caña. Los resultados fueron muy promisorios al obtenerse rendimientos del 98% en condiciones análogas previamente discutidas para el CO<sub>2</sub> y concentraciones del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adicionalmente estos resultados superan en un 40% los obtenidos sólo con CO<sub>2</sub>-SC, ultrasonido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y combinación de CO<sub>2</sub>-SC-ultrasonido. Los mayores rendimientos son logrados después de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se descompone en radicales hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y radicales superóxidos (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) bajo condiciones alcalinas que degradan y oxidan la lignocelulosa, causando la mejor remoción de hemicelulosa y lignina, a la vez que disminuyen la cristalinidad en la celulosa.

Recientemente, se propuso el sistema de organosolvatación CO<sub>2</sub>-SC-etanol-acetato de imidazolio[46] para optimizar la deslignificación de bagazo de caña, como tecnología “verde”, al ser posible recuperar el líquido iónico. De esta manera, demostraron que se obtienen altos valores de deslignificación de la biomasa sin pérdida de carbohidratos significativa y recuperación casi total de los sólidos después del pretratamiento, lo cual deriva en sustratos con alto contenido de celulosa y con ello mejores rendimientos de glucosa después de hidrólisis enzimática.

En este sentido, en el presente trabajo se realizó el pretratamiento del bagazo de agave residuo agrícola generado por la industria tequilera con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico para la generación de productos de valor agregado a partir de la obtención de los azúcares disponibles mediante el estudio de las condiciones de temperatura y presión que resultan en una mejora de la digestibilidad enzimática. El agua disponible del bagazo de agave se estudió mediante el cambio de la actividad de agua, con el propósito de analizar su influencia en la hidrólisis de la matriz lignocelulósica durante el pretratamiento con CO<sub>2</sub> y evaluar la mejora del rendimiento de los azúcares obtenidos después de la reacción enzimática.



### **3 Hipótesis y Objetivos**

#### **3.1 Hipótesis**

La digestibilidad enzimática de los polisacáridos presentes en el bagazo de agave se incrementará con un pretratamiento de CO<sub>2</sub> supercrítico en condiciones óptimas de tiempo de residencia, presión, temperatura y actividad de agua.

#### **3.2 Objetivo General**

Determinar el efecto del pretratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico para la mejora de la digestibilidad enzimática del bagazo de agave previo a la obtención de bioetanol.

#### **3.3 Objetivos particulares**

- ◆ Determinar las variables operativas que resultan en el mayor rendimiento de azúcares reductores después de la hidrólisis enzimática de bagazo pretratado.
  - a) Tiempo de residencia
  - b) Presión
  - c) Temperatura
- ◆ Determinar el papel de la interacción de CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O en los tres polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina) mediante la modificación de la actividad de agua del bagazo de agave.
- ◆ Evaluar el nivel de desestructuración de la matriz lignocelulósica después del pretratamiento mediante diversas técnicas analíticas.

## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Pretratamiento del bagazo de agave. Procedimiento general

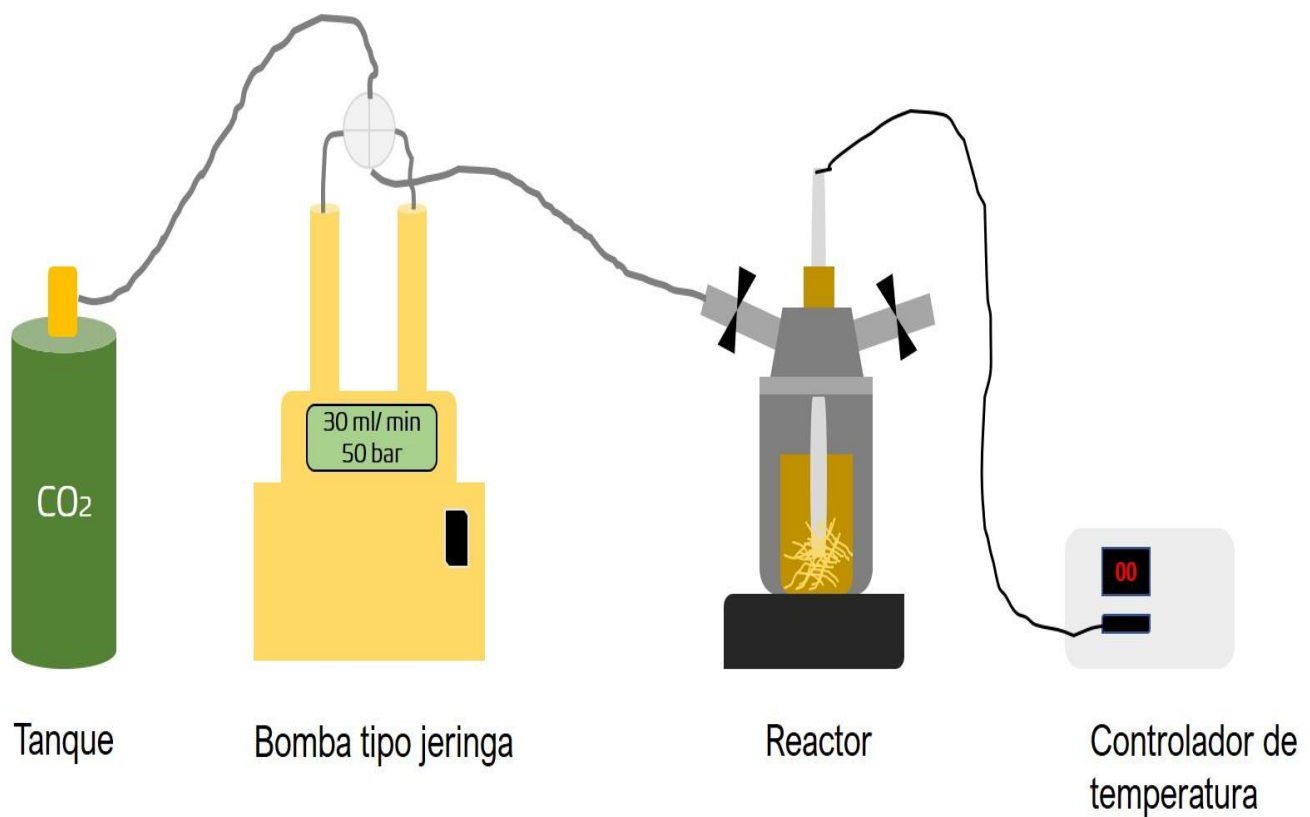
El bagazo de agave utilizado fue amablemente donado por Tequila Patrón en Atotonilco, Jalisco. Antes de su uso el bagazo se secó al sol durante 2 semanas, tamizado sobre una malla N° 10 de plástico para colectar la parte fibrosa, que tiene el mayor contenido de celulosa y hemicelulosa disponibles.[50] El bagazo colectado se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso en el pretratamiento.

Para el pretratamiento, se colocaron 5 g de material previamente tamizado sobre una malla N° 20 (contenido de humedad= 6.5%) en un reactor de acero inoxidable de 100 mL.

El gas se introdujo en el reactor a través de una válvula mediante una bomba tipo jeringa conectada a un cilindro de CO<sub>2</sub> (Praxair, México) con un flujo constante de 30 mL/min hasta alcanzar una presión interna de 50 bar. La temperatura se midió y ajustó mediante un termopar y una chaqueta de calentamiento conectada a un controlador digital (Figura 5).

Con el fin de alcanzar el estado supercrítico o subcrítico del CO<sub>2</sub>, se ajustó la temperatura del reactor hasta tener una temperatura 10 °C menor a la de trabajo, con lo cual se introdujo un volumen adicional de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la presión final. Posteriormente, se calentó hasta la temperatura de trabajo. Una vez que se alcanzó el estado deseado, el sistema se mantuvo el tiempo previamente definido.

Finalmente, una vez terminado el tiempo de residencia se liberó el CO<sub>2</sub> de manera repentina hasta la presión ambiente, con el fin de obtener el efecto de “explosión de CO<sub>2</sub>”. Las pruebas se realizaron por duplicado y las muestras tratadas se almacenaron en refrigeración hasta su posterior uso. Los datos del rendimiento de azúcares reductores se obtuvieron de la media de dos experimentos ± desviación estándar.



**Figura 5.** Esquema del equipo utilizado para el pretratamiento del bagazo de agave.

#### 4.2 Pretratamiento del bagazo de agave. Efecto de la actividad de agua ( $a_w$ )

El pretratamiento donde se ajustó la actividad de agua (como una medida controlada de la humedad) se llevó a cabo de acuerdo con las variables operacionales de la Tabla 3.

Para alcanzar el equilibrio se colocaron 5 g de material dentro del reactor; el reactor abierto se introdujo en un desecador que contenía la solución salina saturada correspondiente al  $a_w$  preseleccionada, se cerró el desecador y se dejó incubando durante una noche previa al pretratamiento con  $\text{CO}_2$ .

La metodología realizada para el pretratamiento se siguió de acuerdo con el apartado anterior para obtener la temperatura y presión descritas. El bagazo almacenado sin ajuste de humedad resultó en un  $a_w$  nominal= 0.340, valor que fue determinado con un medidor de actividad de agua (Novosina Swift, Cole-Parmer, EU) a 24 °C.

**Tabla 3.** Condiciones operacionales durante el tratamiento del bagazo de agave con CO<sub>2</sub> a diferentes *a<sub>w</sub>*.

<i>a<sub>w</sub></i>	Temperatura	Presión	Tiempo
0.082 (KOH)			
0.112 (LiCl)			
0.340 (valor nominal)			
0.529 (Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )			
0.753 (NaCl)	100 °C	280 bar	10 min
0.973 (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )			

### 4.3 Hidrólisis del bagazo pretratado

El bagazo tratado (0.25 g) para cada una de las condiciones operacionales y bagazo sin tratar como control se colocaron en tubos de ensaye de 15 mL. Posteriormente se adicionó 5 mL de buffer de acetatos 50 mM, pH 5 y 40 µL de celulasa Cellic Ctec 2 (Novozymes) por triplicado y se incubaron en agitador orbital a 50 °C y 200 rpm por 72 h. Finalmente, se tomó una alícuota de 1.5 mL de cada muestra y se congelaron hasta posterior análisis.

### 4.4 Determinación de azúcares reductores. Método DNS.

En un tubo de ensaye de 10 mL, 50 µL de los hidrolizados se adicionaron junto con 250 µL buffer de acetatos 50 mM pH 5 y 0.6 mL de DNS. Posteriormente, los tubos se calentaron a una temperatura de 90 °C por 5 min y se enfriaron en hielo por 20 min. Las muestras se diluyeron con agua destilada a un volumen total de 4.9 mL y se midió la absorbancia a 540 nm.

Los cálculos para determinar la concentración máxima teórica (*C<sub>maxteo</sub>*) y rendimiento de azúcares reductores se muestran en las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$C_{maxteo} = \frac{0.25g}{5mL} \left( \frac{\%celulosa + \%hemicelulosa}{100} \right) \quad (1)$$

$$Rendimiento = \left( \frac{CHE - CSH(g/mL)}{Cmaxteo(g/mL)} \right) 100 \quad (2)$$

donde *CHE*: Concentración hidrólisis enzimática, *CSH*: Concentración sin hidrólisis enzimática.

#### 4.5 Determinación de la concentración relativa de furanos

En un tubo de ensayo de 10 mL, se adicionaron 0.25 g de material junto con 5 ml de agua Milli Q. Posteriormente, se removieron en agitador orbital por una noche, el sobrenadante se colectó y se filtraron con filtro Millipore 0.45 µm.

Finalmente, se realizó el barrido espectrofotométrico UV-visible de las muestras sin diluir de 200 a 1100 nm, así como de las muestras diluidas en una proporción 1:7.5 con agua destilada Milli Q.

Los cálculos para determinar la concentración relativa de furanos de las muestras con dilución se muestran en la ecuación 3.

$$\Delta ABSORBANCIA = AU_{284} - AU_{320} \quad (3)$$

Donde  $\Delta ABSORBANCIA$ : Diferencia entre la Absorbancia a 284 nm y la Absorbancia a 320 nm,  $AU_{284}$ : Absorbancia a 284 nm,  $AU_{320}$ : Absorbancia a 320 nm.

#### 4.6 Determinación del índice de cristalinidad

El *Índice Cristalinidad* (ICr) se determina mediante la medición de la intensidad máxima dispersada del pico para la celulosa a 21° y 18° según se describe en la ecuación 4.

$$\text{Índice Cristalinidad} = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100\% \quad (4)$$

Donde  $I_{200}$  es el pico para celulosa correspondiente a la intensidad máxima dispersada alrededor de 21° y  $I_{am}$  intensidad debida a la región amorfa (pico ancho) a 18°.

#### **4.7 Difracción de Rayos X**

Los patrones de difracción del bagazo sin pretratamiento y pretratados se obtuvieron en un difractor Advance D-8 (Bruker AXS, USA) a  $2\theta$  en un intervalo de 5-50° a una velocidad de escaneo 1°/min.

#### **4.8 Espectroscopía de Infrarrojo**

Los espectros de infrarrojo del bagazo sin pretratamiento y pretratados se obtuvieron en un espectrofotómetro Spectrum 400 (Perkin-Elmer, USA).

#### **4.9 Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial**

El análisis termogravimétrico del bagazo sin pretratamiento y pretratados se realizó en un equipo Mettler-Toledo TGA-STDA851e-LF 600 (Mettler-Toledo International Inc., USA) a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Las muestras se degradaron de temperatura ambiente y hasta 550 °C.

#### **4.10 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Las imágenes de microscopía del bagazo sin pretratamiento, pretratados antes y después de hidrólisis enzimática se adquirieron con un microscopio JSM-5900 (JEOL Company, USA). Las muestras se recubrieron con oro y se analizaron a bajo vacío a diferentes magnificaciones (X300, X600, X1500).

#### **4.11 Porosimetría Adsorción-Desorción de Nitrógeno.**

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno se midieron con equipo 3-FLEX Micrometrics Surface Characterization a una temperatura de nitrógeno de  $-197.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se secaron a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (velocidad de calentamiento  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) por 24 h antes de la etapa de desgasificación. La etapa de desgasificación se completó a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El área superficial específica se determinó mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). El volumen del poro se obtuvo por desorción de nitrógeno a  $P/P_0 = 0.99$ . El diámetro promedio del poro se calculó como  $4V/A$  por el método BET.

### **5. Resultados y Discusión**

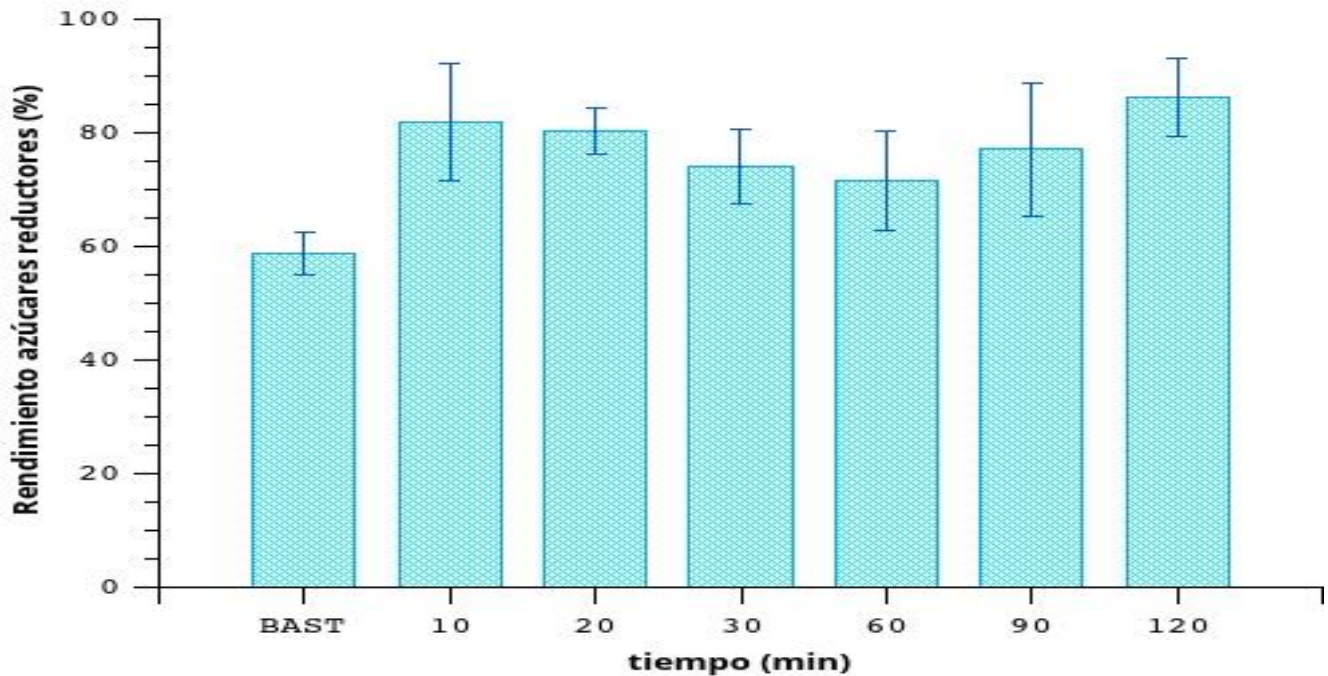
#### **5.1 Efecto del tiempo de residencia**

Inicialmente se evaluaron 6 tiempos de residencia (10- 120 min) a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 280 bar y un  $a_w$  nominal del bagazo de agave de 0.34. El punto crítico para el  $\text{CO}_2$  ocurre a  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 73 bar. La presión y la temperatura se seleccionaron principalmente por 2 razones: 1) se ha reportado que el uso de altas presiones es más adecuado para materiales rígidos como el bagazo de agave[29] y, 2) tomando en cuenta las limitaciones del equipo utilizado, asegurando que el pretratamiento se llevara a cabo en condiciones supercríticas y minimizando la degradación de la matriz lignocelulósica que deriven en productos de inhibición de la hidrólisis enzimática.[41]

Después de la liberación del gas y enfriamiento del equipo, la hidrólisis enzimática se llevó a cabo durante 72 h como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 6.

El análisis de los tiempos de residencia  $\text{CO}_2$  a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de 280 bar se obtuvo un incremento en el rendimiento de azúcares reductores (RAR) después de la hidrólisis enzimática en alrededor de 30% comparado con el bagazo sin pretratamiento, comprobando el efecto positivo del pretratamiento. Se observa que en solo 10 min de incubación se alcanza cerca de 82% de RAR sin un incremento notorio de este valor a tiempos más largos.

Claramente, el uso de tiempos cortos significa menor consumo de energía dentro de todo el proceso. Estos resultados son semejantes a los encontrados por Ferreira et. al[29] donde mayores tiempos de pretratamiento no influyen la mejora de los rendimientos de azúcares reductores. Estos resultados son similares a los observados materiales rígidos como paja de arroz y rastrojo de maíz.[38,42]



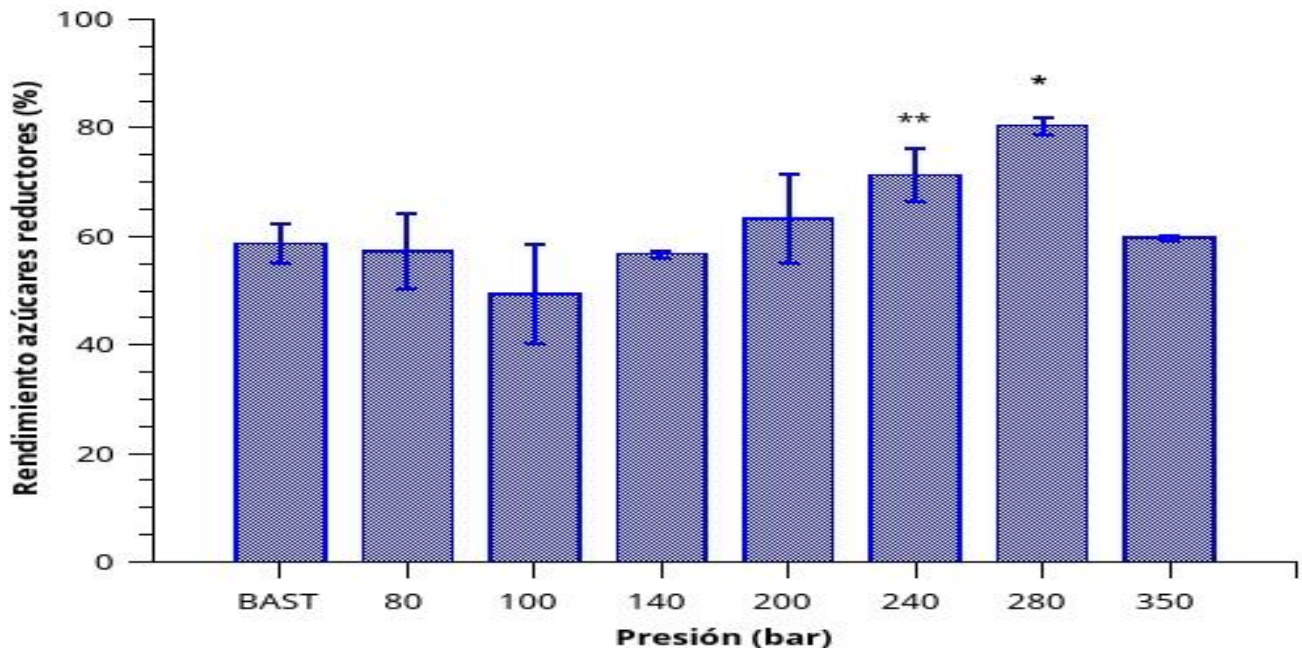
**Figura 6.** Rendimiento de azúcares reductores. Efecto del tiempo de residencia (T 100 °C, P 280 bar, t 10-120 min). BAST: bagazo de agave sin pretratamiento.

## 5.2 Efecto de la Presión

El efecto de la presión se evaluó a una temperatura de 100 °C y tiempo de residencia 10 min. Como se muestra en la Figura 4 a temperatura constante y variando la presión se puede modificar la densidad del CO<sub>2</sub>. Dichos cambios en la densidad del gas pueden favorecer una mayor penetración dentro de la matriz lignocelulósica e incrementar el efecto del tratamiento.[51]



Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, donde observa que entre 80 bar y 200 bar se obtuvieron rendimientos cercanos al 60%. Sin embargo, a estas condiciones no se observa diferencia significativa con respecto al bagazo sin pretratamiento, y que presiones mayores a 200 bar son necesarios para obtener rendimientos por arriba del obtenido en el bagazo sin pretratamiento. Sin embargo, a 350 bar no se observó un incremento esperado al lograr una mayor densidad del fluido, alcanzando niveles similares a los del bagazo sin pretratamiento.



**Figura 7.** Rendimiento de azúcares reductores. Efecto de la presión (T 100 °C, t 10 min, P 80-350 bar). BAST: bagazo de agave sin pretratamiento.

Los rendimientos más altos se obtuvieron a una presión de 240 bar (71.31%) y a 280 bar (80.4%). Kim et al. [43] observaron efectos similares a presiones altas durante el pretratamiento de álamo con CO<sub>2</sub> supercrítico. Existe por lo tanto una presión óptima que debe ser establecida para cada sustrato. Arriba de este valor el efecto de la “explosión” pierde su efecto, los mejores resultados de la hidrólisis enzimática se obtienen a una presión óptima, y por arriba de esta presión se reduce el efecto de “explosión”. Esta observación la reportaron también Ferreira et al.[29] donde a presiones altas se incrementa la hidrólisis enzimática, y sobre cierto valor empieza a disminuir, sin una clara explicación de este fenómeno.

Zhao et al.[52] propusieron un posible mecanismo ya que encontraron similitudes para el efecto de la presión en el rastrojo de maíz. Las observaciones realizadas sugieren que a altas presiones se tiene un menor hinchamiento causado por menor agua dentro del material, debido a que a altas presiones existe menos agua dentro de la matriz lignocelulósica por un efecto de solubilización en el CO<sub>2</sub> a estas condiciones.

Los estudios de Luiza et al. y Zhao et al. se llevaron a cabo a valores de humedad mayores al 80%, sin embargo, durante este estudio el efecto del agua a altas presiones es despreciable debido al menor contenido de humedad (6.5%) del bagazo de agave[50] lo que sugiere un mecanismo diferente para la disminución del RAR.

### **5.3 Efecto de la Temperatura**

El tratamiento se llevó a cabo a presión de 280 bar y tiempo de pretratamiento de 10 min, como condiciones donde se obtiene el mayor RAR. Los experimentos se realizaron evaluando 4 temperaturas, una condición subcrítica (24 °C, fase líquida) y 3 condiciones supercríticas del CO<sub>2</sub> (cerca del estado supercrítico 35 °C, a 100 °C y a 120 °C)

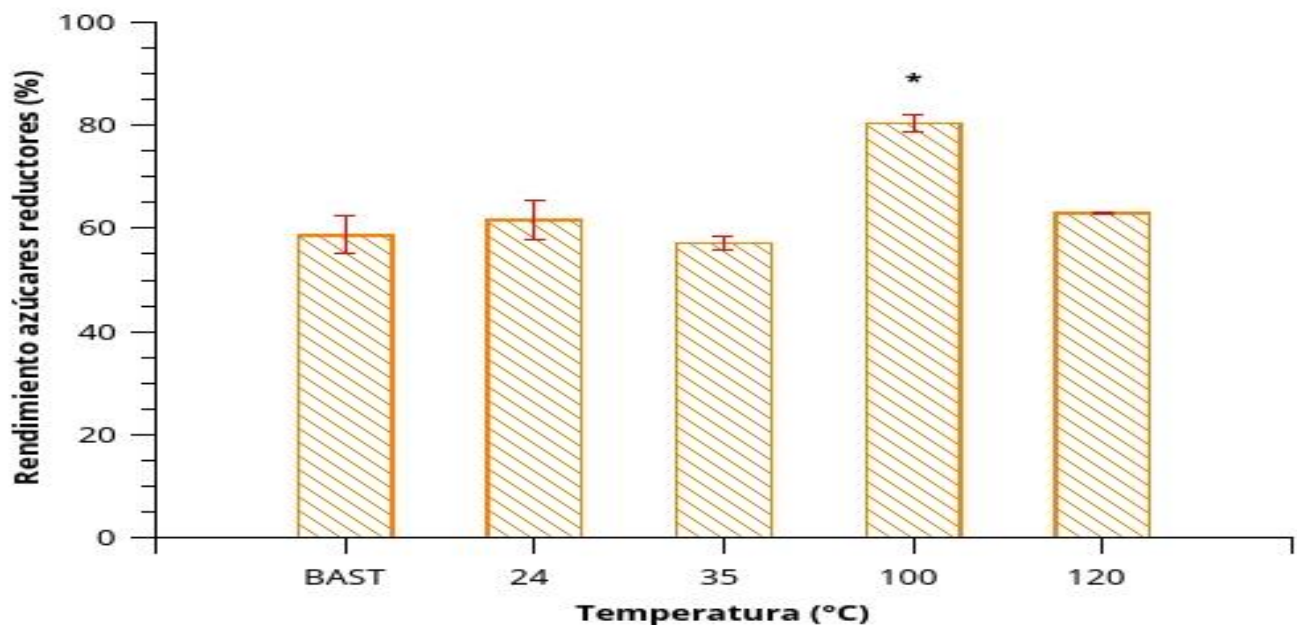
Durante estos experimentos se mantuvo una presión constante de 280 bar. Como se observa en la Figura 4, es posible tener valores altos de densidad del CO<sub>2</sub> por cambios de temperatura durante el proceso.

De esta manera, se tiene que a 24 °C y 35 °C se tienen una densidad de 961.40 kg/m<sup>3</sup> y 918.64 kg/m<sup>3</sup>, respectivamente. Las dos condiciones de mayor densidad se compararon con las densidades a 100 °C y 120 °C (715.2 kg/m<sup>3</sup> y 635.5 kg/m<sup>3</sup>), respectivamente. Es pertinente tener presente que a altas temperaturas la difusividad del CO<sub>2</sub> aumenta permitiendo una mejor penetración[45], aunque a bajas temperaturas se pueden tener valores más altos de densidad consiguiendo mejoras en la adsorción del material debido al estado físico del gas, reduciendo el gasto energético del proceso de conversión de la biomasa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. En este sentido, durante el pretratamiento a 24 °C, se obtuvieron rendimientos de 61.5% y de 57.1% a 35 °C, valor equivalente al bagazo sin pretratamiento.

A su vez, a 120 °C, se obtuvo un RAR de 65%. El mayor rendimiento se obtuvo a 100 °C, siendo este de 81.4%. Estas condiciones son significativas comparada con los experimentos a 24 °C y con el bagazo sin pretratamiento (58.66% de RAR).

Resultados similares se han reportado donde temperaturas de 100 °C producen en los mejores rendimientos.[28,53] El mismo se efecto se observó en caso del pretratamiento de bagazo de caña a condiciones supercríticas y subcríticas con CO<sub>2</sub>, donde no existió mejora en el RAR a condiciones subcríticas.[35,54] Narayanaswamy et. al[45] observaron una tendencia similar para temperaturas menores a 80 °C, debido a que bajas temperaturas se tiene una menor difusión del CO<sub>2</sub> dentro de la matriz, lo que afecta también el “efecto de explosión” esperado.



**Figura 8.** Rendimiento de azúcares reductores. Efecto de la temperatura (T 24 °C/35 °C/100 °C/120 °C, P 280 bar, t 10 min).

Aunque la importancia del aumento de la temperatura permite una mayor difusión del CO<sub>2</sub> dentro de la matriz, a altas temperaturas la disminución del rendimiento del RAR puede deberse a la degradación de la celulosa o hemicelulosa o inclusive de azúcares simples.[55]

Estos resultados evidencian la importancia de una mayor difusión del CO<sub>2</sub> en la matriz a altas temperaturas en comparación al efecto de la densidad del fluido.

#### **5.4 Efecto de la actividad de agua ( $a_w$ )**

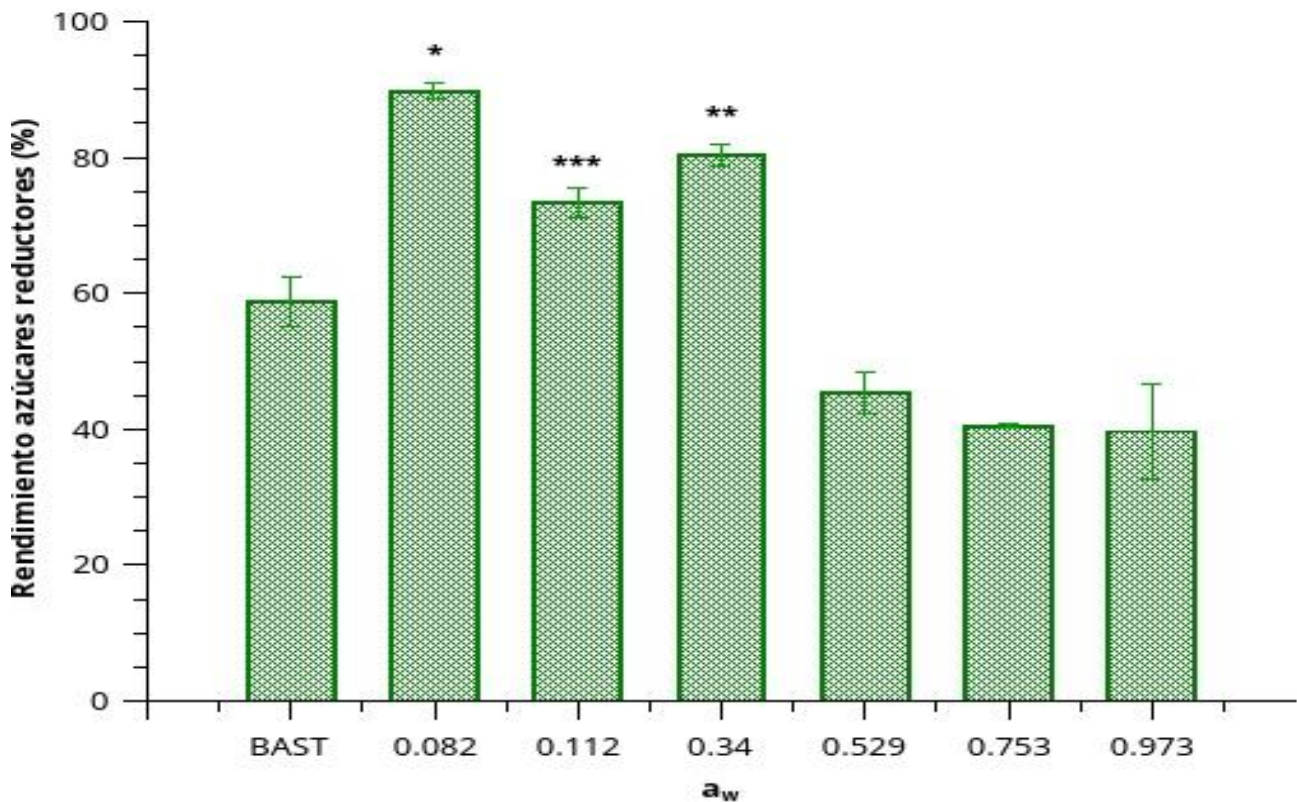
Se evaluó el efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ) del bagazo de agave, pues se ha propuesto que la hidrólisis de la hemicelulosa se puede llevar a cabo por la producción de ácido carbónico debido a la reacción entre el CO<sub>2</sub> y agua.[42] Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

Después de ajustar el  $a_w$  del bagazo de agave según se describió en la sección de métodos, se procedió a efectuar el pretratamiento a 100 °C, 280 bar, 10 min seguido de la hidrólisis enzimática por 72 h. Como se mencionó, el bagazo almacenado a condiciones ambientales y antes de ajustar su  $a_w$  tiene un valor nominal de  $a_w = 0.340$  y fue empleado como control.

Se observó que a valores más altos de  $a_w$  (i.e. 0.753 y 0.973) el rendimiento de azúcares reductores disminuye hasta un 40% e, incluso, no hay mejora con respecto al bagazo sin tratamiento.

Sin embargo, a valores más bajos de  $a_w$  el rendimiento de azúcares reductores aumenta entre 15% y 25% con respecto al bagazo sin pretratamiento. Los máximos alcanzan 80.4% de rendimiento en el bagazo sin modificación del  $a_w$  (i.e. 0.34) de 73% para  $a_w$  0.112 y de 85% para un  $a_w$  0.082.

Una posible explicación es que a valores bajos de  $a_w$  existe menos agua absorbida en la matriz, facilitando la difusión del CO<sub>2</sub> dentro de esta, y el cambio rápido de fase supercrítica a fase gas durante la descompresión del reactor, afecta mayormente la compleja estructura lignocelulósica, lo que trae como consecuencia una hidrólisis enzimática superior.



**Figura 9.** Rendimiento de azúcares reductores a diferentes  $a_w$ . (Condiciones del tratamiento T 100°C, P 280 bar, t 10 min). BAST: Bagazo sin pretratamiento.

Estas observaciones están en línea con lo que reportaron Zheng et al.[35] quienes señalan que las moléculas de  $\text{CO}_2$  puede “entrar” donde moléculas de agua no pueden. Además, se ha propuesto que, al existir más agua en la superficie del material lignocelulósico, la transferencia de masa disminuye por una especie de taponamiento de los poros, impidiendo la introducción del  $\text{CO}_2$  y debilitando el efecto de “explosión”. [28] El mismo fenómeno se observó en materiales como aserrín de pino amarillo del sur.[43]

También, al aumentar la temperatura las cavidades de la pared celular se reducen, dejando menos espacio para humedad en forma líquida o vapor, aunado a que durante un tratamiento térmico existe menos agua absorbida haciéndose el material más hidrofóbico; permitiendo de esta manera una mejor penetración del  $\text{CO}_2$  dentro de la matriz lignocelulósica.[56]

En contraparte, varios investigadores estudiaron el efecto del agua con CO<sub>2</sub> supercrítico. En estos casos el contenido de humedad se ajusta mediante adición directa o “mojado” del material lignocelulósico con agua. Dicha modificación mejora la digestibilidad enzimática de los materiales tratados debido al hinchamiento o reblandecimiento de la matriz por el agua absorbida.

Por ejemplo, Kim et al.[43] obtuvieron un rendimiento de azúcares reductores de 79.4% a un contenido de humedad de 73% para álamo con incremento del 60% con respecto al material sin tratar. Zhao et al.[52] obtuvieron un rendimiento máximo de azúcares reductores de 62.2% para rastrojo de maíz, y entre 40-50% para el pretratamiento de olote de maíz y tallo de sorgo con un contenido de humedad de 75%. Así como de 86% de RAR para el guayule a un 60% de contenido de humedad.[57] Cabe precisar que la temperatura de tratamiento fue de 110 °C-165 °C, la presión de 200-300 bar y tiempos de tratamiento de 30 min-60 h, lo que representa condiciones mucho más severas a las reportadas aquí para el bagazo de agave.

Los resultados anteriores son comparables a los obtenidos durante nuestro estudio de 89% de RAR, los cuales pueden lograrse sin etapas extras como la adición de agua previo al pretratamiento. Así mismo, los mayores rendimientos (i.e. 90%) son similares también a otros métodos de desestructuración de bagazo de agave como en el caso de la extrusión.[58]

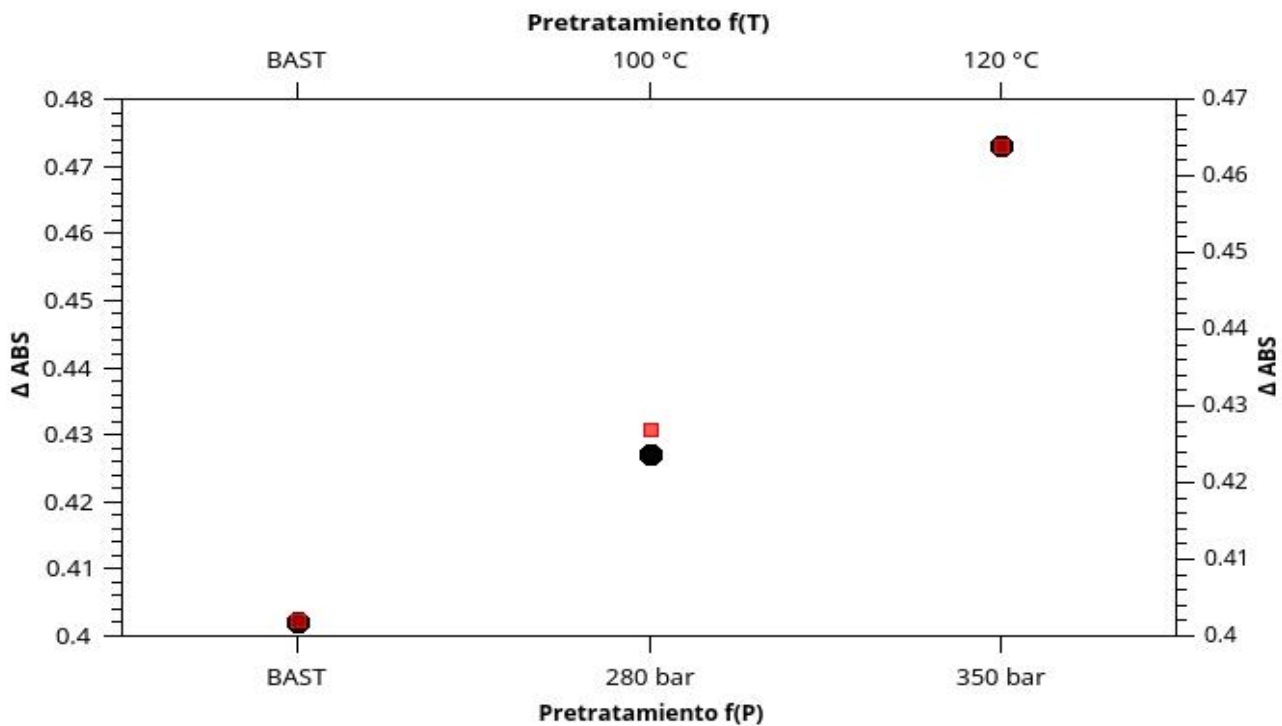
## **5.5 Concentración relativa de Furanos**

La concentración relativa de furanos se determinó como forma indirecta de la reducción del rendimiento de azúcares reductores después del pretratamiento. La medición de estos resulta del concepto ampliamente conocido de que los azúcares se degradan térmicamente a furanos en los alimentos [59] y participan en la inhibición de la actividad de las celulasas utilizadas en la hidrólisis enzimática.[60] Esta concentración de furanos puede calcularse mediante un método “rápido” como la diferencia entre la absorbancia a 284 nm y 320 nm cuando se realiza el barrido de las diluciones.[61]

De este modo, se obtuvo la concentración relativa de furanos que se muestra en la Figura 10, encontrándose que el bagazo sin pretratamiento tiene una concentración relativa de 0.402. Sin embargo, al aumentar la temperatura en los bagazos pretratados a 100 °C y 120 °C, aumenta a 0.427 y 0.473, respectivamente. La misma tendencia se observa en los bagazos pretratados a 280 bar y 250 bar, siendo la concentración relativa de furanos de 0.427 y 0.484, respectivamente.

Como se observa a condiciones más severas (mayor temperatura y presión) la concentración de furanos aumenta y corresponde a las condiciones donde disminuye el rendimiento de azúcares reductores.

Estas tendencias están de acuerdo con lo reportado por Van Walsum et al. donde a condiciones más severas la concentración relativa de furanos aumenta.[36]



**Figura 10.** Concentración relativa de furanos de bagazo sin pretratamiento y bagazos tratados selección: Evaluación de la temperatura a 100°C y 120°C (●), evaluación de la presión a 280 bar y 350 bar (■). BAST: bagazo sin pretratamiento.



## 5.6 Caracterización de bagazo sin pretratamiento y bagazos pretratados.

### 5.6.1 Difracción de Rayos X

El análisis de difracción de rayos X se realizó para determinar diferencias estructurales del bagazo sin pretratamiento y los bagazos con algún pretratamiento a diferentes condiciones, los resultados se muestran en la Figura 11.

Las señales o picos característicos en la difracción de rayos X para el bagazo de agave se ha descrito ampliamente. Dichas señales corresponden al oxalato de calcio que en plantas con metabolismo CAM como el *Agave tequilana var azul* se encuentra en grandes cantidades y su posible eliminación por un pretratamiento puede ser positivo durante la hidrólisis enzimática. Además, otras señales características se observan para la celulosa tanto en su estructura “amorfa” como en la cristalina.[62]

Como se esperaba las señales del oxalato de calcio fueron identificadas a  $2\theta = 15^\circ, 24.3^\circ$  y  $30.1^\circ$  para todos los bagazos analizados, sin embargo, se presentan como picos más anchos e irregulares comparados con el bagazo sin pretratamiento. Esta forma de picos se ha vinculado a una menor cantidad de oxalato de calcio siendo más apreciable en los tratamientos a  $100^\circ\text{C}$ , 280 bar/240bar/350 bar o en los pretratamientos donde se modificó el  $a_w$  a 0.082 y 0.112.

También se observaron, las señales a  $2\theta = 18^\circ$  y  $21^\circ$  relacionados a la celulosa, estructura “amorfa” y cristalina, respectivamente[63]. Se puede deducir que el tratamiento afecta la estructura cristalina de la celulosa, encontrándose picos más “finos” comparados con el bagazo sin pretratamiento.

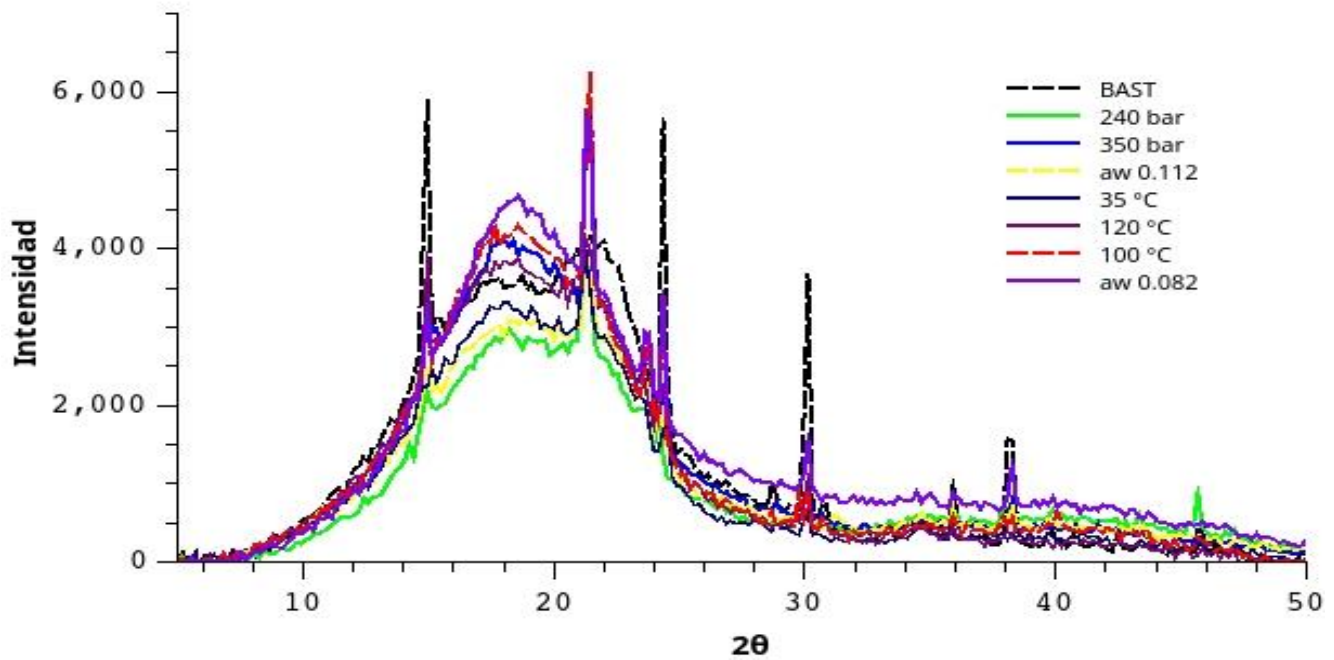
Por otro lado, el índice de cristalinidad (ICr) se ha reportado como parámetro para evaluar el efecto del tratamiento,[23,64]. En el caso del bagazo sin pretratamiento se determinó un ICr= 20.31% y los resultados para bagazos pretratados seleccionados se muestran en la Tabla 4.

Por lo tanto, se observa que el pretratamiento aumenta la cristalinidad de la celulosa con respecto al bagazo sin pretratamiento, exceptuando al tratamiento evaluando la temperatura a



120 °C, donde se tiene una disminución de alrededor del doble debido degradación térmica por carbonización del material a esta temperatura.

El aumento del ICr se ha relacionado con la remoción de la lignina que se encuentra en la región amorfa de la celulosa. Dicho cambio mejora de la digestibilidad enzimática debido al menor estado recalcitrante del material por la disminución de la cantidad de lignina.[65]



**Figura 11.** Difracción de rayos X de bagazo sin pretratamiento y bagazos a diferentes condiciones de pretratamiento. Se incluyen evaluación de la temperatura a 100 °C/ 120 °C, evaluación de la presión a 240 bar/ 350 bar y evaluación del  $a_w$  a 0.082 y 0.112. BAST: bagazo sin pretratamiento.

**Tabla 4.** Índice de Cristalinidad de BAST y bagazos tratados seleccionados.

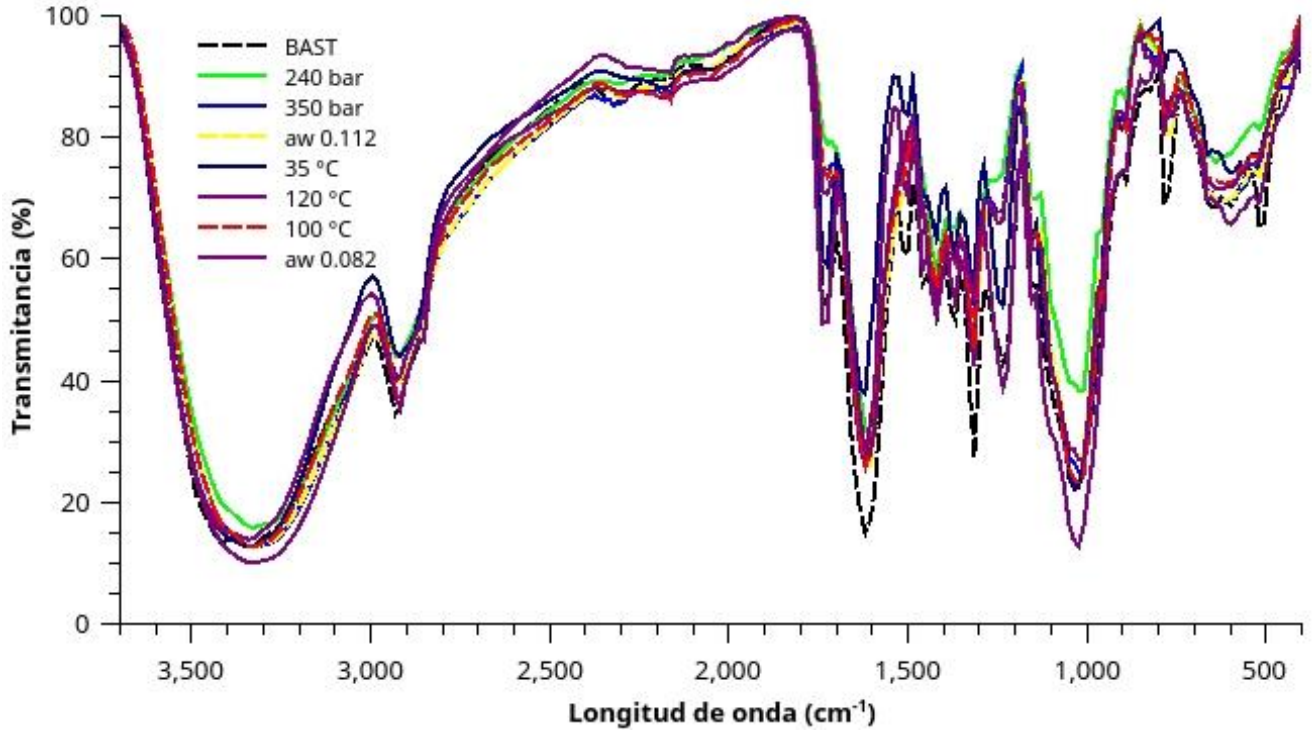
Pretratamiento	Índice Cristalinidad (%)
35°C	18.93
100°C	34.14
120°C	7.47
a <sub>w</sub> 0.082	24
a <sub>w</sub> 0.112	31.23
240 bar	32.11
350 bar	31.50

### 5.6.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

La espectroscopia de Infrarrojo se determinó para BAST y bagazos pretratados a diferentes condiciones de trabajo con CO<sub>2</sub>, donde se estudiaron los cambios estructurales de sus componentes (Figura 12).

En los espectros analizados se observan diversas señales características del bagazo de agave. Alrededor de 1300 y 1621 cm<sup>-1</sup> se encuentran las señales características del oxalato de calcio, que en el bagazo sin pretratamiento son más intensas que las correspondientes a los bagazos tratados, lo que se ha interpretado como disolución y/o modificación de este componente. La menor intensidad de estas señales está asociada a una menor cantidad de la lignina como se observó en el análisis del índice de cristalinidad.

Por otro lado, a 1745 cm<sup>-1</sup> y 1235 cm<sup>-1</sup> se encuentran las señales correspondientes a la vibración del enlace C-O, pertenecientes a los enlaces éster en la lignina y hemicelulosa. Estas señales son menos intensas en los bagazos pretratados, observándose una mayor modificación en los bagazos en condiciones operacionales a 100 °C, 280 bar/240 bar/350 bar, así como en los bagazos pretratados a 100 °C, 280 bar, a<sub>w</sub> modificado a 0.082 y 0.112. Estas señales menos intensas se han identificado como la ruptura de los enlaces que permiten la asociación de la lignina con la celulosa y la hemicelulosa.[63]



**Figura 12.** Espectroscopia de Infrarrojo de BAST y bagazos tratados seleccionados. Se incluyen evaluación de la temperatura a 100 °C/ 120 °C, evaluación de la presión a 240 bar/ 350 bar y evaluación del  $a_w$  a 0.082 y 0.112. BAST: bagazo sin pretratamiento.

Además, las señales alrededor de  $1000\text{ cm}^{-1}$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  se han vinculado a la región cristalina y amorfa de la celulosa, respectivamente. En los bagazos pretratados la relación de un aumento de una señal con respecto a la otra se incrementa para los bagazos pretratados al compararlos con el bagazo sin pretratamiento. Este aumento en la relación de las señales está asociada con una mayor cristalinidad de la celulosa.[66] Las observaciones realizadas son consistentes con los encontrados en la difracción de rayos X, donde aumenta la cristalinidad de la celulosa en los bagazos pretratados a diferentes condiciones.

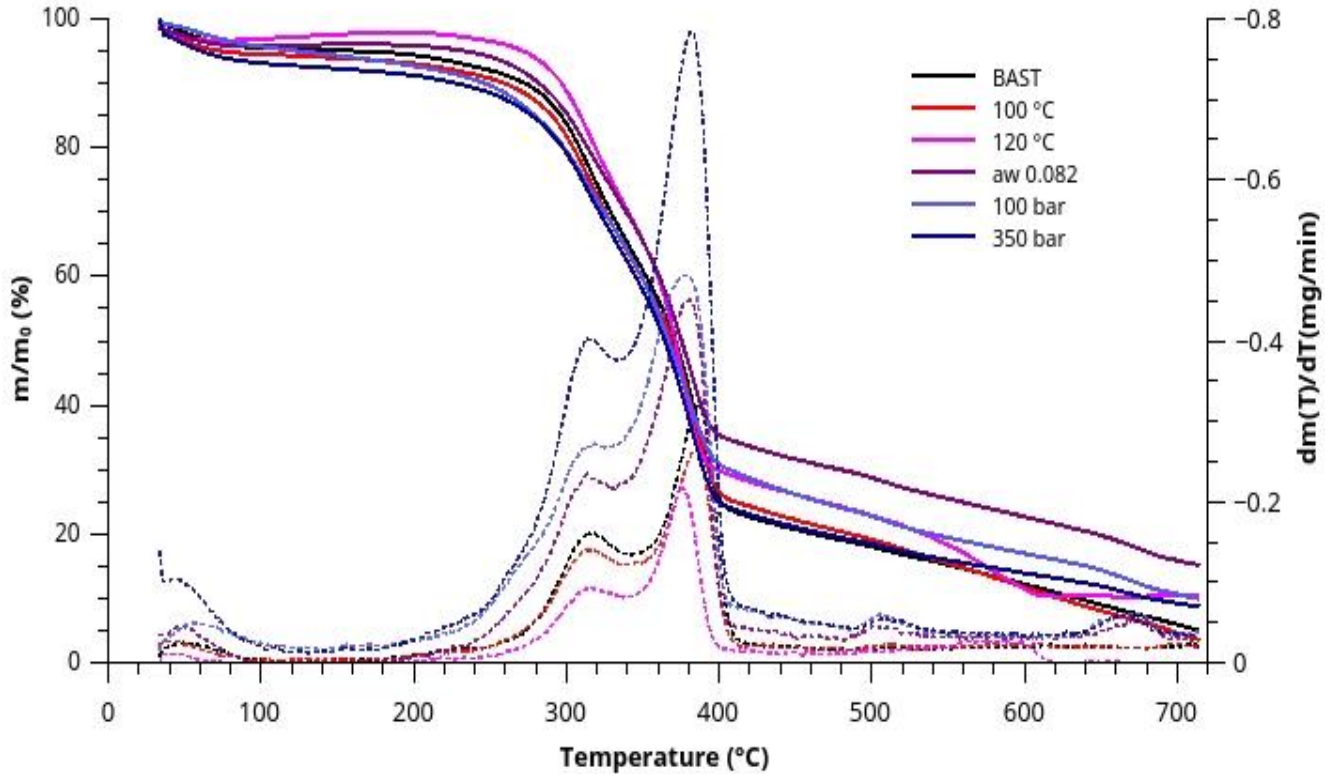
### 5.6.3 Análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial

El análisis térmico se realizó para observar los cambios estructurales debidos al tratamiento. Los termogramas de análisis termogravimétrico y análisis termogravimétrico diferencial se muestran la Figura 13.

De esta manera durante el análisis termogravimétrico diferencial es posible observar el inicio de la degradación de los componentes entre 313-317 °C y la etapa de la temperatura de descomposición entre 383-387 °C para todos los casos incluido el bagazo sin pretratamiento (Tabla 5). La degradación térmica posterior se lleva a cabo por arriba de 600 °C. Para los tratamientos a una temperatura de 120 °C, presión a 100 bar y  $a_w$  de 0.082, se observan transiciones por arriba de 530 °C debida a reacciones de descomposición secundarias encontradas en muestras carbonizadas de celulosa,[67] siendo consistentes con análisis termogravimétricos para el bagazo de agave.[50,66,68]

Las curvas del análisis termogravimétrico demuestran que los bagazos pretratados muestran pequeñas diferencias en la estabilidad térmica comparada con el bagazo sin pretratamiento. Dichas diferencias pueden ser calculadas entre el inicio de la temperatura de degradación y la temperatura de etapa de descomposición para cada bagazo pretratado y comparadas con lo observado para la muestra sin tratamiento.[66]

De esta manera, se encontró que existen diferencias de entre 0.31 a 1.26% para la etapa de degradación, presentándose las mayores diferencias en el bagazo pretratado cuando el  $a_w$  se modificó a 0.082 y a 0.973, así como, de 0.25% a 2.59%, con un aumento de esta diferencia en los bagazos pretratados a 100 °C, 120 °C y durante la modificación del  $a_w$  a 0.082.



**Figura 13.** Análisis termogravimétrico de bagazo sin pretratamiento y bagazos tratados seleccionados. Se incluyen evaluación de la temperatura a 100 °C/ 120 °C, evaluación de la presión a 100 bar/ 350 bar; evaluación del  $a_w$  a 0.082. BAST: bagazo sin pretratamiento.

Estas diferencias entre las etapas de degradación y descomposición del material lignocelulósico se ha relacionado con una menor estabilidad térmica de materiales tratados con SC-CO<sub>2</sub> debido a la posible ruptura de la estructura de la lignina de la biomasa después de un pretratamiento.[29]

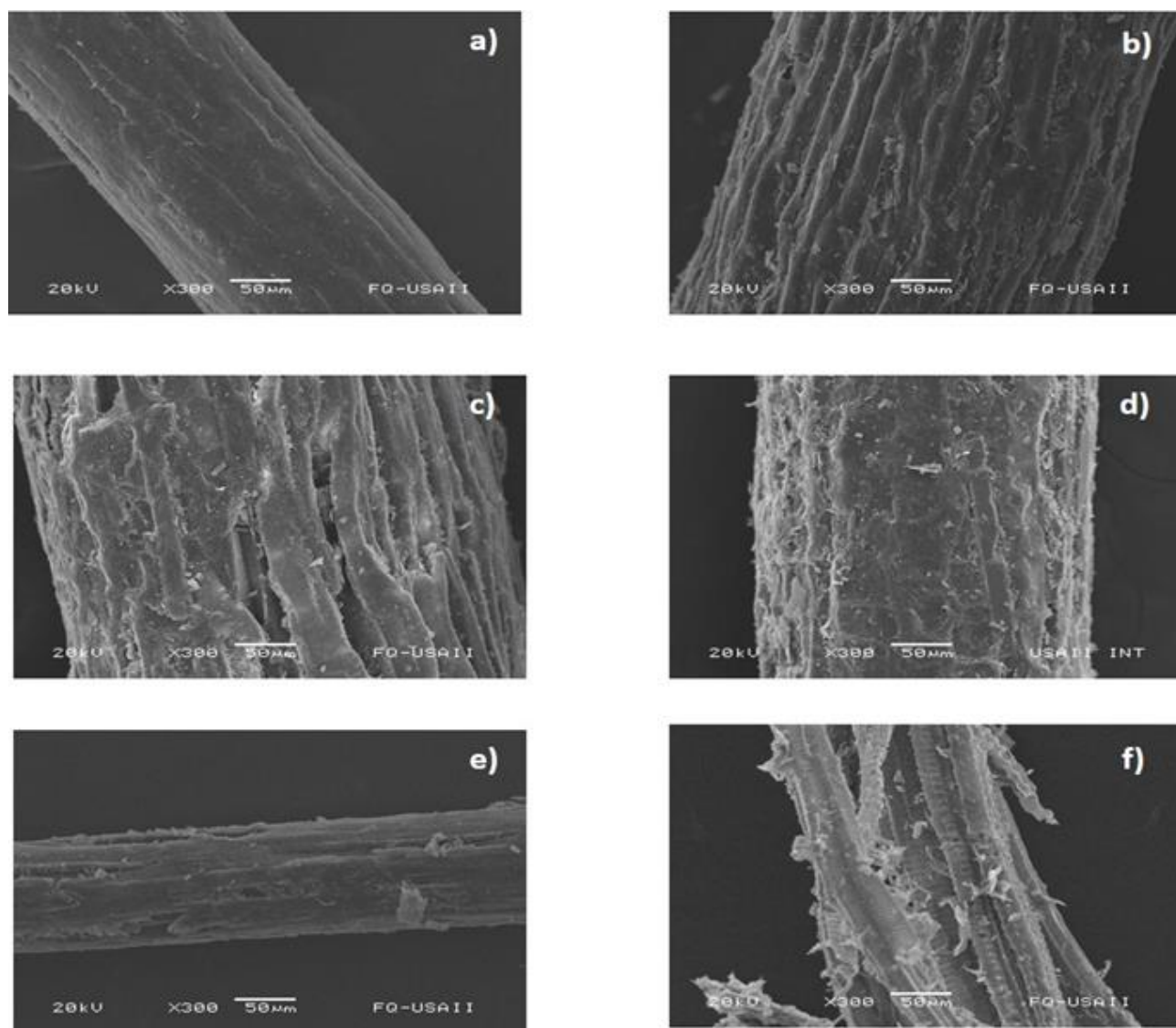
**Tabla 5.** Temperaturas de etapas de degradación y descomposición de BAST y bagazos tratados seleccionados. Se incluyen evaluación de la temperatura a 100 °C/120 °C, evaluación de la presión a 350 bar/100 bar y evaluación del  $a_w$  a 0.082.

Pretratamiento	Etapa de degradación (°C)	Etapa de descomposición (°C)
BAST	316	385
100°C	315	384
120°C	315	375
$a_w$ 0.082	313	380
350 bar	313	381
100 bar	317	378

#### 5.6.4 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La microscopia electrónica de barrido (Figura 11) muestra que el bagazo sin pretratamiento (a) tiene una morfología superficial más lisa (sin huecos), comparada con los bagazos tratados a una actividad de agua de 0.753 (b), del bagazo a un  $a_w$  de 0.340 (c) y el bagazo a un  $a_w$  de 0.082. Las microscopias de (b), (c) y (d) muestran morfologías alteradas por el tratamiento con CO<sub>2</sub>. Teniendo en las microscopias (c) y (d) una cantidad mayor de “huecos” o poros, asociados a un incremento del área accesible para las enzimas hidrolíticas[69].

Adicionalmente, se incluyen el bagazo sin pretratamiento después de la hidrólisis enzimática (e) y el bagazo de agave a las condiciones de operación donde se encontraron los mejores rendimientos de azúcares reductores (f). Como se esperaba el bagazo sin pretratamiento después de la hidrólisis enzimática muestra nula o poca modificación morfológica, opuesto al bagazo pretratado después de la hidrólisis enzimática donde se pueden observar pequeñas fibrillas y agujeros donde la estructura original de fibra desaparece. Estas observaciones de la superficie apuntan a un efecto positivo del pretratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico para tener una mejor exposición del material y por ende una mejor acción hidrolítica de las celulasas.



**Figura 11.** Microscopia electrónica de barrido de diferentes bagazos de agave. (a) BAST sin HE; (b) T 100 °C, P 280 bar, t 10 min  $a_w$  0.753; (c) T 100 °C, P 280 bar, t 10 min,  $a_w$  0.340, d) T 100 °C, P 280 bar, t 10 min  $a_w$  0.082, e) BAST después de HE, f) T 100 °C, P 280 bar, t 10 min,  $a_w$  0.340 después de HE. BAST: bagazo sin pretratamiento, HE: Hidrólisis Enzimática.

### 5.6.5 Porosimetría Adsorción-Desorción de Nitrógeno

El estudio de porosimetría se realizó con el fin de cuantificar el área accesible para las celulasas en función del área superficial, volumen de poro y diámetro del poro. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Durante el estudio de porosimetría se observan cambios despreciables en el área superficial de los bagazos pretratados y bagazo sin pretratamiento. Sin embargo, para el diámetro del poro se encontraron cambios importantes. El mayor diámetro del poro se obtuvo para el tratamiento a 100 °C, 280 bar y  $a_w$  0.34.

**Tabla 6.** Área superficial, volumen de poro y diámetro promedio del poro determinado por Adsorción-Desorción de Nitrógeno por BET (Método Brunauer-Emmett-Teller (BET) de BAST y bagazos tratados seleccionados. Se incluyen evaluación de la temperatura a 100 °C/ 120 °C, evaluación del  $a_w$  a 0.082, 0.112 y 0.973. BAST: bagazo sin pretratamiento.

Tratamiento	Área Superficial (m <sup>2</sup> /g)	Volumen poro (cm <sup>3</sup> /g)	Diámetro promedio del poro (Å)
<b>BAST</b>	0.38	0.0018	193.6
<b>100°C</b>	0.13	0.0017	535.4
<b>120°C</b>	0.28	0.0026	364.0
<b><math>a_w</math> 0.082</b>	0.16	0.0013	320.1
<b><math>a_w</math> 0.112</b>	0.26	0.0017	267.2
<b><math>a_w</math> 0.973</b>	0.18	0.0010	220.3

Por su parte, la muestra correspondiente al  $a_w$  de 0.082, en el cual se obtienen los mayores rendimientos de azúcares reductores, también presenta un diámetro de poro alto. Interesantemente, en el bagazo pretratado a la mayor  $a_w$  de 0.973 el diámetro promedio del poro cambia poco con respecto al BAST. Lo anterior parece indicar que al adsorberse más agua dentro la matriz se mantiene la integridad de la apertura del poro original.

El resumen de las caracterizaciones analíticas indica que:

1) Por los análisis de difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo y análisis termogravimétricos para el bagazo sin pretratamiento y bagazos pretratados a diferentes condiciones establecen que la mayor modificación química de la matriz lignocelulósica se



relaciona con una modificación estructural de la lignina y el consecuente aumento en la cristalinidad.

2) La microscopía electrónica de barrido y el estudio de la porosimetría derivan en alteraciones significativas de la estructura morfológica y superficial del bagazo pretratado.

3) Estas modificaciones tanto químicas como morfológicas son más contundentes en el bagazo pretratado a 100 °C, 10 min, 280 bar y un  $a_w$  de 0.082, las que permiten una acción efectiva de las enzimas hidrolíticas en la compleja estructura lignocelulósica del bagazo de agave.

## 6. Conclusiones

El pretratamiento de CO<sub>2</sub>-SC aumenta la digestibilidad enzimática del bagazo de agave con un incremento igual a 45% comparado con el bagazo sin pretratamiento. El máximo rendimiento de azúcares reductores es de alrededor de 85% y equivalente al uso de otros pretratamientos reportados para el bagazo de agave.

El pretratamiento produce principalmente modificaciones químicas en la estructura de la lignina y modificaciones morfológicas de la matriz lignocelulósica que derivan en la mejora de la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Esto se puede observar en la microscopía electrónica de barrido donde el bagazo de agave sin pretratamiento muestra pequeñas fibrillas que desaparecen después del pretratamiento. Los estudios de porosimetría mostraron un incremento del diámetro del poro a 100 °C, 280 bar y  $a_w$  0.34. Se asume que dichos cambios permitieron un mejor acceso de la celulasa al interior de la matriz y con ello a una mayor eficiencia de la hidrólisis enzimática.

La actividad de agua del material resultó el factor más importante, seguido de valores máximos de temperatura y presión durante el pretratamiento. Los resultados encontrados fortalecen el concepto de que el agua en la superficie del material impide la penetración del CO<sub>2</sub> en la matriz, reduciendo el efecto de “explosión”, lo que reduce la exposición de celulosa para su hidrólisis. Contrariamente, valores bajos de  $a_w$  ( $a_w = 0.082$ ) favorece la producción de azúcares reductores que resultaría en altos rendimientos de bioetanol. Estos resultados contradicen la hipótesis sobre la formación de ácido carbónico a mayor contenido de agua que debía reflejarse en la producción de azúcares reductores provenientes de la hemicelulosa.

Resulta pertinente reiterar que el uso del parámetro termodinámico  $a_w$  representa la cantidad de agua disponible (y no fija o inmovilizada) más preciso para estudios de hidratación, en contraste con el contenido de agua utilizado normalmente en varios estudios.

El análisis de la concentración relativa de furanos justifica por qué las variables operacionales normalmente alcanzan un máximo y por arriba de este se generan productos de degradación que afectan negativamente el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Esta perspectiva es relevante para otros estudios del pretratamiento de lignocelulosa.

Finalmente, en una perspectiva industrial, si bien es necesario establecer el balance de energía del proceso, el presente estudio se relaciona con la sustentabilidad en el manejo del bagazo de agave, residuo complejo y generado en grandes cantidades, que de no ser tratado adecuadamente es causante de severos daños ambientales.

## 7. Referencias

- [1] M. Henrique, L. Silveira, R.C. Morais, M. Costa, Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries, *ChemSusChem*. 8 (2015) 3366–3390. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500282>.
- [2] H.W. Blanch, B.A. Simmons, D. Klein-Marcuschamer, Biomass deconstruction to sugars, *Biotechnol. J.* 6 (2011) 1086–1102. <https://doi.org/10.1002/biot.201000180>.
- [3] A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>.
- [4] F. Cherubini, The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, *Energy Convers.* 51 (2010) 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>.
- [5] A.P. Sinitsyn, O.A. Sinitsyna, Bioconversion of renewable plant biomass. second-generation biofuels: raw materials, biomass pretreatment, enzymes, processes, and cost analysis, *Biochem. (Mosc.)*. 86 (2021) S166–S195. <https://doi.org/10.1134/S0006297921140121>.

- [6] C. Louime, H. Uckelmann, Potential and prospects of cellulosic ethanol in the world, *Curr. Sci.* 94 (2008) 1567–1568.
- [7] R. Kumar, M. Tabatabaei, K. Karimi, I.S. Horváth, Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - A review, *Biofuel Res. J.* 9 (2016) 347–356.  
<https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.1.4>.
- [8] N. Gaurav, S. Sivasankari, G.S. Kiran, A. Ninawe, J. Selvin, Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 73 (2017) 205–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>.
- [9] G.F. Bautista Méndez, Efecto de líquidos iónicos en la hidrólisis enzimática del bagazo de agave, Tesis de Maestría en Ingeniería (Ingeniería Química) Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [10] I. Barrera, M.A. Amezcua-Allieri, L. Estupiñan, T. Martínez, J. Aburto, Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagasses, *Chem. Eng. Res. Des.* 107 (2016) 91–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.10.015>.
- [11] R. Palomo-Briones, I. López-Gutiérrez, F. Islas-Lugo, K.L. Galindo-Hernández, D. Munguía-Aguilar, J.A. Rincón-Pérez, M.Á. Cortés-Carmona, F. Alatraste-Mondragón, E. Razo-Flores, Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives, *Clean Techn. Environ. Policy.* 20 (2018) 1423–1441. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>.
- [12] G. Iñiguez-Covarrubias, R. Díaz-Teres, R. Sanjuan-Dueñas, J. Anzaldo-Torres, R.M. Rowell, Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of Agave tequilana Weber azul leaves, *Bioresourc. Technol.* 77 (2001) 101–108.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00167-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00167-X).
- [13] K.R. Corbin, C.S. Byrt, S. Bauer, S. Debolt, D. Chambers, A.M. Holtum, G. Karem, M. Henderson, J. Lahnstein, T. Beahan, A. Bacic, G.B. Fincher, N.S. Betts, R.A. Burton, Prospecting for energy-rich renewable raw materials : Agave leaf case study, *PLoS One.* (2015) 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135382>.
- [14] D. Rijal, T. Vancov, S. McIntosh, N. Ashwath, G.A. Stanley, Process options for

conversion of Agave tequilana leaves into bioethanol, *Ind. Crop Prod.* 84 (2016) 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.011>.

- [15] J.R. Mielenz, M.R. Jr, O.A. Thompson, X. Yang, H. Yin, Development of Agave as a dedicated biomass source : production of biofuels from whole plants, *Biotechnol. Biofuels.* 8 (2015) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0261-8>.
- [16] J.M. Hernández-Salas, M.S. Villa-Ramírez, J.S. Veloz-Rendón, K.N. Rivera-Hernández, R.A. González-César, M.A. Plascencia-Espinosa, S.R. Trejo-Estrada, Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 1238–1245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>.
- [17] J. Saucedo-Luna, A.J. Castro-Montoya, M.M. Martínez-Pacheco, C.R. Sosa-Aguirre, J. Campos-García, Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38 (2011) 725. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0853-z>.
- [18] L. Caspeta, M.A. Caro-Bermúdez, T. Ponce-Noyola, A. Martinez, Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol, *Appl. Energy.* 113 (2014) 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>.
- [19] J.A. Perez-Pimienta, M.G. Lopez-Ortega, P. Varanasi, V. Stavila, G. Cheng, S. Singh, B.A. Simmons, Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass, *Bioresour. Technol.* 127 (2013) 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.124>.
- [20] J.A. Perez-Pimienta, C.A. Flores-Gómez, H.A. Ruiz, N. Sathitsuksanoh, V. Balan, L. da Costa Sousa, B.E. Dale, S. Singh, B.A. Simmons, Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEX, autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments, *Bioresour. Technol.* 211 (2016) 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.103>.
- [21] S. Sun, S. Sun, X. Cao, R. Sun, The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials, *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>.
- [22] S. Haghghi, A. Hossein, M. Tabatabaei, Lignocellulosic biomass to bioethanol , a

comprehensive review with a focus on pretreatment, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27 (2013) 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>.

- [23] V. Vandebossche, J. Brault, G. Vilarem, O. Hernández-Meléndez, E. Vivaldo-Lima, M. Hernández-Luna, E. Barzana, A. Duque, P. Manzanares, M. Ballesteros, J. Mata, E. Castellón, L. Rigal, A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder, *Ind. Crop. Prod.* 55 (2014) 258–266. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>.
- [24] S. Behera, R. Arora, N. Nandhagopal, S. Kumar, Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 36 (2014) 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>.
- [25] N. Akhtar, K. Gupta, D. Goyal, A. Goyal, Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Environ. Prog. Sustain.* 35 (2016) 489–511. <https://doi.org/10.1002/ep>.
- [26] T. Gu, M.A. Held, A. Faik, Supercritical CO<sub>2</sub> and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production, *Environ. Technol.* 3330 (2013) 1735–1749. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.809777>.
- [27] S.P.M. Da Silva, A.R.C. Morais, R. Bogel-Lukasik, The CO<sub>2</sub>-assisted autohydrolysis of wheat straw, *Green Chem.* 16 (2014) 238–246. <https://doi.org/10.1039/c3gc41870g>.
- [28] Y. Liu, P. Luo, Q. Xu, E. Wang, J. Yin, Investigation of the effect of supercritical carbon dioxide pretreatment on reducing sugar yield of lignocellulose hydrolysis, *Cell. Chem. Technol.* 48 (2014) 89–95.
- [29] A.L. Ferreira Santos, K.Y. Fausta Kawase, G.L. Vieira Coelho, Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Flui.* 56 (2011) 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.10.044>.
- [30] C.Y. Park, Y.W. Ryu, C. Kim, Kinetics and rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in supercritical carbon dioxide, *Korean J. Chem. Eng.* 18 (2001) 475–478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02698293>.

- [31] G. Muratov, C. Kim, Enzymatic hydrolysis of cotton fibers in supercritical CO<sub>2</sub>, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7 (2002) 85–88.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02935884>.
- [32] M. Stamenic, I. Zizovic, R. Eggers, P. Jaeger, H. Heinrich, E. Rój, J. Ivanovic, D. Skala, Fluids swelling of plant material in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Flui.* 52 (2010) 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.12.004>.
- [33] M. Chauvet, M. Sauceau, J. Fages, Extrusion assisted by supercritical CO<sub>2</sub>: A review on its application to biopolymers, *J. Supercrit. Flui.* 120 (2016) 408–420.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.043>.
- [34] A. Morais, A.M. da Costa Lopes, R. Bogel-Lukasik, Carbon dioxide in biomass processing: Contributions to the green biorefinery concept, *Chem. Rev.* 115 (2015) 3–27. <https://doi.org/10.1021/cr500330z>.
- [35] Y. Zheng, H. Lin, G.T. Tsao, Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion, *Biotechnol. Prog.* 14 (1998) 890–896. <https://doi.org/10.1021/bp980087g>.
- [36] G.P. van Walsum, H. Shi, Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover, *Bioresour. Technol.* 93 (2004) 217–226.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.009>.
- [37] S. Bachu, Screening and ranking of sedimentary basins for sequestration of CO<sub>2</sub> in geological media in response to climate change, *Environ. Geol.* 44 (2003) 277–289.  
<https://doi.org/10.1007/s00254-003-0762-9>.
- [38] M. Gao, F. Xu, S. Li, X. Ji, S. Chen, D. Zhang, Effect of SC-CO<sub>2</sub> pretreatment in increasing rice straw biomass conversion, *Biosyst. Eng.* 106 (2010) 470–475.  
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.05.011>.
- [39] R. Alinia, S. Zabihi, F. Esmailzadeh, J.F. Kalajahi, Pretreatment of wheat straw by supercritical CO<sub>2</sub> and its enzymatic hydrolysis for sugar production, *Biosyst. Eng.* 107 (2010) 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.07.002>.
- [40] J.S. Luterbacher, J.W. Tester, L.P. Walker, High-solids biphasic CO<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O pretreatment of lignocellulosic biomass, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 451–460.

<https://doi.org/10.1002/bit.22823>.

- [41] J.W. King, K. Srinivas, O. Guevara, Y. Lu, D. Zhang, Y. Wang, Reactive high pressure carbonated water pretreatment prior to enzymatic saccharification of biomass substrates, *J. Supercrit. Fluid.* 66 (2012) 221–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.02.010>.
- [42] L. Huisheng, R. Miaomiao, Z. Minhua, C. Ying, Pretreatment of corn stover using supercritical CO<sub>2</sub> with water-ethanol as co-solvent, *Chin. J. Chem. Eng.* 21 (2013) 551–557. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(13\)60508-X](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60508-X).
- [43] K.H. Kim, J. Hong, Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis, *Bioresource Technology.* 77 (2001) 139–144.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00147-4).
- [44] N. Srinivasan, L.-K. Ju, Pretreatment of guayule biomass using supercritical carbon dioxide-based method, *Bioresourc. Technol.* 101 (2010) 9785–9791.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.069>.
- [45] N. Narayanaswamy, A. Faik, D.J. Goetz, T. Gu, Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production, *Bioresourc. Technol.* 102 (2011) 6995–7000.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.052>.
- [46] M. Henrique, L. Silveira, B. Angelo, M. Lucio, L. Pereira, Supercritical carbon dioxide combined with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and ethanol for the pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse, *Bioresourc. Technol.* 192 (2015) 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.044>.
- [47] J.S. Luterbacher, J.W. Tester, L.P. Walker, Two-temperature stage biphasic CO<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O pretreatment of lignocellulosic biomass at high solid loadings, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1499–1507. <https://doi.org/10.1002/bit.24417>.
- [48] T. Benazzi, S. Calgaroto, V. Astolfi, C. Dalla Rosa, J.V. Oliveira, M.A. Mazutti, Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis, *Enzyme Microb. Technol.* 52 (2013)

247–250. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.02.001>.

- [49] D.T. Phan, C.-S. Tan, Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> followed by alkaline hydrogen peroxide, *Bioresourc. Technol.* 167 (2014) 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.006>.
- [50] O. Hernández-Meléndez, F. Miguel-Cruz, C. Montiel, M. Hernández-Luna, E. Vivaldo-Lima, C. Mena-Brito, E. Bárzana, Characterization of blue agave bagasse (BAB) as raw material for bioethanol production processes by gravimetric, thermal, chromatographic, X-ray diffraction, microscopy, and laser light scattering techniques, *Bioenerg. Res.* 9 (2016) 985–997. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-016-9760-0>.
- [51] Y. Zheng, H. Lin, J. Wen, N. Cao, X. Yu, G.T. Tsao, Supercritical carbon dioxide explosion as pretreatment for cellulose hydrolysis, *Biotechnol. Lett.* 17 (1995) 845–850. <https://doi.org/10.1007/BF00129015>.
- [52] M. Zhao, Q. Xu, G. Li, Q. Zhang, D. Zhou, J. Yin, H. Zhan, Pretreatment of agricultural residues by supercritical CO<sub>2</sub> at 50–80°C to enhance enzymatic hydrolysis, *J. Energy Chem.* 31 (2019) 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2018.05.003>.
- [53] N.H. Che Hamzah, M. Markom, O. Hassan, S. Harun, Investigation of the effect of supercritical carbon dioxide pretreatment on sugar yield prior to enzymatic hydrolysis of empty fruit bunches, *Ind. Biotechnol.* 11 (2015) 272–276. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0012>.
- [54] J.C. Rosero-Henao, B.E. Bueno, R. de Souza, R. Ribeiro, A. Lopes de Oliveira, C.A. Gomide, T.M. Gomes, G. Tommaso, Potential benefits of near critical and supercritical pre-treatment of lignocellulosic biomass towards anaerobic digestion, *Waste Manag. Res.* 37 (2019) 74–82. <https://doi.org/10.1177/0734242X18806998>.
- [55] E. Moharrerri, T. Jafari, S.L. Suib, N. Srinivasan, A.F. Ghobadi, L.-K. Ju, J.R. Elliott, Improved understanding of CO<sub>2</sub>-water pretreatment of guayule biomass by high solids ratio experiments, rapid physical expansion, and examination of textural properties, *Ind. Eng. Chem. Res.* 56 (2017) 645–652. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b03318>.
- [56] T.C. Acharjee, C.J. Coronella, V.R. Vasquez, Effect of thermal pretreatment on



- equilibrium moisture content of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 4849–4854. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.018>.
- [57] N. Srinivasan, L. Ju, Statistical optimization of operating conditions for supercritical carbon dioxide-based pretreatment of guayule bagasse, *Biomass Bioenerg.* 47 (2012) 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.009>.
- [58] C. Montiel, O. Hernández-Meléndez, E. Vivaldo-Lima, M. Hernández-Luna, E. Bárzana, Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion-saccharification process, *Bioenerg. Res.* 9 (2016) 1005–1014. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9747-x>.
- [59] S. Moro, J.K. Chipman, J.W. Wegener, C. Hamberger, W. Dekant, A. Mally, Furan in heat-treated foods: Formation, exposure, toxicity, and aspects of risk assessment, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 1197–1211. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200093>.
- [60] X. Jing, X. Zhang, J. Bao, Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159 (2009) 696–707. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8525-z>.
- [61] A. Martinez, M.E. Rodriguez, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram, Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass, *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 637–641. <https://doi.org/10.1021/bp0000508>.
- [62] J.A. Perez-Pimienta, H.M. Poggi-Varaldo, T. Ponce-Noyola, A.C. Ramos-Valdivia, A. Chavez-Carvayar, V. Stavila, B.A. Simmons, Fractional pretreatment of raw and calcium oxalate-extracted agave bagasse using ionic liquid and alkaline hydrogen peroxide, *Biomass Bioenerg.* 91 (2016) 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.001>.
- [63] M. Equihua-Sánchez, L.F. Barahona-Pérez, Physical and chemical characterization of Agave tequilana bagasse pretreated with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, *Waste Biomass Valori.* 10 (2019) 1285–1294. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0150-4>.
- [64] H. Zhang, S. Wu, Pretreatment of eucalyptus using subcritical CO<sub>2</sub> for sugar production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 1640–1645.

<https://doi.org/10.1002/jctb.4470>.

- [65] N.F.M. Zain, S. Mohamad, I. Ahmad, Preparation and characterization of cellulose and nanocellulose from Pomelo (*Citrus grandis*) Albedo, *J. Nutr. Food Sci.* 5 (2014) 10–13. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000334>.
- [66] J.A. Perez-Pimienta, M.G. Lopez-Ortega, J.A. Chavez-Carvayar, P. Varanasi, V. Stavila, G. Cheng, S. Singh, B.A. Simmons, Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment, *Biomass Bioenerg.* 75 (2015) 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.026>.
- [67] T. Fisher, M. Hajaligol, B. Waymack, D. Kellogg, Pyrolysis behavior and kinetics of biomass derived materials, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 62 (2002) 331–349. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(01\)00129-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-2370(01)00129-2).
- [68] K.G. Satyanarayana, T.H.S. Flores-Sahagun, L. Pereira Dos Santos, J. Dos Santos, I. Mazzaro, A. Mikowski, Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico, *Compos. Part A.* 45 (2013) 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.09.001>.
- [69] T. Gu, Pretreatment of lignocellulosic biomass using supercritical carbon dioxide as a green solvent, in: *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*, 2013: pp. 107–125. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6052-3>.



# Supercritical carbon dioxide “explosion” on blue agave bagasse to enhance enzymatic digestibility

Armando Navarro<sup>1</sup> · Carmina Montiel<sup>1</sup> · Jesús Gracia-Fadrique<sup>2</sup> · Alberto Tecante<sup>1</sup> · Eduardo Bárzana<sup>1</sup>

Received: 9 February 2021 / Revised: 28 April 2021 / Accepted: 29 April 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

## Abstract

Supercritical carbon dioxide (SCCO<sub>2</sub>) was employed as pretreatment of blue agave bagasse (BAB) to enhance enzymatic hydrolysis (EH) to simple sugars in preparation for bioethanol fermentation. Processing time (10–120 min), temperature (24–120 °C), and pressure (80–350 bar) were evaluated to obtain maximum total reducing sugar (TRS) after EH with commercial cellulase. Effect of water activity ( $a_w$ ) (0.082–0.973) of BAB was evaluated after optimum pretreatment conditions for maximum TRS (100 °C, 280 bar, and 10 min) were established. Higher values of temperature or pressure degraded simple sugars as determined by relative furan analysis. Treated samples were also characterized by scanning electronic microscopy and porosimetry, showing structural and morphological modifications that enhance enzymatic digestibility as compared to untreated controls. Processing with SCCO<sub>2</sub> results in 40% increment in TRS compared with untreated BAB. Hydration level defined by  $a_w$  resulted in the main variable affecting sugar yields, with lowest  $a_w$  of pretreated BAB generating the highest TRS valued. It is proposed that at low hydration levels, diffusivity of CO<sub>2</sub> is greater facilitating infiltration into the matrix and a more extensive deconstruction of the tight lignocellulosic matrix by explosion when pressure is released.

**Keywords** Blue agave bagasse · Supercritical carbon dioxide · CO<sub>2</sub> explosion · Biomass pretreatment · Structural characterization · Bioethanol

## 1 Introduction

Worldwide concerns of global warming have led to extensive research covering diverse aspects and causes of climate change

phenomena. Within a range of what are known as green approaches to reduce the use of fossil fuels and atmospheric CO<sub>2</sub> accumulation, biofuels have received special attention. Therefore biomass is now recognized as a widely acceptable raw material option to generate bio-based fuels and chemicals as established on COP 21 in Paris [1]. Lignocellulosic biomass is considered the source of second-generation biofuels since it is renewable, sustainable, and widely available and does not interfere with agricultural food production while using wasted material and residue by-products [2]. As examples, wheat straw, rice straw, sugarcane bagasse, corn stover, rapid growth grasses, and other agricultural/industrial wastes or by-products have been subjected to extensive research as a source for biofuels [3].

However, due to the tight and recalcitrance assembly of lignocellulosic biomass rich in complex polymeric and high molecular weight substrates (i.e., cellulose, hemicellulose, and lignin), a pretreatment step to deconstruct the matrix is needed. Such step facilitates depolymerization by hydrolytic enzymes to release simple carbohydrates (or monomers) that can be biochemically transformed into ethanol or other value added products [4, 5].

In terms of industrial processing, carbon dioxide at its supercritical state (SCCO<sub>2</sub>) is regarded as an effective green

✉ Eduardo Bárzana  
ebg@unam.mx

Armando Navarro  
armando.navacid@gmail.com

Carmina Montiel  
carmina@unam.mx

Jesús Gracia-Fadrique  
jgraciaf@unam.mx

Alberto Tecante  
tecante@unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

<sup>2</sup> Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de Mexico 04510, México

solvent of nonpolar solutes, with unique characteristics of large diffusivity and low viscosity [6].

Accordingly, it has been employed on the pretreatment of various lignocellulosic feedstocks where it can diffuse as a liquid-like state into the compact matrix, followed by a rapid release of pressure that results in a phase change to a gas state that brings an explosion effect that breaks mechanically the tight structure [7]. A similar explosion effect has been used with water steam or ammonia (AFEX®); however, CO<sub>2</sub> at the supercritical state or above has the main advantage of operating at mild conditions (T<sub>c</sub> 31 °C, P<sub>c</sub> 73.8 bar), in addition to being nontoxic and non-flammable [8].

Previous reports with SCCO<sub>2</sub> explosion have been described for Avicel [9], sugarcane bagasse [10], rice straw [11, 12], corn stover [13, 14], wheat straw [15], guayule [16], rice husk [17], and fruit empty bunches [18]. Additionally, combinations of methodologies have been published enhancing the effect of basic CO<sub>2</sub> pretreatment. For instance, ionic liquids [19], alkaline hydrogen peroxide [20], water/ethanol or water/butanol mixtures [21, 22], and ultrasound pretreatment [23, 24] have been used for deconstruction mainly by a lignin removal effect.

In Mexico, the production of Tequila is a consolidated industry in constant growth over the last decade. Tequila is the national distilled alcoholic beverage with high demand in many countries and obtained from a specific cactus plant (*Agave Tequilana weber*). In 2018, around 309 million liters of Tequila were produced from 1139 Mton of *Agave tequilana* plants leaving a semi-solid residue or waste commonly named blue agave bagasse (BAB). Average proportion was 0.66 kg BAB/kg blue agave plant. Hence around 750 Mton of BAB was generated in this year. BAB can be burnt as wood and combustion systems for burning agave bagasse are already developed and available for industry. Additionally it can be degraded as compost or fed to ruminants. However, there is not enough infrastructure or market to dispose large volumes properly, resulting in adverse environmental effects [25, 26].

Chemical composition of BAB and its availability all year round makes it an attractive biomass for bio-based chemicals [27]. During this decade, BAB pretreatment was accomplished using different approaches [7, 28–50], but no reports were found on the use of SCCO<sub>2</sub> on BAB.

Ferreira et al. [10] and Narayanaswamy et al. [13] have tested three different regularly accepted lignocellulosic materials for pretreatment with SCCO<sub>2</sub>. Evaluated parameters focused on time of pretreatment (5–60 min), temperature (60–150 °C), and pressure (120–240 bar). They found that at best conditions for each case, an enhancement in glucose yield was observed after standard enzymatic depolymerization. Therefore, we decide to evaluate extensively same parameters at a wider range of values that included subcritical and supercritical conditions. Again, the qualifying variable was the maximum total reducing sugars (TRS) for BAB after enzymatic hydrolysis.

Since BAB is produced in plant with a high moisture level, it was decided to complement our study with an evaluation of the role that water could be playing in the process. Interestingly Luterbacher and King [37–39] reported the formation of carbonic acid “in situ” during pretreatment of lignocellulosic biomass with CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O mixtures. It is reasoned that carbonic acid production due to hydration of CO<sub>2</sub> contributes to the disruption of hydrogen bonds on the cellulose matrix, enhancing the deconstruction effect.

Therefore, we proposed that humidity in the solid material might hydrate CO<sub>2</sub> to generate carbonic acid “in situ.” To that end, the effect of the thermodynamic parameter water activity (a<sub>w</sub>) of BAB was also studied and its effect on enzymatic depolymerization determined. In summary, present study reports for the first time the pretreatment of BAB with SCCO<sub>2</sub> and with controlled humidity through the parameter a<sub>w</sub>. The objective was to establish the potential of this methodology to produce bioethanol or other chemicals of interest.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Raw materials

BAB was kindly provided by Tequila Patron in Jalisco, Mexico. This material was generated in a milling process. Once collected, BAB was dispersed on a surface and air-dried outdoors for 2 weeks, sieved over a fabric mesh to retain the fibrous fraction and stored at room temperature before its use. Chemical composition and further characterization of fibrous fraction was previously reported by our research group [40].

### 2.2 SCCO<sub>2</sub> pretreatment

Pretreatment was carried out in a high-pressure stainless-steel reactor with a volume capacity of 100 mL and maximum pressure of 500 bar. CO<sub>2</sub> (Praxair, Mexico) from gas cylinder was introduced into the reactor with a syringe pump (ISCO 260D), and temperature was controlled using a heating jacket and a thermocouple inserted into the reactor. A typical experiment was as follow: 5 g of BAB was introduced on a custom made metallic mesh (to prevent losses during pressure release) and placed in the reactor. CO<sub>2</sub> was pumped into the reactor with exit valve opened briefly for 10 s to purge remaining air. Valve was closed and system left to reach an internal pressure of 50 bar and heated 10 degrees below the temperature of pretreatment. That lasted for around 60 min. Subsequently, additional CO<sub>2</sub> was added and equilibrated to the temperature and pressure desired to start the experiment. Once the time of pretreatment lasted, pressure was suddenly released by opening the exit valve to atmospheric pressure in less than 10 s and performing the “explosion effect” on the bagasse matrix.

Reactor was cooled, opened, and pretreated BAB was stored at 4 °C before EH. All experiments were conducted in duplicate and presented as mean values  $\pm$  standard deviation.

### 2.2.1 Water activity conditioning of BAB before SCCO<sub>2</sub> treatment

BAB and reactor were introduced into a vacuum chamber together with a saturated salt solution on a separated beaker and left to equilibrate for 12 h to reach the water content (i.e., water activity,  $a_w$ ) of the corresponding relative humidity on the headspace. Water activity values for each salt are well known [41]: KOH,  $a_w = 0.082$ ; LiCl,  $a_w = 0.113$ ; Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $a_w = 0.529$ ; NaCl,  $a_w = 0.753$ ; and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $a_w = 0.973$ . After BAB conditioning, experimental procedure was followed as in section above. Water activity of raw BAB (RBAB) was measured on a water activity meter (Novosina Labswift- $a_w$ , NY, USA) before pretreatment and recorded as the initial  $a_w = 0.34$  on all the experiments carried out.

### 2.2.2 Processing conditions

In summary, the evaluated operating conditions during deconstruction with SCCO<sub>2</sub> were time (10–120 min), temperature (24–120 °C), pressure (80–350 bar), and  $a_w$  (0.082–0.973). Selection of optimal conditions was determined based on maximum total reducing sugar (TRS) after EH with commercial cellulase (Novozymes) as detailed in the following section.

$$\text{Theoretical yield} = \frac{\text{Biomass (g)}}{\text{Total volume of reaction (mL)}} \left( \frac{\text{content cellulose} + \text{hemicellulose}}{100} \right) \quad (1)$$

$$\text{TRS yield} = \frac{\text{Concentration of reducing sugar released}}{\text{Theoretical yield}} \times 100 \quad (2)$$

### 2.5 Relative furan concentration

Relative furan concentration was determined for RBAB and pretreated BAB hydrolysates from UV-Vis measurements. Previously, Martinez et al. [42] developed a “quick” method to measure relative furan concentrations using a dilute solution of hydrolysates. Specifically, 0.25 g of RBAB or pretreated BAB and 5 mL Milli Q water were mixed and shaken overnight. Afterward, an aliquot of each sample was diluted 1:7.5, and spectrophotometric scans were recorded from wavelength 200 up to 1100 nm in 1 nm steps. Relative

### 2.3 Enzymatic hydrolysis (EH)

Pretreated and RBAB were subjected to hydrolysis with cellulase Cellic Ctec2®, a kind gift by Novozymes, Denmark. 0.25 g of material and 40  $\mu$ L of cellulase were added to 5 mL 50mM sodium acetate buffer solution pH 5 [32]. Suspension was incubated at 50 °C and stirred at 200 rpm for 72 h with orbital agitation. EH was carried out in triplicate. Samples were taken at 72 h and stored at  $-70$  °C before TRS analysis.

### 2.4 Total reducing sugar analysis (TRS)

Enzymatic hydrolysates were analyzed using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Sigma-Aldrich, Mexico) method for TRS determination. A 50  $\mu$ L aliquot of each pretreated hydrolysate was taken after 72 h enzymatic hydrolysis and reacted with DNS. Color developed was measured at 540 nm on a Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and compared with RBAB hydrolysates under same conditions. Calibration curve was constructed with *D*-glucose (Sigma-Aldrich, Mexico) standard solutions on water (0–30 mg/mL). Theoretical yield was calculated assuming maximum available sugar released from BAB, based on its total content of cellulose and hemicellulose measured on a dry weight basis [32] (Eq. (1)). Additionally, TRS yield for hydrolyzed samples was calculated as shown (Eq. (2)).

Percentage of theoretical yield

furan concentration was calculated as the difference in absorbance in wavelength at 284 and 320 nm.

### 2.6 Scanning electronic microscopy

RBAB and pretreated BAB scanning electron microscopy images were acquired with a JSM-5900 scanning microscope (JEOL Company, USA). Samples were analyzed at low-vacuum and different magnifications ( $\times 300$ ,  $\times 600$ ,  $\times 1500$ ) to observe morphological surface changes before and after pretreatment.

### 2.7 Porosimetry

Nitrogen adsorption-desorption isotherms were measured on 3-FLEX Micrometrics Surface Characterization equipment at liquid N<sub>2</sub> temperature ( $-197.9$  °C). Samples were dried at 60

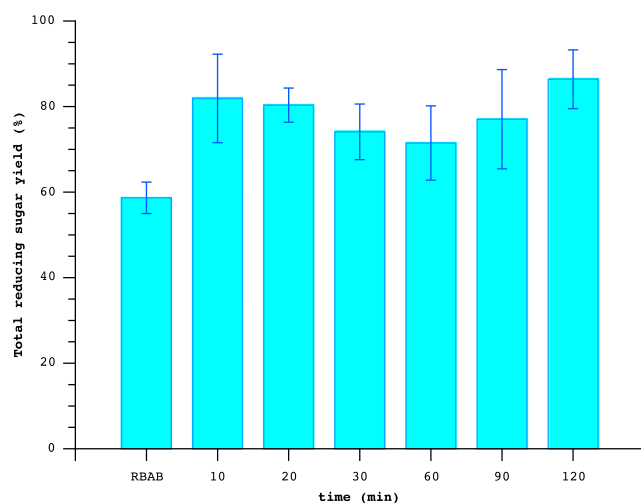
°C (heating rate 1 °C/min) for 24 h prior to degassing. Degassing stage was accomplished at 70 °C for 24 h. Specific surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method. Pore volume was obtained by nitrogen desorption at  $P/P_0=0.99$ . Average pore size was calculated as  $4V/A$  by the BET method.

### 3 Results and discussion

Each selected operational parameter were evaluated for its effect on EH.

#### 3.1 Effect of pretreatment time

Six values were tested (10–120 min) at 100 °C, 280 bar, and nominal  $a_w$  of 0.34 (initial condition for RBAB). It has been stated that high-pressure system is highly recommended for hardwoods or rigid materials [24]. Selected conditions guarantee the supercritical state for  $\text{CO}_2$  as well as minimum damage to lignocellulose reflected by the production of degradation products, as described previously by Zhao et al. [43]. After pressure release and cooling, EH was performed for 72 h as described. Results are shown on Fig. 1 and validate that  $\text{SCCO}_2$  has a positive impact on the sugar released to an extent of nearly 80% yield, an increase of ~25% compared with RBAB, after merely 10 min of pretreatment with a consequently low energy consumption. These data agreed with the findings by Ferreira Santos et al. [10] where the effect produced during pretreatment is less dependent on the time of exposure for rigid materials like BAB. Also, hardwood-like rice straw [11] and corn stover [21] had similar results, as higher time exposure to  $\text{SCCO}_2$  does not increment sugar yields.



**Fig. 1** Effect of pretreatment time. Total reducing sugars yield after EH of RBAB and pretreated BAB at temperature: 100 °C and pressure: 280 bar

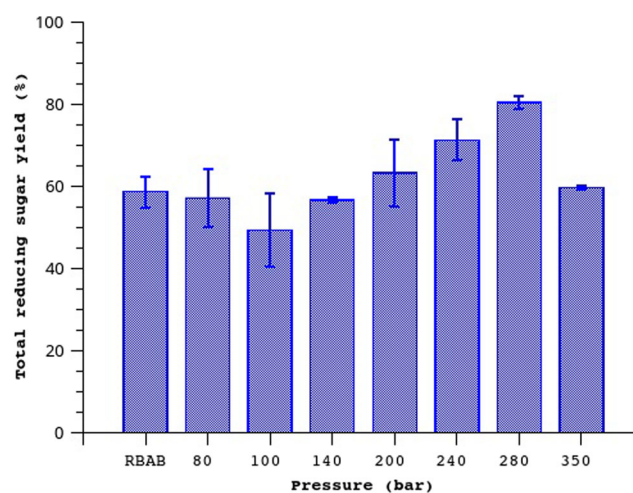
#### 3.2 Effect of pressure

A set of experiments was designed in the range of 80 to 350 bar at constant temperature (100 °C) and pretreatment time of 10 min, with the results shown in Fig. 2. From 80 to 200 bar, a yield around 60% TRS was observed, a result not significantly different to the control value. It seems that a threshold value of 200 bar is needed to reflect an enhancement in EH. Such value improves with further increases in pressure up to 350 bar that result in almost 20% increase in TRS compared to the control. A similar effect was reported by Kim and Hong [39]. However, at 350 bar, a clear reduction in TRS is observed. This result is similar to reports for aspen wood, sugarcane bagasse, corn cob, and corn stover when subjected to high pressures [10, 39, 43]. Those authors proposed that a loss in swelling occurs at high pressures, and this relates to a high moisture content ( $>70\%$ ). Nevertheless, in our study, moisture content is only around 6.5 % [40] suggesting that a different mechanism might be occurring. A possible explanation of this drop in yield for BAB will be discussed later in the Relative Furan section.

#### 3.3 Effect of temperature

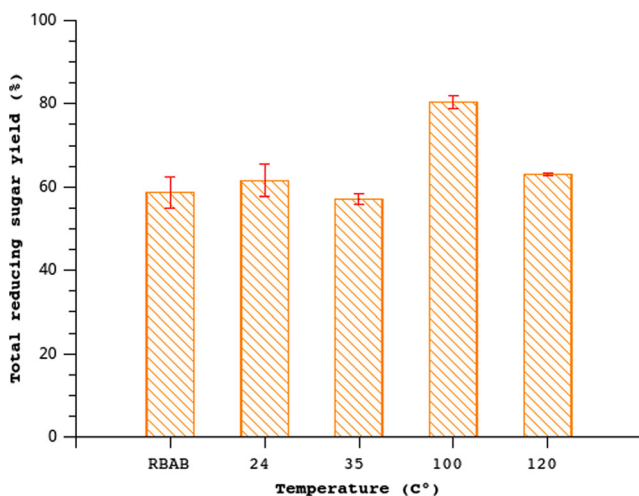
Since temperature plays a significant role in the physical state of  $\text{CO}_2$ , experiments were conducted at various temperatures. It has been reported that diffusivity of  $\text{SCCO}_2$  increases at higher temperatures expecting a deeper penetration on small pores and leading to a change on structure of lignin and hemicellulose that promote TRS yields after rapid release of pressure [12]. Under this premise, Narayanaswamy [13] found limited yields for corn stover at 80 °C due to poor diffusivity of  $\text{SCCO}_2$  [44].

Two conditions located within the supercritical region were studied at 100 °C and 120 °C and 280 bar (densities of 635.56  $\text{Kg/m}^3$  and 556.09  $\text{Kg/m}^3$ , respectively) [45]. For comparison,



**Fig. 2** Effect of pressure. Total reducing sugars yield after EH of RBAB and pretreated BAB at temperature: 100 °C and time of pretreatment: 10 min





**Fig. 3** Effect of temperature. Total reducing sugars yield after EH of RBAB and pretreated BAB at pressure: 280 bar and time of pretreatment: 10 min

two conditions at 24 °C (liquid phase) and 35 °C (near supercritical phase) were tested (also at 280 bar) to evaluate the effect of larger CO<sub>2</sub> densities (961.40 kg/m<sup>3</sup> at 24 °C and 918.64 kg/m<sup>3</sup> at 35 °C). In principle, the liquid state could result in a better wettability and a lower process energy requirement.

Results are presented in Fig. 3. Clearly, operating at regions below or close to supercritical state does not affect the state of the matrix as the effect is similar to the untreated control. This is aligned to Rosero-Henao et al. [46], who found that at subcritical conditions, digestibility of sugar cane bagasse was similar to the untreated sample. Also, Zheng et al. [9] reported no gain at similar conditions for Avicel or recycled paper mix.

For supercritical conditions, an optimal temperature of 100 °C was established with almost 25% increase in yield. However, further increase up to 120 °C reduced TRS yield, aligned with the trend reported for empty palm oil fruit bunches and corn stover [18]. Notwithstanding that diffusivity seem to play an important role, the loss in TRS at higher temperature could be due to thermal degradation of simple sugars or even polymers [44] as will be discussed in a later section.

### 3.4 Effect of water activity

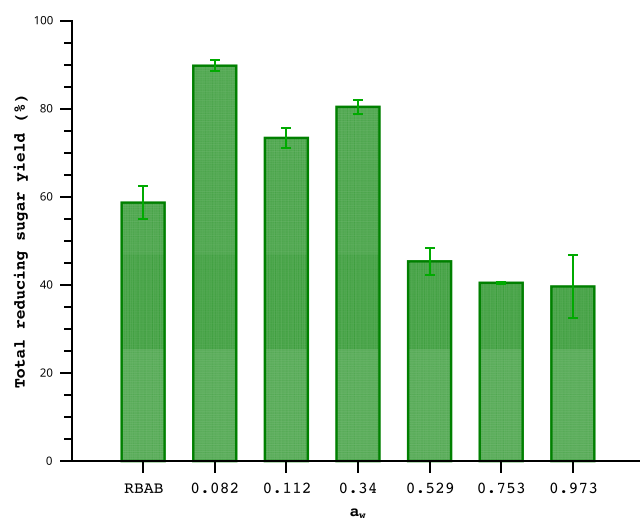
Since it has been proposed that hydrolysis of hemicellulose can be enhanced due to the reaction of CO<sub>2</sub> and water to produce carbonic acid in situ [21], the effect of hydration level corresponding to various water activities was investigated. Results are presented in Fig. 4. Clearly, values larger than 0.34 do not improve TRS yield compared to RBAB (i.e., around 40%). In fact it seems that RH is inhibited at higher water contents. However, at values lower than 0.34, no significant effect could be observed. Clearly, the differences in EH yield were evident for low and high water activity values.

We speculate that the less absorbed water at lower  $a_w$  could facilitate diffusion of CO<sub>2</sub> within the matrix. Once infiltrated, compressed CO<sub>2</sub> has a dissolving effect on lignin, and its sudden release to gas phase during decompression opens the tight structure resulting in a more efficient hydrolysis. Such statement is supported by Zheng [9] observation that CO<sub>2</sub> molecules can penetrate where water molecules cannot. In addition, Liu et al. [12] stated that as more liquid water covers the lignocellulosic surface, mass transfer diminishes transport, limiting CO<sub>2</sub> penetration and weakening the explosion effect. Same trend was observed on the pretreatment of southern yellow pine with SCCO<sub>2</sub> [39]. Also, as higher temperatures were used, cell wall cavities are reduced in size, making them less available to liquid or vapor water penetration [47].

Interestingly, former studies with other biomasses where maximum total reducing sugars occur at high pressures (200–300 bar) and temperatures (110–165 °C) with large pretreatment times (30min–2h) represent a set of conditions more severe than in our study. Our results at low  $a_w$  discard the hypothesis that more water would lead to carbonic acid formation that results in higher deconstruction levels. In any event, the use of  $a_w$  represents the amount of available water and a more precise parameter for hydration studies in contrast to total water content, as in the case of aspen 79.4–73 wt% [39], corn cob and sorghum stalk at 75 wt% [43], or guayule at 60 wt% [16]. Interestingly, maximum TRS yield in Fig. 4 (90%) is equivalent to those obtained by extrusion of blue agave bagasse [32].

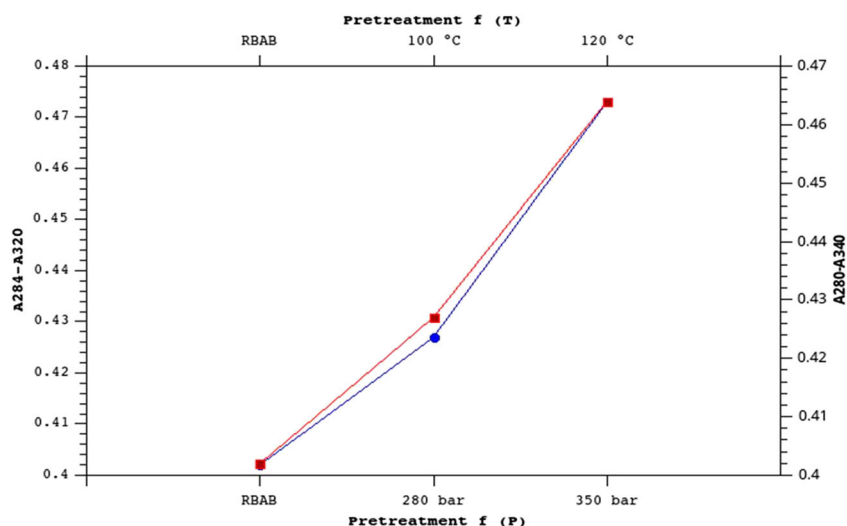
### 3.5 Relative furan concentration

Relative furan concentration was determined as an indirect account of the reduction of TRS yield at extreme conditions of temperature or pressure. This concept is derived from the known fact that sugars are subject to thermal degradation to



**Fig. 4** Effect of  $a_w$ . Total reducing sugars yield after EH of RBAB ( $a_w = 0.34$ ) and pretreated BAB at temperature: 100 °C, pressure: 280 bar, and time of pretreatment: 10 min

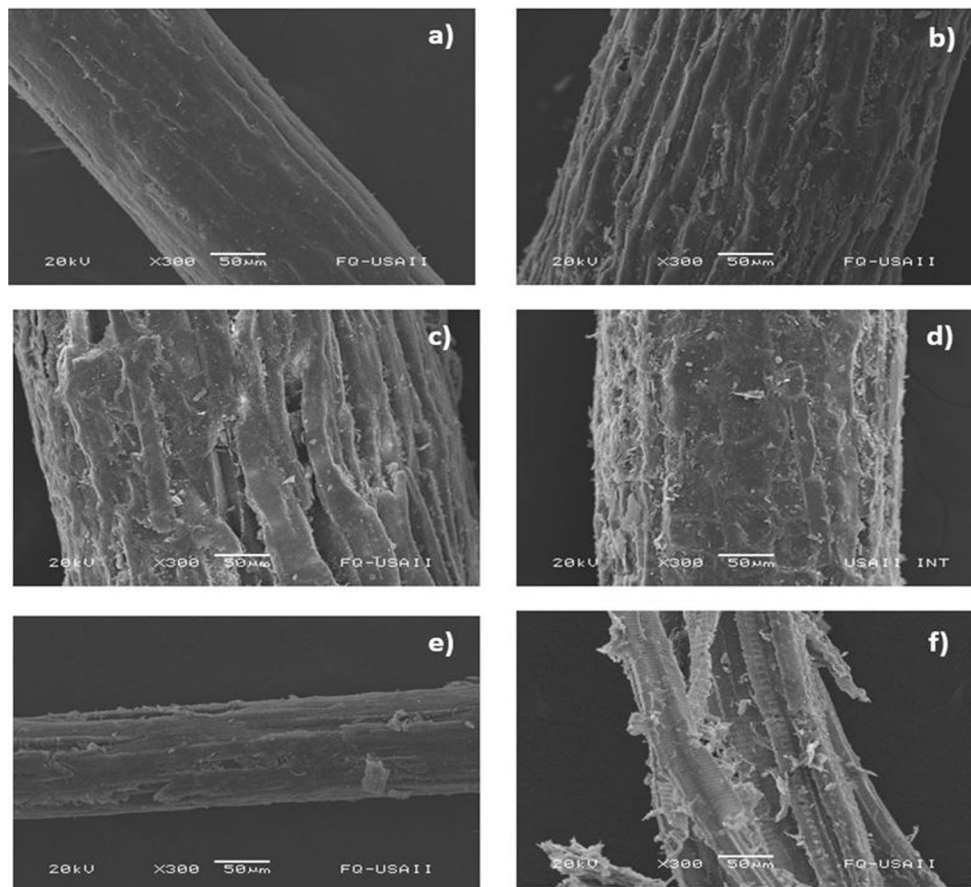
**Fig. 5** Relative furan concentration versus pretreatment: effect of temperature at 100 °C and 120 °C, (●); effect of pressure at 280 bar and 350 bar (■)



furan in foods [48]. Furan derivatives account as the main inhibitors of cellulase activity [49]. This goes in line with Van Walsum [50] who reported that degradation products (i.e., furan derivatives) reduce sugar release as more severe conditions were used. In our case, as shown in Fig. 5, RBAB had a relative furan concentration of 0.402. However, as temperature of treated samples increases,

relative furan values rises from 0.427 to 0.473 at 100 °C and 120 °C, respectively. A similar pattern was observed for pressure, with an increase in furan concentration from 0.427 to 0.464 at 280 bar and 350 bar, respectively. This analytical determination substantiates that a maximum value of EH yield is obtained after 10 min pretreatment at 100 °C and 280 bar.

**Fig. 6** SEM images of **a** RBAB; **b** pretreated BAB at 100°C, 280 bar, and aw 0.973; **c** pretreated BAB at 100°C, 280 bar, and aw 0.34; **d** pretreated BAB at 100°C, 280 bar, and aw 0.082; **e** RBAB after EH; **f** pretreated BAB at 100°C, 280 bar, and aw 0.34 after EH





### 3.6 Effect of SCCO<sub>2</sub> pretreatment on physical properties

BAB samples were characterized in terms of structural and morphological changes due to pretreatment. Surface modifications were followed by scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 6) and porosimetry. SEM photographs of RBAB show a smooth surface without significant alteration in its structure. However, distinct changes in surface morphologies were observed for pretreated BAB, characterized as “holes,” channels, and aggregates over the surface. Besides, an apparent swelling of BAB fibers is observed, possibly related to a deep penetration of CO<sub>2</sub> into the matrix followed by the sudden explosion. Additionally, after EH, obvious differences can be observed into the deconstruction of pretreated BAB against RBAB. Indeed, RBAB maintained its surface morphology almost unaltered in its fiber structure. The opposite was observed for BAB pretreated as small fibrils were detected and original structure of fibers disappeared, suggesting the positive effect of SCCO<sub>2</sub> pretreatment on cellulose activity.

Porosimetry was conducted to measure changes in the dimensions of the surface after treatment. Parameters determined were surface area, pore volume, and pore average diameter (Table 1) resulting from nitrogen isotherms of adsorption-desorption using the BET method.

Analysis revealed a negligible difference on surface area or pore volume between pretreated BAB and RBAB. Only when average pore diameter was analyzed, a considerable difference was observed. Pretreatment at 100 °C, 280 bar, and  $a_w$  0.34 shows the higher difference of pore diameter. Interestingly, the opening of pore is marginal at a high  $a_w$  of 0.973. It seems that a large amount of adsorbed water maintains the integrity of the pore opening.

In summary, bringing together observations of treated BAB by SEM and porosimetry, we can establish that subjecting samples for 10 min at 100 °C, 280 bar, and  $a_w$  0.082, meaningful changes convey to structural and superficial alterations that permit a more efficient enzyme action on the complex lignocellulosic matrix of BAB.

Nonetheless, operating variables normally reach a maximum above which some degradation products are generated as supported by the relative furan concentration analysis.

## 4 Conclusion

SCCO<sub>2</sub> pretreatment of blue agave bagasse at optimal conditions (100 °C, 280 bar, 10 min,  $a_w$  0.082) enhances TRS yield up to 45% above untreated blue agave bagasse. Interestingly, obtained yields of around 90% are equivalent to those obtained by other reported pretreatment methods for blue agave bagasse.

Pretreatment increases digestibility as it results in physical changes at the surface level for a successful EH. This is shown in SEM photographs where small fibrils originally present in the original structure disappeared for samples pretreated with SCCO<sub>2</sub>. Also porosimetry studies show that average pore diameter increases with pretreatment (100 °C, 280 bar,  $a_w$  0.34). It is estimated that such surface modification should permit the enzyme to perform a more efficient hydrolysis.

Conditions that enhance hydrolysis and minimize degradations products depend primarily on low water activity values followed by maximum values for temperature and pressure during the pretreatment process. Results support the concept that water prevents CO<sub>2</sub> penetration within the BAB matrix, reducing its explosive breakage and therefore limiting cellulose enzyme to perform its hydrolytic activity. On the contrary, low water content ( $a_w=0.082$ ) favors production of reducing sugars that should result in a higher yield of bioethanol from blue agave bagasse (BAB) produced by the Tequila Industry. Interestingly, our results at low  $a_w$  discard the hypothesis that more water available would lead to carbonic acid formation favoring the release of reducing sugars from hemicellulose. In any event, the use of  $a_w$  represents the amount of available water and a more precise parameter for hydration studies in contrast to total water content normally used in many studies.

The relative furan concentration analysis emphasize that operating variables normally reach a maximum above which

**Table 1** Parameters measured by porosimetry

Pretreatment	Surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Pore volume × 10 <sup>-4</sup> (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Average pore diameter (nm)
RBAB	0.18	1.8	19.36
100 °C <sup>a</sup>	0.13	1.7	53.54
120 °C <sup>a</sup>	0.28	2.6	36.40
$A_w$ 0.082 <sup>b</sup>	0.16	1.3	32.01
$a_w$ 0.112 <sup>b</sup>	0.26	1.7	26.72
$a_w$ 0.973 <sup>b</sup>	0.18	1.0	22.03

<sup>a</sup> Pretreatment conditions: 280 bar, 10 min,  $a_w$  0.34

<sup>b</sup> Pretreatment conditions: 100 °C, 280 bar, 10 min

some degradation products are generated affecting negatively the RH yield. This is a relevant approach for further studies of lignocellulosic pretreatment.

Finally, in the perspective of a potential industrial application, we are aware that lowering BAB humidity to such low value would require a significant energy input (or a long sun exposure drying time) to bring the material to such low  $a_w$  value. Whether or not an integrated process to convert BAB into bioethanol is energetically feasible would require to consider the whole energetic status of the production facility. Aside from that, an important issue relates to sustainability, since the main concept presented in this research would lead to lessen the environmental damage of an inadequate disposal of substantial amounts of BAB.

**Acknowledgements** We thank Dr Tatiana Klimova from Chemical Engineering Department (Facultad de Química, UNAM) for the porosimetry studies.

**Funding** The author wishes to thank to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the PhD grant number 603689 to AN.

## References

- Henrique M, Silveira L, Morais RC, Costa M (2015) Current pretreatment technologies for the development of cellulose ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*. 8:3366–3390
- Sánchez ÓJ, Cardona CA (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 99:5270–5295
- Akhtar N, Gupta K, Goyal D, Goyal A (2016) Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Environ Prog Sustain Energy* 35:489–511
- Haghighi S, Hossein A, Tabatabaei M (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sust Energ Rev* 27:77–93
- Blanch HW, Simmons BA, Klein-Marcuschamer D (2011) Biomass deconstruction to sugars. *Biotechnol J* 6:1086–1102
- Gu T (2013) Pretreatment of lignocellulosic biomass using supercritical carbon dioxide as a green solvent. In: Gu T (ed) *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*, Springer, Netherlands. pp 107–125
- Weber B, Sandoval-Moctezuma AC, Estrada-Maya A, Martínez-Cienfuegos IG, Durán-García MD (2020) Agave bagasse response to steam explosion and anaerobic treatment. *Biomass Convers Bior* 10:1279–1289
- Morais A, da Costa Lopes AM, Bogel-Lukasik R (2015) Carbon dioxide in biomass processing: Contributions to the green biorefinery concept. *Chem Rev* 115:3–27
- Zheng Y, Lin H, Tsao GT (1998) Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol Prog* 14:890–896
- Ferreira Santos AL, Fausta Kawase KY, Vieira Coelho GL (2011) Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* 56:277–282
- Gao M, Xu F, Li S, Ji X, Chen S, Zhang D (2010) Effect of SC-CO<sub>2</sub> pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. *Biosyst Eng* 106:470–475
- Liu Y, Luo P, Xu Q, Wang E, Yin J (2014) Investigation of the effect of supercritical carbon dioxide pretreatment on reducing sugar yield of lignocellulose hydrolysis. *Cellul Chem Technol* 48:89–95
- Narayanaswamy N, Faik A, Goetz DJ, Gu T (2011) Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. *Bioresour Technol* 102:6995–7000
- Park CY, Ryu YW, Kim C (2001) Kinetics and Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Supercritical Carbon Dioxide. *Korean J Chem Eng* 18:475–478
- Alinia R, Zabihi S, Esmaeilzadeh F, Kalajahi JF (2010) Pretreatment of wheat straw by supercritical CO<sub>2</sub> and its enzymatic hydrolysis for sugar production. *Biosyst Eng* 107:61–66
- Srinivasan N, Ju L-K (2010) Pretreatment of guayule biomass using supercritical carbon dioxide-based method. *Bioresour Technol* 101:9785–9791
- Serna LVD, Alzate CEO, Alzate CAC (2016) Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 199:113–120
- Che Hamzah NH, Markom M, Hassan O, Harun S (2015) Investigation of the effect of supercritical carbon dioxide pretreatment on sugar yield prior to enzymatic hydrolysis of empty fruit bunches. *Ind Biotechnol* 11:272–276
- Henrique M, Silveira L, Angelo B, Lucio M, Pereira L (2015) Supercritical carbon dioxide combined with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and ethanol for the pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 192:389–396
- Phan DT, Tan C-S (2014) Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> followed by alkaline hydrogen peroxide. *Bioresour Technol* 167:192–197
- Huisheng L, Miaomiao R, Minhua Z, Ying C (2013) Pretreatment of corn stover using supercritical CO<sub>2</sub> with water-ethanol as co-solvent. *Chin J Chem Eng* 21:551–557
- Pasquini D, Pimenta MTB, Ferreira LH, Curvelo AAS (2005) Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO<sub>2</sub> associated with co-solvent 1-butanol / water. *J Supercrit Fluids* 34:125–131
- Benazzi T, Calgaroto S, Astolfi V, Dalla Rosa C, Oliveira JV, Mazutti MA (2013) Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. *Enzym Microb Technol* 52:247–250
- Yin J, Hao L, Yu W, Wang E, Zhao M, Xu Q, Liu Y (2014) Enzymatic hydrolysis enhancement of corn lignocellulose by supercritical CO<sub>2</sub> combined with ultrasound pretreatment. *Chin J Catal* 35:763–769
- Barrera I, Amezcua-Allieri MA, Estupiñan L, Martínez T, Aburto J (2016) Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: case of sugarcane and blue agave bagasses. *Chem Eng Res Des* 107:91–101
- CRT (2018) Consumo de agave para Tequila y Tequila 100% de agave. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>. Accessed July 2, 2019
- Hernández-Salas JM, Villa-Ramírez MS, Veloz-Rendón JS, Rivera-Hernández KN, González-César RA, Plascencia-Espinosa MA, Trejo-Estrada SR (2009) Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresour Technol* 100:1238–1245
- Aguilar DL, Rodríguez-Jasso RM, Zanuso E, de Rodríguez DJ, Amaya-Delgado L, Sanchez A, Ruiz HA (2018) Scale-up and evaluation of hydrothermal pretreatment in isothermal and non-isothermal regimen for bioethanol production using agave bagasse. *Bioresour Technol* 263:112–119
- Ávila-Lara AI, Camberos-Flores JN, Mendoza-Pérez JA, Messina-Fernández SR, Saldaña-Duran CE, Jimenez-Ruiz EI, Sánchez-Herrera LM, Pérez-Pimienta JA (2015) Optimization of alkaline

- and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response surface methodology. *Front Bioeng Biotechnol* 3:1–10
30. Caspeta L, Caro-Bermúdez MA, Ponce-Noyola T, Martínez A (2014) Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energy* 113:277–286
  31. Flores-Gómez CA, Escamilla Silva EM, Zhong C, Dale BE, da Costa Sousa L, Balan V (2018) Conversion of lignocellulosic agave residues into liquid biofuels using an AFEX<sup>TM</sup>-based biorefinery. *Biotechnol Biofuels* 11:1–18
  32. Montiel C, Hernández-Meléndez O, Vivaldo-Lima E, Hernández-Luna M, Bárzana E (2016) Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion-saccharification process. *Bioenerg Res* 9:1005–1014
  33. Perez-Pimienta JA, Icaza-Herrera JPA, Méndez-Pérez JA, González-Álvarez V, Méndez-Acosta HO, Arreola-Vargas J (2019) Mild reaction conditions induce high sugar yields during the pretreatment of Agave tequilana bagasse with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Bioresour Technol* 275:78–85
  34. Saucedo-Luna J, Castro-Montoya AJ, Martínez-Pachecho MM, Sosa-Aguirre CR, Campos-García J (2011) Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:725–732
  35. Vandenbossche V, Brault J, Vilarem G, Hernández-Meléndez O, Vivaldo-Lima E, Hernández-Luna M, Barzana E, Duque A, Manzanares P, Ballesteros M, Mata J, Castellón E, Rigal L (2014) A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Ind Crop Prod* 55:258–266
  36. Equihua-Sánchez M, Barahona-Pérez LF (2019) Physical and chemical characterization of Agave tequilana bagasse pretreated with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Waste Biomass Valorization* 10:1285–1294
  37. Luterbacher JS, Tester JW, Walker LP (2012) Two-temperature stage biphasic CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O pretreatment of lignocellulosic biomass at high solid loadings. *Biotechnol Bioeng* 109:1499–1507
  38. King JW, Srinivas K, Guevara O, Lu Y, Zhang D, Wang Y (2012) Reactive high pressure carbonated water pretreatment prior to enzymatic saccharification of biomass substrates. *J Supercrit Fluids* 66:221–231
  39. Kim KH, Hong J (2001) Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresour Technol* 77:139–144
  40. Hernández-Meléndez O, Miguel-Cruz F, Montiel C, Hernández-Luna M, Vivaldo-Lima E, Mena-Brito C, Bárzana E (2016) Characterization of blue agave bagasse (BAB) as raw material for bioethanol production processes by gravimetric, thermal, chromatographic, X-ray diffraction, microscopy, and laser light scattering techniques. *Bioenerg Res* 9:985–997
  41. Fontana Jr AJ (2020) A: Water Activity of Saturated Salt Solutions. In: Barbosa-Cánovas, G (ed) *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, 2nd edn. Wiley & Sons Inc., pp 553–555
  42. Martínez A, Rodríguez ME, York SW, Preston JF, Ingram LO (2000) Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnol Prog* 16:637–641
  43. Zhao M, Xu Q, Li G, Zhang Q, Zhou D, Yin J, Zhan H (2019) Pretreatment of agricultural residues by supercritical CO<sub>2</sub> at 50–80 °C to enhance enzymatic hydrolysis. *J Energy Chem* 31:39–45
  44. Zhang Q, Zhao M, Xu Q, Ren H, Yin J (2019) Enhanced enzymatic hydrolysis of sorghum stalk by supercritical carbon dioxide and ultrasonic pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol* 188:101–111
  45. NIST (2019) Isothermal properties of carbon dioxide. [https://webbook.nist.gov/cgi/fluid.cgi?T=100&PLow=0&PHigh=350&PInc=10&Applet=on&Digits=5&ID=C124389&Action=Load&Type=IsoTherm&TUnit=C&PUnit=bar&DUnit=kg%2Fm3&HUnit=kJ%2Fmol&WUnit=m%2Fs&VisUnit=uPa\\*s&STUnit=N%2Fm&RefState=DEF](https://webbook.nist.gov/cgi/fluid.cgi?T=100&PLow=0&PHigh=350&PInc=10&Applet=on&Digits=5&ID=C124389&Action=Load&Type=IsoTherm&TUnit=C&PUnit=bar&DUnit=kg%2Fm3&HUnit=kJ%2Fmol&WUnit=m%2Fs&VisUnit=uPa*s&STUnit=N%2Fm&RefState=DEF). Accessed July 2, 2019
  46. Rosero-Henao JC, Bueno BE, de Souza R, Ribeiro R, Lopes de Oliveira A, Gomide CA, Gomes TM, Tommaso G (2019) Potential benefits of near critical and supercritical pre-treatment of lignocellulosic biomass towards anaerobic digestion. *Waste Manag Res* 37:74–82
  47. Acharjee TC, Coronella CJ, Vasquez VR (2011) Effect of thermal pretreatment on equilibrium moisture content of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 102:4849–4854
  48. Moro S, Chipman JK, Wegener JW, Hamberger C, Dekant W, Mally A (2012) Furan in heat-treated foods: formation, exposure, toxicity, and aspects of risk assessment. *Mol Nutr Food Res* 56:1197–1211
  49. Jing X, Zhang X, Bao J (2009) Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 159:696–707
  50. van Walsum GP, Shi H (2004) Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. *Bioresour Technol* 93:217–226

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.