



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

EFFECTO DE LOS PRETRATAMIENTOS
HIDROTÉRMICOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA
Y LA SACARIFICACIÓN DEL BAGAZO DE *Agave
tequilana*

Tesis que presenta

JOSÉ ALBERTO ZUMÁRRAGA PECH

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán a 29 de Marzo de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

José Alberto Zumárraga Pech

Mérida, Yucatán a 29 de marzo de 2012

El presente trabajo de tesis se realizó en los laboratorios de la Unidad de Energía Renovable y de la Unidad de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Gonzalo Canché Escamilla.

Dr. Oscar Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Gonzalo Canché Escamilla por sus consejos, paciencia y asesoría durante el tiempo en que se realizó el presente trabajo.

Al comité tutorial, Dr. Felipe Barahona Pérez y Dr. Francisco Moscoso Sánchez, por sus consejos, apoyo y por tomarse su tiempo en revisar y aportar ideas a la realización del trabajo de tesis tanto escrito como experimental.

A mis revisores, Dr. Manuel Cervantes Uc y Dr. Julio Sacramento Rivero, por tomarse su tiempo en revisar, comentar y realizar aportaciones valiosas para realzar el trabajo de tesis.

A la Dra. Rocío Borges Argáez, por el préstamo del equipo de cromatografía líquida a su cargo, para la realización del trabajo experimental así como préstamo de material para la realización de esta técnica cromatográfica.

A los valiosos y siempre atentos técnicos de laboratorio empezando por el Q.I. Santiago Duarte Aranda por su ayuda y asistencia técnica en las micrografías de SEM, microscopía óptica y análisis termogravimétrico. A la técnica Q.B.B. Mirbella Cáceres Farfán por su asistencia técnica en todo lo relacionado con las técnicas de cromatografía líquida (HPLC). Por último, pero no menos importante al técnico, M en C. Jorge Domínguez Maldonado, por su asesoría técnica en cromatografía, técnicas de laboratorio y su ayuda en la implementación del sistema de explosión de vapor.

A CONACYT por la beca No. 236010 otorgada para los estudios de posgrado.

A mi amigo y la persona que siempre me alentó a estudiar un posgrado IQI. Daniel Campos Sáenz, gracias por creer en mí siempre, aportar ideas valiosas y siempre brindarme tu apoyo y amistad

A todos mis compañeros y amigos de maestría en especial a: Roberto Us, Santiago Franco, Pablo Villegas, Ana Laura Arjona, Limberg Gómez, Diana Sánchez, Igor Peniche,

Nancy Eb, Marisa Morales, Christy Pérez, Orlando García, Isaías Peraza, Joana Pompeyo, Alain Aguilar, Angela Ku y Ricardo Ochoa, gracias por sus consejos y amistad siempre serán parte valiosa de mi vida.

A mi familia, tíos, primos y abuelos en especial a mi abuela, Alina Barbudo Peña, que siempre me han brindado su apoyo en cada una de mis decisiones.

A mis padres, Alberto Zumárraga Barbudo y Pilar Pech Caballero, y hermanos: Priscilla Zumárraga y Javier Gamboa Ancona, por siempre estar pendientes de mí y por siempre recordarme los ideales por los que he luchado, los amo.

Y por último, pero no menos importante a ti el gran amor de mi vida, mi esposa Maricela, que siempre has apoyado mis decisiones, me aconsejas y regañas para que nunca deje de luchar por mis ideales y lo que en verdad quiero. El mayor éxito de mi vida es haberte conocido y casado contigo, te amo.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	3
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO COMO FUENTE DE ENERGIA.....	5
1.2 COMPOSICION QUIMICA DE LA LIGNOCELULOSA	7
1.2.1 CELULOSA.....	8
1.2.2 HEMICELULOSA.....	10
1.2.3 LIGNINA	11
1.3 PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.....	12
1.4 PRETRATAMIENTOS	13
1.5 PRETRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS	15
1.6 HIDRÓLISIS DE CELULOSA Y HEMICELULOSA (SACARIFICACIÓN).....	17
1.6.1 HIDRÓLISIS QUÍMICA.....	18
1.6.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	19
1.7 BAGAZO DE <i>Agave tequilana</i>	20
CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL.....	24

2.1 MATERIA PRIMA	24
2.2 PRETRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE	24
2.3 PRETRATAMIENTO DE EXPLOSIÓN DE VAPOR	24
2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA OBTENIDA DESPUES DE LOS PRETRATAMIENTOS	25
2.4.1 DETERMINACIÓN DE EXTRAÍBLES	25
2.4.2 DETERMINACIÓN DE LIGNINA KLASON.....	26
2.4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	26
2.4.4 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.....	26
2.5 CARACTERIZACIÓN FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA DESPUES DE LOS PRETRATAMIENTOS	27
2.5.1 MEDICIÓN DE AZÚCARES TOTALES.....	27
2.5.2 MEDICIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	27
2.6 SACARIFICACION DE LAS FIBRAS PRETRATADAS.....	28
2.6.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	28
2.6.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	28
2.6.3 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES POR HPLC.....	29
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA OBTENIDA DESPUES DEL TRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE.....	30
3.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	30
3.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	32
3.1.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.....	34
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA DESPUES DEL PRETRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE	36
3.3 SACARIFICACION DE LAS FIBRAS PRETRATADAS CON AGUA CALIENTE	38

3.3.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	38
3.3.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	41
3.3.3 CÁLCULO DEL RENDIMIENTO TEÓRICO DE ETANOL	43
3.4 PRETRATAMIENTO POR EXPLOSIÓN DE VAPOR	43
3.4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA.....	43
3.4.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO	44
3.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	45
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos	6
Tabla 1.2 Procesos de pretratamientos de materiales lignocelulósicos	14
Tabla 1.3 Composición química del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	21
Tabla 3.1 Composición de la fracción sólida obtenida después del pretratamiento con agua caliente de las fibras de <i>A. tequilana</i> (base 100 g de fibra).....	31
Tabla 3.2 Azúcares, sólidos solubles y pH de la fracción líquida obtenida después del tratamiento con agua caliente de las fibras del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	37
Tabla 3.3 Cuantificación de azúcares obtenidos por hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ al 2 % y a 125 °C de las fibras tratadas con agua caliente.....	39
Tabla 3.4 Cuantificación de azúcares obtenidos por hidrólisis ácida con H ₂ SO ₄ al 5 % y a 125 °C de las fibras tratadas con agua caliente.....	40
Tabla 3.5 Cuantificación de azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática de las fibras tratadas con agua caliente	42
Tabla 3.6 Composición química de la fracción sólida obtenida después del pretratamiento por explosión de vapor de las fibras de <i>A. tequilana</i> (base 100 g de fibra).....	44
Tabla 3.7 Cuantificación de azúcares obtenidos mediante hidrólisis enzimática de las fibras tratadas por explosión de vapor posterior a hidrólisis enzimática.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Proceso general de las etapas de bioconversión de lignocelulosa en productos de valor agregado	7
Figura 1.2 Estructura de la celulosa y de su unidad monomérica, la celobiosa	8
Figura 1.3 Estructura de la hemicelulosa	10
Figura 1.4 Estructura de la lignina.....	12
Figura 1.5 Proceso de obtención de etanol a partir de material lignocelulósico.....	13
Figura 1.6 Composición de materiales lignocelulósicos y productos de la hidrólisis química.....	19
Figura 1.7 Anatomía del Agave.....	22
Figura 3.1 Micrografía MEB (500x) de la fibra del bagazo de <i>A. tequilana</i>	32
Figura 3.2 Micrografía MEB (500x) de la fibra del <i>A. tequilana</i> con una hora de residencia después de alcanzar la temperatura de trabajo	33
Figura 3.3 Termogramas de TGA y DTGA de las fibras del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	36
Figura 3.4 Cromatograma de xilosa de la fibra pretratada 150 °C/1 min e hidrolizada químicamente al 2 %/ 20 min.....	39
Figura 3.5 Cromatograma de glucosa de la fibra pretratada a 210 °C/60 min e hidrolizada enzimáticamente	41
Figura 3.6 Micrografías de MEB (250 x) de fibras tratadas por explosión de vapor	45

RESUMEN

En este trabajo, se evaluó el efecto de las condiciones de operación de los pretratamientos hidrotérmicos, agua caliente y explosión de vapor, sobre la composición química y la sacarificación de las fibras del bagazo del *Agave tequilana*. Para el pretratamiento con agua caliente se utilizaron cuatro temperaturas de trabajo: 150, 170, 190 y 210 °C y dos tiempos de residencia: 1 minuto y 60 minutos. Para el pretratamiento por explosión de vapor se utilizaron dos presiones de trabajo: 5 y 10 bar. La fracción líquida obtenida en los pretratamientos se caracterizó mediante la determinación de azúcares totales y reductores. La fracción sólida se caracterizó mediante la determinación de su composición química (extraíbles, lignina y holocelulosa), análisis termogravimétrico y se observó los cambios en la superficie de la fibra mediante microscopía electrónica de barrido. El pretratamiento hidrotérmico de agua caliente solubiliza componentes de bajo peso molecular presente en la fibra de bagazo de *Agave tequilana* y los generados a través de la ruptura hidrolítica de las cadenas de hemicelulosa y de celulosa como lo muestran los análisis termogravimétricos. La microscopía electrónica de barrido mostró modificación superficial de las fibras. La sacarificación de las de las fibras pretratadas, rindieron xilosa y glucosa cuando se utilizaron hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática con celulasas, respectivamente. En la hidrólisis ácida se hidrolizan principalmente las cadenas de hemicelulosa mientras que en la hidrólisis enzimática se hidrolizan las cadenas de celulosa. El rendimiento de glucosa de la hidrólisis enzimática de las fibras pretratadas por explosión de vapor fueron menores en comparación con los obtenidos para las fibras pretratadas con agua caliente. Esto se puede atribuir a las bajas presiones que se usaron en la explosión de vapor y que no lograron aperturar la fibra de manera adecuada. La máxima concentración de azúcares (33.78 mg/ml) se obtuvo con el pretratamiento de agua caliente (210 °C/60 minutos) y con hidrólisis enzimática. Los hidrolizados enzimáticos presentan mayor concentración de azúcares conforme la fibra es tratada a mayor temperatura y tiempos de residencia.

ABSTRACT

In the present work, the effect of operating conditions of the hydrothermal pretreatment, hot water and steam explosion, on the chemical composition and saccharification of bagasse fibers of Agave tequilana was evaluated. Four working temperatures: 150, 170, 190 and 210 ° C and two residence times: 1 minute and 60 minutes for pretreatment with hot water were used. For steam explosion pretreatment two pressures: 5 and 10 bar were used. The liquid fraction obtained in the pretreatment, was characterized by determination of sugars total and reducing. The solid fraction was characterized by their determination chemical composition (extractable, lignin and holocellulose), thermogravimetric analysis and the changes in the fiber surface was observed by scanning electron microscopy (SEM). The hot water pretreatment solubilized low molecular weight components present in bagasse fiber of Agave tequilana and the generated through the hydrolytic breakdown of hemicellulose chains and cellulose as shown by thermogravimetric analysis. Scanning electron microscopy showed surface modification of the fibers. Saccharification of pretreated fiber, yielded xylose and glucose when was used acid hydrolysis or enzymatic hydrolysis with cellulases, respectively. In the acid hydrolysis are hydrolyzed mainly hemicellulose chains whereas in the enzymatic hydrolysis are hydrolyzed cellulose chains. The yield of glucose from the enzymatic hydrolysis of the fibers pretreated by steam explosion were lower compared with those obtained for fibers pretreated with hot water. This can be attributed to the low pressures used in the steam explosion and that the fiber aperture failed. The maximum concentration of sugars (33.78 mg / ml) was obtained with hot water pretreatment (210 °C and 60 minutes) and enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysates have a higher concentration of sugars agreement the fiber is treated at higher temperatures and residence times.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la principal fuente de material renovable es la lignocelulosa. Este compuesto tiene una tasa de síntesis de 4×10^9 toneladas anuales a nivel mundial y se compone de lignina, hemicelulosa y celulosa. Incluye plantas enteras, partes de plantas (por ejemplo, semillas, tallos), residuos agroindustriales, componentes de la planta (por ejemplo, almidón, lípidos, proteínas y fibra), subproductos de la transformación (los granos de destilería, solubles de maíz) y los materiales de origen marino [1,2]. Cada uno de estos componentes tiene propiedades físicas y químicas que los hacen substratos de interés para ser usados en procesos biotecnológicos, debido a su bajo costo y a su amplia disponibilidad [3]. En este sentido, en México se generan residuos agroindustriales, de las industrias del papel y forestal, que pudieran ser aprovechados para obtener productos de valor agregado [3]. La biomasa residual es abundante y se ha demostrado que es factible convertirla en diferentes productos como biocombustible, alimento animal, compostas y productos químicos, entre otros [4]. Dentro de estos residuos agroindustriales se encuentra el bagazo de *Agave tequilana*. Este es un desecho derivado del proceso de producción del Tequila y del cual se generan anualmente en México cerca de 1.05×10^8 kg. De esta cantidad, solamente una pequeña porción es utilizada para preparar composta y el resto es desechado, por lo que su disposición representa un problema para dicha industria [5].

Hasta el momento, se han llevado a cabo diferentes estudios para proponer un remedio a la problemática del bagazo del agave tequilero, sin embargo no existe una solución definitiva, por lo que la necesidad de desarrollar otras tecnologías para su aprovechamiento resulta evidente [3]. El bagazo de *Agave tequilana* es rico en polisacáridos (celulosa 41.6 % y hemicelulosa 12.1 %, base peso seco) por lo que puede ser una fuente apropiada para producir bioetanol lignocelulósico a partir de la fermentación de los azúcares obtenidos de este residuo lignocelulósico. Sin embargo, la estructura compleja que forma las fibras lignocelulósicas, en donde la lignina y la hemicelulosa protegen a la celulosa de ataque químico o biológico y la cristalinidad de la celulosa misma, limitan los procesos de sacarificación ya sea químico o biológico [6]. Debido a lo anterior, es necesario realizar pretratamientos químicos o biológicos, previos a los procesos de sacarificación, que permita la remoción de la lignina, la disminución de la cristalinidad de la celulosa y el aumento de la porosidad de los materiales, para facilitar el acceso de los reactivos químicos o de las enzimas durante el proceso de sacarificación,

con el fin de obtener altos rendimientos de azúcares fermentables [6]. Las ventajas de los pretratamientos hidrotérmicos con respecto a otros pretratamientos (ácidos o básicos), es que éstos no utilizan agentes químicos, solamente se requiere agua y/o vapor de agua presurizados, con temperaturas que oscilan entre 150 a 250 °C y presiones entre 0.69 a 4.85 MPa, durante uno a varios minutos. El pretratamiento con agua caliente facilita que la celulosa sea desdoblada a glucosa en un porcentaje mayor al 90 % durante la etapa de hidrólisis, ya que remueve principalmente la hemicelulosa que limita la accesibilidad de los reactivos hacia la celulosa [6]. En el caso del pretratamiento por explosión de vapor, éste despolimeriza en un bajo porcentaje bajo, la celulosa en glucosa durante el pretratamiento, pero logra aperturar las fibras (obtención de microfibrillas) y aumentar el área superficial o redistribuir de mejor forma la lignina que el pretratamiento de agua caliente y con esto lograr mejores condiciones para hidrólisis química o enzimática [7].

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de diferentes condiciones de operación (temperatura y tiempo de residencia o presión de vapor) de los pretratamientos hidrotérmicos con agua caliente y por explosión de vapor. Éstos pretratamientos intentan modificar o aperturar la estructura del material lignocelulósico, con el fin de facilitar la conversión de la celulosa en glucosa durante la sacarificación ácida o enzimática y con esto lograr una mayor recuperación de los azúcares presentes en los polisacáridos (hemicelulosa y celulosa) que están presentes en las fibras de bagazo de *A. tequilana*.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El bagazo de *Agave tequilana* es un desecho derivado del proceso de producción del Tequila y del cual se generan anualmente en México cerca de 1.05×10^5 toneladas. Este desecho es rico en polisacáridos (celulosa 41.6 % y hemicelulosa 12.1 %, base peso seco) por lo que puede ser una fuente apropiada para producir bioetanol lignocelulósico. Sin embargo, la estructura compleja, en donde la lignina (7.2% base peso seco) y la hemicelulosa protegen a la celulosa de ataque químico o biológico así como la cristalinidad de la celulosa, limitan los procesos de sacarificación. Debido a lo anterior, es necesario realizar pretratamientos químicos o biológicos, previos a los procesos de sacarificación, que permitan la remoción de la lignina, disminuyan la cristalinidad de la celulosa y aumenten la porosidad de los materiales, con el fin de obtener altos rendimientos de azúcares fermentables.

Se han estudiado diversos pretratamientos para la producción de bioetanol a partir del bagazo de *Agave tequilana*, los más comunes utilizando diferentes concentraciones de ácido sulfúrico y temperaturas que oscilan entre 150 a 200 °C en reactores presurizados. La desventaja de estos pretratamientos es la alta producción de compuestos inhibidores que se generan durante el proceso, la generación de residuos y los bajos rendimientos de azúcares fermentables que se producen [7].

Los pretratamientos hidrotérmicos brindan ventajas como mayor recuperación del material sólido, menor producción de compuestos inhibidores y mejora la eficiencia de los procesos de hidrólisis ácida y/o enzimática del material pretratado.

En el presente trabajo se pretende evaluar dos tipos de pretratamiento en los residuos de *Agave tequilana*: explosión de vapor y agua caliente, donde se investigará la temperatura y el tiempo óptimo a la cual se producen mayores rendimientos de azúcares fermentables en la fracción líquida así como evaluar la composición de los materiales extraíbles de la fracción sólida (celulosa, hemicelulosa y lignina).

OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo general

Determinar el efecto de dos pretratamientos hidrotérmicos (agua caliente y explosión de vapor) sobre la composición química del bagazo de *Agave tequilana*, y sobre la sacarificación ácida y/o enzimática del bagazo pretratado.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de los pretratamientos hidrotérmicos con agua caliente y de la presión en los pretratamientos por explosión de vapor sobre la composición química del bagazo de *A. tequilana*.

2. Determinar el efecto de los pretratamientos hidrotérmicos (agua caliente y explosión de vapor) sobre la eficiencia de la sacarificación ácida y/o enzimática del bagazo de *A. tequilana*.

3. Determinar la composición de azúcares presentes en la fracción líquida recuperada después de los pretratamientos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO COMO FUENTE DE ENERGIA

Se ha señalado que el rendimiento mundial anual de biomasa, toda materia orgánica producida a partir del proceso de fotosíntesis de las plantas, contiene la energía inherente suficiente para contribuir con el 20-100% del consumo total anual de energía del mundo que es de 500 EJ (1 EJ = 1×10^{18} julios), aun considerando las variaciones anuales y regionales [8,9,10]. La biomasa puede incluir plantas enteras, partes de plantas (por ejemplo, semillas, tallos), los componentes de la planta (por ejemplo, almidón, lípidos, proteínas y fibra), subproductos de la transformación (los granos de destilería, solubles de maíz), residuos animales y los materiales de origen marino [1].

La biomasa lignocelulósica o lignocelulosa es aquella que se obtiene de las plantas. La lignocelulosa es el material más abundante en nuestro planeta, se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, cuyas proporciones en las plantas varían de la siguiente manera: 20-55% de celulosa, 16-85% de hemicelulosa y de 15 a 40% de lignina y que se combinan en una matriz molecular, con un contenido relativamente bajo de monosacáridos, proteínas, almidón o aceites [11,12]. En la tabla 1.1 se muestra la composición química de diferentes materiales lignocelulósicos.

Estos materiales pueden ser utilizados para crear nuevos biomateriales, lo cual, requerirá una comprensión de la composición de la materia prima a utilizar, ya sea la biomasa entera o alguno de sus componentes, de modo que los elementos deseables puedan ser obtenidos para la producción de bioproductos de valor agregado. En la Figura 1.1 se esquematiza de manera general la bioconversión de biomasa lignocelulósica en productos de valor agregado [11]. El gran potencial de la lignocelulosa como materia prima para la producción de biocombustibles aún no se aprovecha y su aplicación en esas áreas depende del desarrollo de la producción sustentable de la biomasa, así como de los sistemas de transformación a biocombustibles [1].

Dos plataformas se han creado para transformar la energía de la biomasa lignocelulósica en combustibles líquidos o sustancias químicas: la plataforma de azúcar y la plataforma termoquímica. En la plataforma de azúcar, el material lignocelulósico es primero pretratado para facilitar la separación en sus componentes principales, a continuación los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) son hidrolizados para recuperar los azúcares (hexosas y pentosas) que los conforman. Estos azúcares pueden ser

fermentados en biocombustibles o ser convertidos en otros productos químicos intermedios valiosos [12].

Tabla 1.1 Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos [6]

Material Lingocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Tallos de Maderas duras	40–55	24–40	18–25
Tallos de madera blanda	45–50	25–35	25–35
Cáscaras de frutos secos	25–30	25–30	30–40
Mazorcas de maíz	45	35	15
Gramíneas	25–40	35–50	10–30
Papel	85–99	0	0–15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15–20	80–85	0
Pelos de semillas de algodón	80–95	5–20	0
Papel periódico	40–55	25–40	18–30
Documentos de residuos de pasta química	60–70	10–20	5–10
Sólidos de aguas residuales primarias	8–15		24–29
Residuos porcinos	6	28	
Sólidos de estiércol de ganado	1.6–4.7	1.4–3.3	2.7–5.7
Pasto Coastal Bermuda	25	35.7	6.4
Pasto de cambio	45	31.4	12

Los efectos beneficiosos del pretratamiento en los materiales lignocelulósicos se han reconocido durante mucho tiempo. El objetivo del proceso de pretratamiento es eliminar la lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, y aumentar la porosidad de los materiales lignocelulósicos. El pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos: (1) mejorar la formación de azúcares o la capacidad para formar posteriormente azúcares por hidrólisis, (2) evitar la degradación o la pérdida de hidratos de carbono, (3) evitar la formación de subproductos que son inhibidores de la posterior hidrólisis y fermentación de los procesos, y (4) ser rentable. Métodos de pretratamiento se pueden dividir en diferentes categorías: físicos (molienda y trituración), físico-químicos (tratamiento previo de vapor / autohidrólisis, hidrotermólisis, y la oxidación húmeda), químicos (alcalinos, ácido diluido, agentes oxidantes y disolventes orgánicos), biológicos, eléctricos, o una combinación de éstos. El seguimiento de tecnologías de los pretratamientos, es una promesa rentable para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la conversión biológica a combustibles y productos químicos

Dos plataformas se han creado para transformar la energía de la biomasa lignocelulósica en combustibles líquidos o sustancias químicas: la plataforma de azúcar y la plataforma termoquímica. En la plataforma de azúcar, el material lignocelulósico es primero pretratado para facilitar la separación en sus componentes principales, a continuación los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) son hidrolizados para recuperar los azúcares (hexosas y pentosas) que los conforman. Estos azúcares pueden ser fermentados en biocombustibles o ser convertidos en otros productos químicos intermedios valiosos [13].

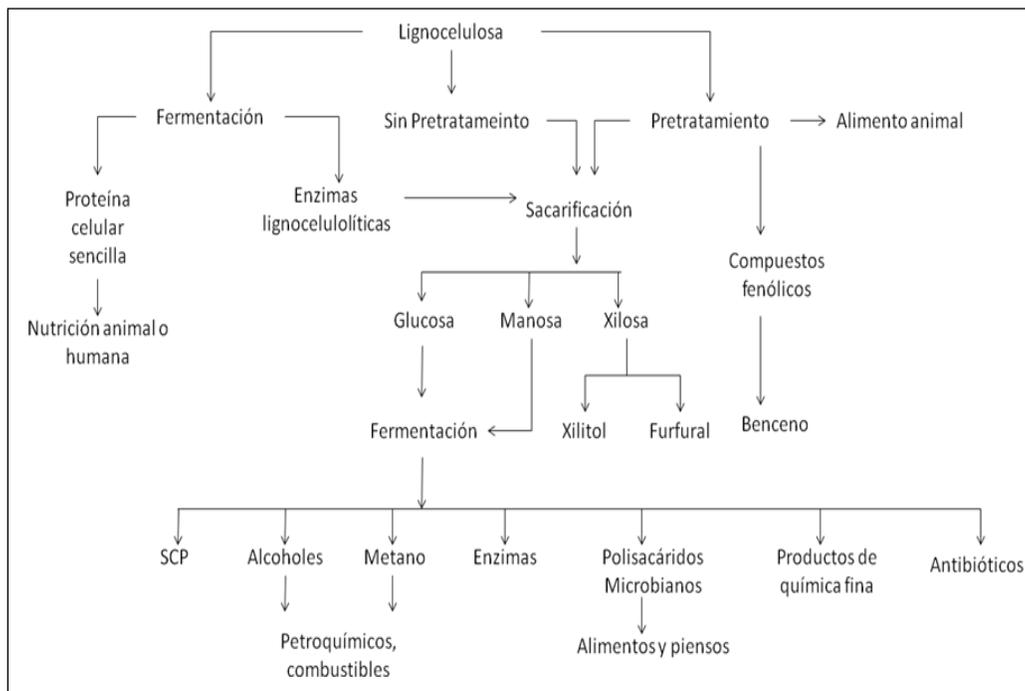


Figura 1.1 Proceso general de las etapas de bioconversión de lignocelulosa en productos de valor agregado [11]

1.2 COMPOSICION QUIMICA DE LA LIGNOCELULOSA

Los principales constituyentes de la pared celular de los vegetales, y por lo tanto de la lignocelulosa son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, como se observa en la Tabla 1.1 en la que se señala la composición de diferentes materiales lignocelulósicos. La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos mientras que la lignina está constituida por estructuras fenólicas en forma de una red polimérica. La proporción relativa de estos componentes varía de planta a planta, del tipo de células y de su estado de desarrollo. A

continuación se describen las características de cada uno de los principales componentes de la lignocelulosa.

1.2.1 CELULOSA

La celulosa es un polímero formado por microfibrillas cristalinas insolubles, rodeadas por cadenas de celulosa amorfa, que son muy resistentes a la hidrólisis enzimática. Su estructura es lineal y está formada por unidades de glucosa unidas por enlaces etéricos β -1,4 (Figura 1.2). En estas cadenas, de entre 100 y 14,000 unidades, cada residuo gira 180 grados con respecto a sus vecinos, por lo que se considera que la unidad básica de la celulosa es la celobiosa [14]. Estas estructuras forman microfibrillas que a su vez, al unirse entre ellas, forman principalmente arreglos cristalinos y algunos arreglos amorfos.

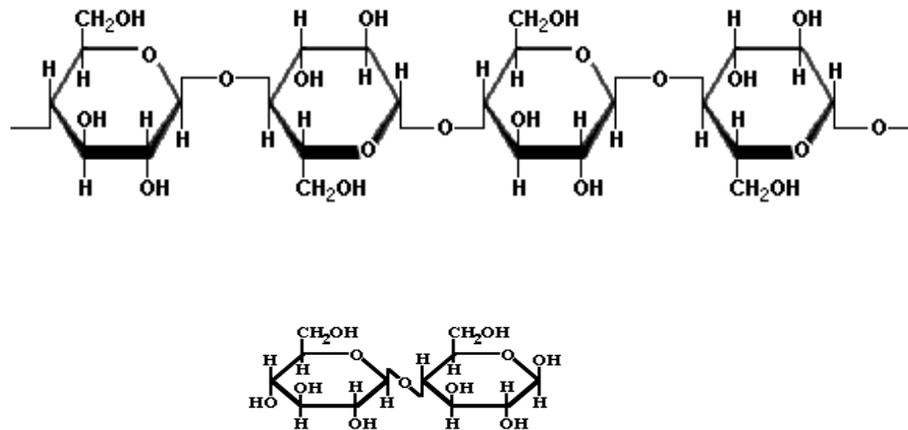


Figura 1.2 Estructura de la celulosa y de su unidad monomérica, la celobiosa [14]

La celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal, se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares vegetales, aunque también es producida por algunos animales y unas pocas bacterias. A pesar de las grandes diferencias en la composición y en la estructura anatómica de las paredes celulares de las plantas, un alto contenido de celulosa (normalmente en el intervalo de aproximadamente 35 a 50% del peso seco de la planta), es una característica común entre ellas [15]. En unos pocos casos (en particular, las cápsulas de algodón), la celulosa está en un estado casi puro. En la mayoría de los casos, sin embargo, las fibras de celulosa están

incrustadas en una matriz de otros biopolímeros estructurales, principalmente hemicelulosa y lignina, que constituyen del 20 al 35 y del 5 al 30%, respectivamente del peso seco de la planta. Una característica importante de la celulosa, que es relativamente rara en el mundo de los polisacáridos, es su estructura semicristalina [15,16].

La celulosa se sintetiza en la naturaleza como macromoléculas individuales (cadenas lineales de residuos glucosídicos) las cuales son objeto de auto-ensamblaje en el sitio de la biosíntesis [17]. Hay pruebas de que las hemicelulosas asociadas a la fracción celulósica regulan este proceso de agregación [18]. Aproximadamente 30 macromoléculas individuales de celulosa están agregadas en unidades más grandes conocidas como fibrillas elementales (protofibrillas), que se envasan en unidades más grandes denominadas microfibrillas y éstos a su vez se montan en las fibras de celulosa.

La naturaleza semicristalina de la celulosa implica un orden estructural en el que todos los átomos están fijos en posiciones discretas con respecto a los demás. La celulosa cristalina presenta resistencia a la hidrólisis química o enzimática, insolubilidad en disolventes comunes como el agua y rigidez estructural. Estas características surgen de la estructura en forma de red de los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas de celulosa en la zona cristalina [19]. Sin embargo, a diferencia del almidón, la zona cristalina de la celulosa es tan robusta que no se puede dividir sin importar el tiempo que se caliente en agua hirviendo, ésta es la razón principal que impide la conversión eficiente de la biomasa celulósica. Curiosamente, algunos tipos de cambios en la estructura cristalina se han sugerido cuando se trató la celulosa en agua a temperaturas significativamente más altas y bajo presión [19].

La transformación de la estructura cristalina de celulosa a glucosa fue reportada por primera vez, después del calentamiento de celulosa cristalina con vapor saturado a temperaturas por encima de 260 °C durante 30 minutos [20]. Más recientemente, una muy alta tasa de hidrólisis (rompimiento de las cadenas de celulosa a unidades de glucosa) fue alcanzada por el procesamiento de celulosa en agua, cerca y por encima de su punto crítico ($T_c = 374 \text{ °C}$, $P_c = 22,1 \text{ MPa}$) [21,22]. En agua supercrítica, la conversión de celulosa fue extremadamente rápida, alcanzando 99.0% de conversión en 0.01 s, incluso sin utilizar ningún catalizador, el proceso suscitó un considerable interés como un proceso ambientalmente benigno para la conversión de la celulosa [21]. Sin embargo, el comportamiento de la celulosa cristalina en agua caliente comprimida sigue siendo poco claro debido a las dificultades experimentales asociadas con el estudio de la celulosa en condiciones tan extremas [20].

1.2.2 HEMICELULOSA

La hemicelulosa (Figura 1.3) está compuesta de polímeros de pentosas y hexosas que forman cadenas de 100 a 200 unidades y representa alrededor del 20 al 35% de la biomasa lignocelulósica [23, 11]). Los principales monosacáridos que lo conforman son xilosa, manosa, glucosa, galactosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido 4-O-metilglucurónico, ácido galacturónico y, en menos cantidad, ramnosa, y otros azúcares O-metilados. Los xilanos son las hemicelulosas más abundantes. A su vez, la hemicelulosa se une a la lignina por medio de enlaces covalentes [23].

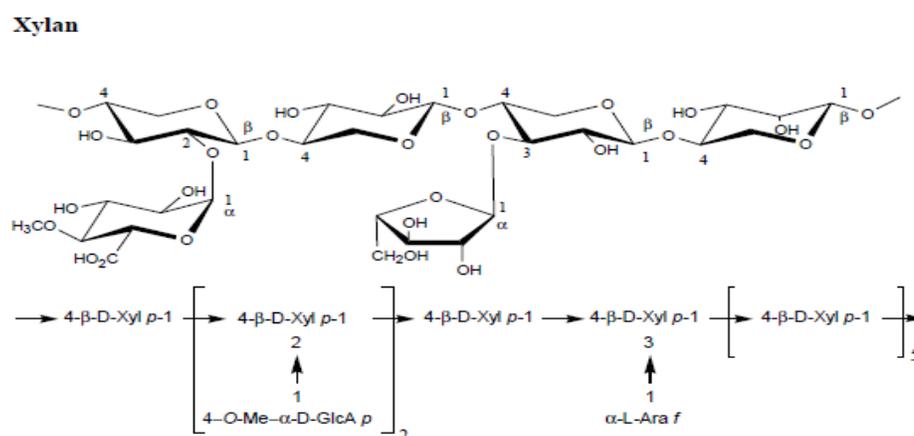


Figura 1.3 Estructura de la hemicelulosa [24]

En los últimos años, la bioconversión de hemicelulosa ha recibido mucha atención debido a sus aplicaciones prácticas en diferentes procesos agro-industriales, como la conversión eficiente de la biomasa lignocelulósica a combustibles y productos químicos, delignificación de pulpa de papel, mejoramiento de la digestibilidad de la materia prima para alimentación animal, clarificación de jugos y la mejora en la consistencia de la cerveza [25,12,23]. Las enzimas que degradan o ayudan a degradar hemicelulosa son de gran interés para la industria del papel y la pulpa, debido a sus propiedades removedoras de lejía (bioblanqueo de pulpa), el cual reduce el consumo de cloro que es dañino al medio ambiente [26,27].

La utilización de los azúcares hemicelulósicos es esencial para la conversión eficiente de los materiales lignocelulósicos a etanol combustible y otros productos de valor agregado mediante procesos de fermentación. Las enzimas degradadoras de Xilanos son

muy prometedoras en diversos pretratamientos de sacarificación de residuos agrícolas y forestales en azúcares fermentables. Otras aplicaciones potenciales de hemicelulasas incluyen biopulpeo de madera, procesamiento de café, maceración de frutas y vegetales y la preparación de productos de repostería con alto contenido de fibras [28]. Además, las enzimas que degradan xilanos desempeñan un papel importante en la elucidación de las estructuras de xilanos complejos [23].

1.2.3 LIGNINA

La lignina, es un polímero generado por la condensación al azar de los radicales libres de alcoholes aromáticos (Figura 1.4). En general, su estructura es difícil de definir, sin embargo, se sabe que contiene fundamentalmente tres alcoholes: coniferílico, sinapílico y p-cumarílico. También puede contener ácidos fenólicos, tales como cumárico y ferúlico, que están esterificados con los grupos alcohol [11]. La lignina es un polímero fenólico que proporciona una superficie hidrofóbica al agua y que proporciona la rigidez estructural necesaria para el soporte mecánico, dado que es un compuesto de alta densidad de energía como resultado de los numerosos vínculos carbono-carbono, es muy importante para aplicaciones de bioenergía mediante procesos térmicos.

La lignina residual, proveniente del aprovechamiento de la celulosa, puede ser utilizada como un intermediario especial para la obtención de productos químicos como el benceno a través de procesos de hidrogenación, o más comúnmente, se quema para generar calor o potencia. La lignina se podría utilizar como materia prima para la co-combustión o gasificación, en una biorefinería integrada para generar calor y electricidad. La lignina y compuestos fenólicos asociados, también se pueden utilizar como productos químicos intermedios para la obtención de otros productos de valor agregado, sin embargo, este volumen de mercado es probablemente limitado. El uso principal sería probablemente para generación de calor y electricidad, tanto para su uso interno en la biorefinería como para generar electricidad excedente que podría venderse a la red [11].

Por lo tanto, la biomasa lignocelulósica con alto contenido de lignina es deseable cuando se considera la biomasa con fines de combustión para la generación de electricidad. Por el contrario, la lignina puede afectar negativamente el rendimiento de azúcares fermentables obtenidos después de una sacarificación enzimática, debido a que su degradación es difícil y protege a la celulosa y hemicelulosa del ataque químico o

enzimático. Así mismo, proporciona una superficie que adsorbe enzimas celulolíticas de manera irreversible, por lo que se considera un compuesto recalcitrante [29].

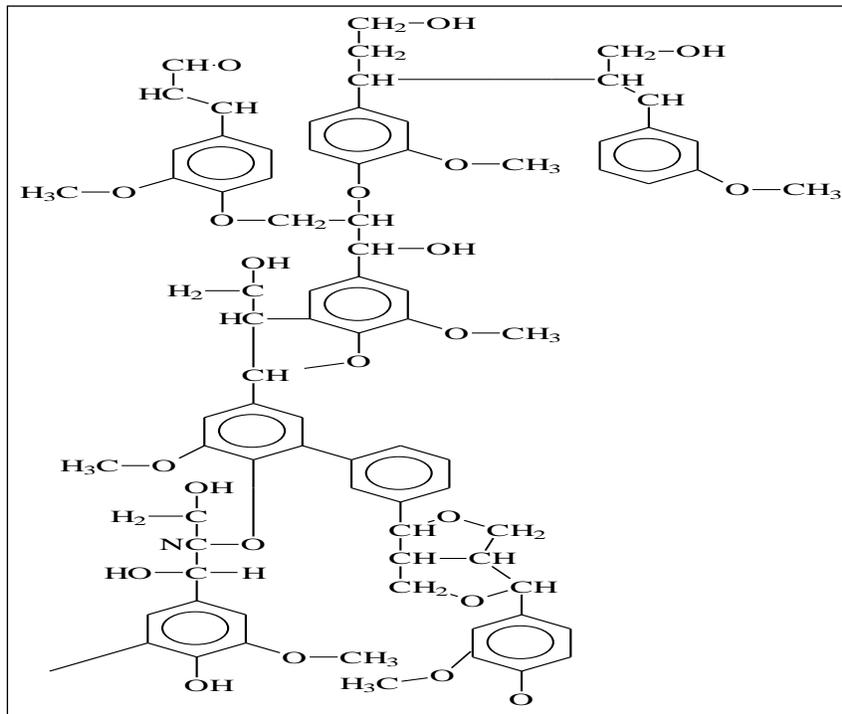


Figura 1.4 Estructura de la lignina [3]

1.3 PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Las tecnologías de fermentación provenientes de plantas productoras de azúcares (caña de azúcar, remolacha, etc.) o de la hidrólisis del almidón, obtenidos de cultivos tradicionales (maíz, yuca, etc.) están muy bien desarrolladas y son de uso actual para la producción de bioetanol [30]. Sin embargo, estos cultivos tienen un alto valor por su aplicación en alimentos y su rendimiento en azúcares por hectárea es muy bajo comparado con las formas más frecuentes de azúcar en la naturaleza como son los polisacáridos: la celulosa y hemicelulosa [30,31]. Los procesos sustentables para la conversión del material lignocelulósico en etanol pueden tener un margen para un mayor desarrollo, ya que se puede emplear una mayor variedad de cultivos, se aprovecha la mayor parte de las plantas, por lo tanto, los procesos se pueden realizar a escalas mayores y menores costos posibles [30]. El proceso biotecnológico para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos se realiza en cuatro etapas (Figura 5): a)

aperturar las paredes del material lignocelulósico para poder acceder a las cadenas poliméricas de celulosa y hemicelulosa por un proceso de pretratamiento mencionado anteriormente, b) hidrolizar los polisacáridos con el fin de lograr soluciones monoméricas de azúcar, c) fermentación de los azúcares a etanol mediante microorganismos y d) purificación del etanol de la mezcla por destilación y deshidratación [32].

En la actualidad, la hidrólisis se lleva a cabo usando ácido concentrado o mediante enzimas [32,33]. Esta última requiere tratamiento previo de la biomasa con el fin de mejorar la digestión enzimática [5]. Varios procesos de pretratamiento se han investigado, por ejemplo: trituración mecánica, la pirólisis, la explosión de vapor, explosión de fibra de amoníaco, explosión con CO₂, ozonólisis, hidrólisis ácida y alcalina, proceso organosolov y pretratamientos biológicos [6, 34, 33].

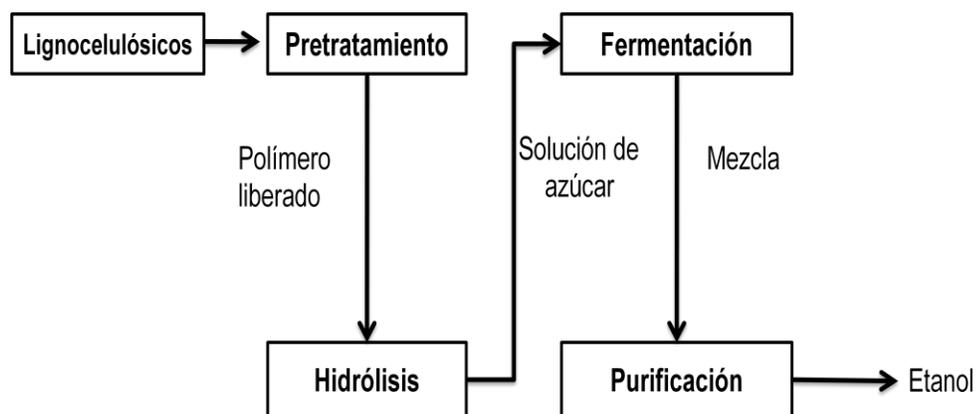


Figura 1.5 Proceso de obtención de etanol a partir de material lignocelulósico [32].

El paso limitante del proceso de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, es la limitada accesibilidad tanto de los reactivos químicos como de las enzimas a la celulosa presente en los compuestos lignocelulósicos [35,36,37].

1.4 PRETRATAMIENTOS

Como se ha mencionado, es necesario el empleo de pretratamientos de los materiales lignocelulósicos para facilitar el acceso de las enzimas o los reactivos químicos para la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa. Los pretratamientos de biomasa juegan un rol crítico en la producción de materiales con aceptable digestibilidad enzimática y

subsecuente fermentabilidad para la producción de etanol celulósico u otros biocombustibles avanzados como el butanol [6,38,39]. El propósito de los pretratamientos es eliminar la lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, y el aumento de la porosidad de los materiales. El tratamiento previo debe cumplir los siguientes requisitos [6].

- 1.- Mejorar la formación de azúcares o la capacidad para formar posteriormente azúcares por hidrólisis enzimática.
- 2.- Evitar la degradación o la pérdida de hidratos de carbono.
- 3.- Evitar la formación de subproductos de inhibición a la hidrólisis posterior y los procesos de fermentación.
- 4.- Que sea rentable.

Los pretratamientos se clasifican en físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. La Tabla 1.2, muestra los diferentes procesos fisicoquímicos y químicos de pretratamientos para los materiales lignocelulósicos, así como algunas características del proceso.

Los pretratamientos más utilizados son los de explosión de vapor, agua caliente (hidrotérmicos), hidrólisis ácida y alcalina. El pretratamiento a utilizar dependerá del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina del material lignocelulósico [40,41].

Tabla 1.2 Procesos de pretratamientos de materiales lignocelulósicos [7]

Método	Procedimiento/Agentes	Observaciones del pretratamiento
Pretratamientos físico-químicos		
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, P=0,69-4,85 MPa por segundos o minutos, seguido por descompresión hasta presión atmosférica.	.Ocurre cierta despolimerización de la celulosa a glucosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.
Agua líquida caliente (LHW)	Agua caliente presurizada, T=170-230°C, 1-46min.	Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Solubilización parcial de la lignina (20-50%). Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90%.

Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	1-2kg de amoníaco/kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%). Ocorre cierta despolimerización de la celulosa.
Explosión con CO ₂	4 kg CO ₂ /kg de fibra, P=5,62 MPa.	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa >75%.
Pretratamientos químicos		
Ozonólisis	Ozono, reacción a temperatura y presión ambientales.	Degradación principalmente de lignina. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 57% (aserrín).
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ al 1-5%. Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a T=160-200°C; procesos por lotes a alta carga de sólidos (10-40%) a T=120-160°C. Presiones cercanas a 1 MPa.	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. Ocorre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ al 10-30%, 170-190°C, relación 1:1,6 sólido-líquido. Ácido peracético 21-60%, sistema tipo silo.	Se requiere recuperación del ácido así como tiempo de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60°C	Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina>26%. Hidrólisis de >50% de la hemicelulosa.
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2%, 20°C, 8h.	Solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín).

1.5 PRETRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS

Los beneficios de los métodos hidrotérmicos es el no uso de agentes químicos más que el agua, con lo que se reducen los costos de recuperación del residuo sólido y

se obtienen tecnologías más amigables con el ambiente [42]. Como resultado de los pretratamientos, el sustrato es más rico en celulosa, la cual permanece casi sin alteración física o química, debido a la remoción de componentes no celulósicos durante el proceso [46]. El tratamiento con agua líquida caliente, es un método de pretratamiento hidrotérmico usualmente aplicado a los residuos agrícolas [47], que resulta en una mayor recuperación de azúcares de hemicelulosa y baja producción de inhibidores de la fermentación de los hidrolizados que en el pretratamiento de explosión de vapor. Las condiciones típicas de los pretratamientos con agua caliente incluyen temperaturas alrededor de 200 °C por pocos minutos [48]. Los pretratamientos hidrotérmicos son procedimientos que intentan modificar la estructura lignocelulósica mediante el uso de agua sometida a altas temperaturas en un reactor cerrado. En un ambiente hidrotérmico es frecuente que la presión endógena sea suficiente para mantener el agua en fase líquida. En tales condiciones, el agua actúa de manera simultánea como disolvente, catalizador y reactante [49]. Este método también logra el fraccionamiento selectivo de cada uno de los tres componentes poliméricos que componen la biomasa lignocelulósica. Por un lado, se obtiene una fracción soluble en agua que contiene hemicelulosa, por otro, una masa que contiene la lignina y la celulosa, de la cual la lignina se puede extraer con sosa diluida o etanol, permaneciendo la celulosa en forma insoluble [50].

En el método de explosión de vapor se producen cambios físicos y químicos en el material lignocelulósico. Los cambios físicos son el incremento de la superficie específica y la reducción del grado de polimerización de la celulosa debido a la desfibración de las partículas. Los cambios químicos son la hidrólisis parcial y solubilización de la hemicelulosa y la degradación de la lignina en productos de bajo peso molecular [51]. En la conversión de celulosa se presenta despolimerización por hidrólisis y se obtienen oligosacáridos, los cuales presentan una condensación retro-aldólica, para transformarse en furfurales y ácidos carboxílicos [50]. Los principales productos de la conversión hidrotérmica subcrítica de los carbohidratos presentes en la biomasa serán análogos a los que presenta la celulosa. El efecto físico-químico del tratamiento hidrotérmico se puede realizar añadiendo reactivos químicos antes del proceso, los cuales incluyen H_2SO_4 , SO_2 y $NaOH$ [52]. La condición hidrotérmica se favorece por el desprendimiento de dióxido de carbono en estado supercrítico, que incrementa la presión del sistema. El sustrato es sometido a presiones mayores que las atmosféricas que van de 10 a 45 atm y a altas temperaturas que oscilan entre 180-260 °C con un tiempo de contacto de 1 a varios

minutos dependiendo del material con el que se trabaje. Después de finalizada la etapa de contacto con el vapor a presión, el material se desfibra ampliamente [53].

Ballesteros; *et al*, 2002 [54], realizó pretratamientos hidrotérmicos a la pulpa de oliva utilizando agua a temperaturas entre 200 y 250 °C, obteniendo un incremento en la eficiencia de la hidrólisis enzimática de las pulpas tratadas. La producción máxima de etanol (11.9 g/L) se obtuvo después del pretratamiento de la pulpa a 210 °C, en un procedimiento de sacarificación y fermentación simultánea. Mosier; *et al*, 2005 [51], estudió el efecto del pH y encontró que a valores mayores de 4, en pretratamiento con agua caliente de rastrojo de maíz, se maximiza la solubilización de la fracción de hemicelulosa en forma de oligosacáridos solubles y reduce al mínimo la formación de azúcares monoméricos. En las condiciones óptimas de pretratamiento, el 90% de la celulosa se hidroliza enzimáticamente a glucosa cuando se usó celulasa. En otro estudio posterior. Mosier; *et al*, 2005 [53], encontró que el pretratamiento de la fibra de maíz con agua caliente a 160 °C y un pH superior a 4,0 disolvió el 50% de la fibra en 20 min. El pretratamiento también permitió la posterior hidrólisis enzimática completa de los polisacáridos restantes a monosacáridos. Los hidratos de carbono disueltos por el pretratamiento fueron 80% oligosacáridos solubles y 20% de monosacáridos y solo un 1 % de los carbohidratos perdidos fue convertido en productos de degradación. Zhang; *et al*, 2010 [55], utilizó un proceso de pretratamiento de agua caliente con disolventes que aceleran la velocidad de calentamiento del agua, se varió la temperatura del tratamiento y el tiempo. El pretratamiento de 190 °C por más de 10 minutos podía disolver la fracción de xilano de la lignocelulosa (planta “cola de gato”) como oligómeros solubles. Tanto el rendimiento de la glucosa y xilosa, obtenidos de la catálisis pretratada, aumentó como consecuencia del incremento de la temperatura del pretratamiento final, el tiempo de tratamiento o la concentración de la enzima. Cuando la lignocelulosa pretratada a 190 °C durante 15 minutos, se hidrolizó enzimáticamente, se obtuvo un alto rendimiento de conversión de celulosa a glucosa (77,6%) en 48 horas, usando una carga de celulasas de 60 unidades de papel filtro (FPU/g de glucano).

1.6 HIDRÓLISIS DE CELULOSA Y HEMICELULOSA (SACARIFICACIÓN)

Este proceso puede ser llevado a cabo químicamente con ácidos (p.e. ácido sulfúrico diluido) o enzimáticamente. La hidrólisis química implica la ruptura de la cadena de celulosa y hemicelulosa en sus respectivos monómeros. La hidrólisis completa de

celulosa resulta en glucosa, mientras que la hemicelulosa da lugar a varias pentosas y hexosas [56]. Como se ha mencionado anteriormente, sin ningún pretratamiento, la conversión de la celulosa nativa a azúcares es extremadamente baja porque la celulosa está protegida por la matriz de lignina y hemicelulosa en las microfibrillas. Por lo tanto, el pretratamiento de estos materiales es necesario para incrementar la acción de la hidrólisis de celulosa a azúcares fermentables.

1.6.1 HIDRÓLISIS QUÍMICA

La hidrólisis química consiste en la exposición de los materiales lignocelulósicos a una sustancia química por un periodo de tiempo determinado y a una temperatura específica, resultando en la obtención de monosacáridos a partir de los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa). Los ácidos son aplicados predominantemente en la hidrólisis química. La hidrólisis ácida puede ser dividida en dos grupos: (a) hidrólisis de ácido concentrado y (b) ácido diluido [32].

En la Figura 1.6, se aprecia la ruptura de las cadenas de celulosa y hemicelulosa a sus monómeros. La hemicelulosa se desdobla en xilosa, manosa, glucosa, galactosa, arabinosa, y pequeñas cantidades de ramnosa, ácido glucurónico, el ácido metil glucurónico y ácido galacturónico; altas concentraciones de ácido producen compuestos inhibitorios como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, fórmico y levulínico [32]. La celulosa se desdobla en glucosa y los productos de degradación que se generan son HMF, ácido fórmico y levulínico. Durante la hidrólisis química se producen compuestos extraíbles, los cuales son compuestos de los materiales lignocelulósicos que son solubles en disolventes orgánicos neutros o agua. Suelen representar una pequeña fracción (entre 1-5%) de los materiales lignocelulósicos, contienen un gran número de constituyentes tanto lipofílicos como hidrofílicos. Los extractos se pueden clasificar en cuatro grupos: (a) terpenoides y esteroides, (b) grasas y ceras, (c) los componentes fenólicos y (d) los componentes inorgánicos [32].

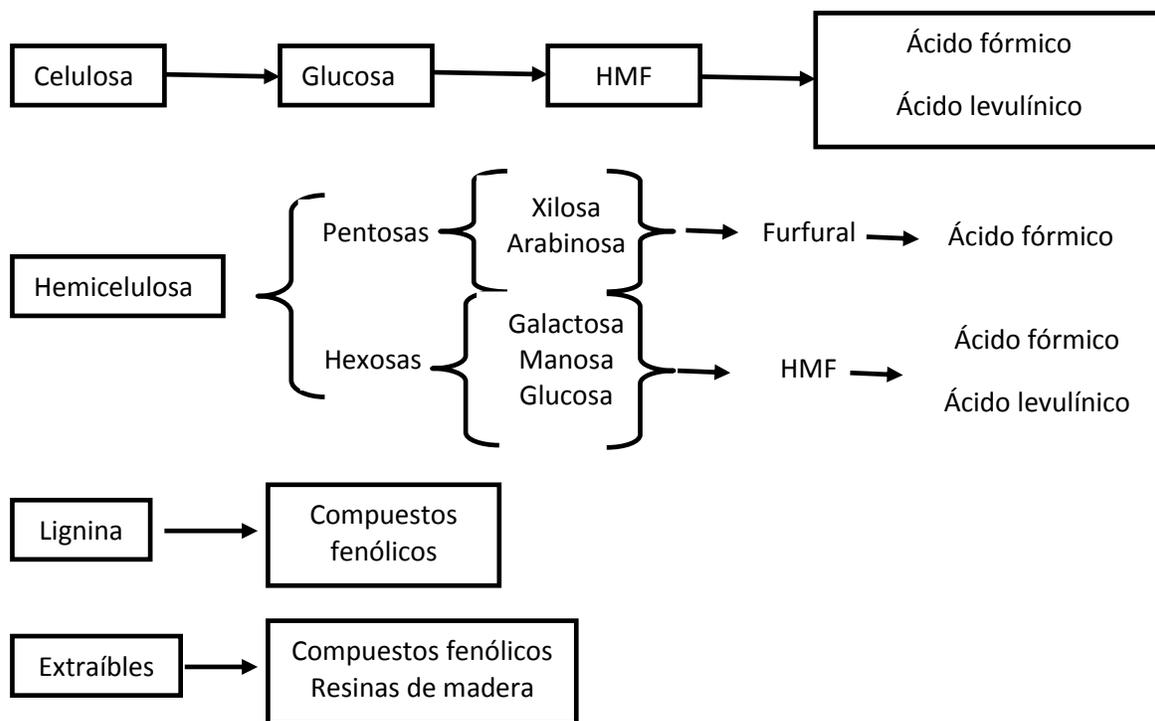


Figura 1.6 Composición de materiales lignocelulósicos y productos de la hidrólisis química [32]

1.6.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática se realiza en condiciones leves, con un pH de 4.5-5.0 y temperatura 40-50 °C. Las ventajas que presenta con respecto a la hidrólisis química, son problemas de corrosión bajos y se tiene baja toxicidad de los hidrolizados. Por lo menos tres grupos grandes de celulasas se encuentran involucrados en el proceso de la hidrólisis enzimática:

- A) Endo- β -glucanasas ó β -1,4-D-glucan glucanohidrolasas, que rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa, produciendo nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas. Como resultado, hay una rápida disminución en el largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores. El mejor sustrato para la medición de la actividad de endoglucanasas es un derivado soluble de celulosa conocido como carboximetilcelulosa (CMC).
- B) Exo- β -glucanasas ó β -1,4-D-glucan celobiohidrolasas, que atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los grupos terminales no reductores liberando subunidades

de celobiosa. No son muy activas contra celulosa cristalina pero exhiben una acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas.

C) β -glucosidasas o celobiasas, la que hidroliza celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa.

Zhang *et al* [55], empleó un sistema de hidrólisis enzimática para mazorca de maíz pretratada con amonio acuoso. Las enzimas utilizadas (β -glucosidasa, xilanasas y pectinasas) se complementaron para hidrolizar la celobiosa (producto que inhibe a la celulosa), hemicelulosa y pectina (el componente que cubre las superficies de fibra), respectivamente. Se encontró que la β -glucosidasa (Novozym 188) de una carga de 1,45 mg/g glucano [30 unidades de celobiosa (UDC)/g glucano] fue suficiente para eliminar el inhibidor de la celobiosa, y 2.9 mg/g glucano (60 CBU / g glucano) fue el límite de saturación. La utilización de xilanasas y pectinasas puede aumentar la conversión de la celulosa y hemicelulosa de manera significativa. Los rendimientos de glucosa y xilosa mejoraron con el incremento en la concentración de las enzimas. Comparado con la xilanasas, las pectinasas fueron más eficaces para promover la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa. La dosificación de 0.12 mg de pectinasa/g glucano podría aumentar los rendimientos de glucosa y xilosa en un 7 % y 29 %, respectivamente.

1.7 BAGAZO DE *Agave tequilana*

El tequila es una bebida alcohólica característica de México. Su producción consiste en la cosecha del agave, separación de las hojas de agave, cocción de las piñas de agave, molienda y extracción del jugo de agave, fermentación del jugo y posterior destilación y el proceso de envejecimiento [57]. Una de las características específicas de la producción del tequila 100% de agave es que las especies de *Agave tequilana* Weber variedad azul son permitidas como única fuente de azúcar [58].

Taxonómicamente, el *Agave tequilana* Weber, variedad azul, está clasificado como un miembro del grupo Rigidiae dentro del género *Agave* de la familia Agavaceae. En la Figura 1.6 se muestra una representación esquemática del agave donde se observan los diferentes componentes de la planta. La madurez fisiológica de la planta se alcanza entre 7 y 10 años, dependiendo de las condiciones del cultivo y después de la floración éstas envejecen y luego mueren. Normalmente, los agaves se cosechan entre los 6 y 10 años o justo antes de la floración, cuando los azúcares acumulados (fructanos) tienen una concentración máxima. Estos fructanos del agave consisten en una mezcla compleja de

fructooligosacáridos que contienen principalmente enlaces β -2,1, pero además β -2,6 y el resto son ramificaciones [59,60]. Estos azúcares son los utilizados en la producción de Tequila.

La industria tequilera en México, particularmente en el Estado de Jalisco, es de suma importancia, ya que la creciente demanda del tequila a nivel mundial da lugar a la producción de millones de litros anuales de esta bebida. Sin embargo, aunado a este proceso de producción, se encuentra también la generación de residuos, siendo el bagazo de agave uno de los principales. Este desecho es el que queda después de calentar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña del *Agave tequilana* [3]. Se ha reportado que el 40% del peso total del agave consumido corresponde al bagazo [61], por lo que se generan grandes volúmenes de este desecho y su disposición se ha vuelto un problema ambiental y económico [4]. La generación anual de bagazo en México es cerca de 1.05×10^8 kg, de los cuales solamente una pequeña porción es usada para la preparación de composta y el resto es desechado.

El bagazo de agave tequilero está compuesto de celulosa, hemicelulosa y lignina principalmente, tal como se muestra en el Tabla 1.3. El bagazo está constituido de material orgánico no fibroso en forma de partículas finas (médula) que corresponden a la corteza y envoltura fibrovascular dispersa en el interior de la piña de la planta de agave y por fibras de 10 a 12 cm de largo [62].

Tabla 1.3 Composición química del bagazo de *Agave tequilana* [61].

Análisis	Valor
Humedad (%)	71
pH	5.4
Materia seca (%)	29
Cenizas (% Base seca)	8.8
Hemicelulosa (% Base seca)	12.1
Celulosa (% Base seca)	41.9
Lignina (% Base seca)	7.2

Se han efectuado investigaciones para evaluar la factibilidad del aprovechamiento del bagazo de agave. Por ejemplo, la parte no fibrosa se ha usado para alimentar ruminantes [35]. Y aunque los animales fueron capaces de digerir parte del bagazo, se encontró que esta aplicación se veía limitada por la lignina asociada a la fibra y al arreglo cristalino de la celulosa. También se ha investigado el uso de bagazo de agave para

hacer papel para lo cual emplearon técnicas de pulpeo mecánicas, químicas y biológicas obteniéndose un papel con resistencia baja [64]. Otras aplicaciones que se han propuesto es su uso para la obtención de materiales de aglomerados, en la fabricación de muebles, como relleno de colchones, como substrato para cultivo de hongos comestibles, para fabricar ladrillos y como composta [63].

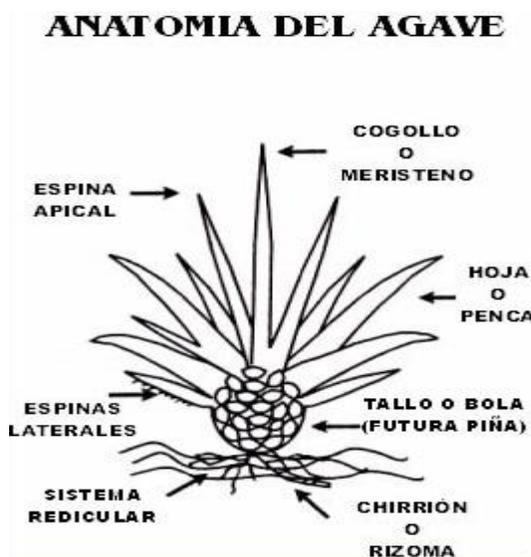


Figura 1.7 Anatomía del Agave [65].

Sin embargo, todavía no se cuenta con un proceso definitivo y económicamente atractivo para disponer de estos residuos, por lo que se siguen explorando otras opciones como la bioconversión del bagazo por bacterias en productos de alto valor agregado o la para la producción de biocombustibles.

Saucedo; *et al*, 2010 [5], llevaron a cabo un proceso de hidrólisis química del bagazo de *Agave tequilana*; la hidrólisis se llevó a cabo en dos etapas en serie en un reactor Parr y las condiciones óptimas para cada una de ellas fueron las siguientes: 1) 151 °C, 2% de H₂SO₄ y 10 minutos de reacción con un rendimiento de 236 g/kg de materia seca y una concentración de azúcares fermentables de 26.9 g/l; 2) 175 °C, 2 % de H₂SO₄ y 30 minutos de reacción con un rendimiento de 90 g/kg de materia seca y una concentración de azúcares fermentables de 15 g/l. De manera global se obtuvo un rendimiento de 326 g/kg de materia seca equivalente a un 48.1 % del valor teórico.

Los mismos autores [5] realizaron un estudio donde sacarificaron el bagazo de *Agave tequilana* a condiciones de 147 °C con 2% de ácido sulfúrico durante 15 minutos, con un rendimiento de 25.8 g/l de azúcares fermentables. El material lignocelulósico

restante fue además hidrolizado por enzimas comerciales, el 8.2 % del bagazo de *Agave tequilana* se incubó durante 72 horas a 40 °C, lo que representa 41 g/l de azúcares fermentables. La levadura nativa *Pichia caribbica* UM-5 se utilizó para fermentar los azúcares de los licores obtenidos después de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática, obteniéndose rendimientos de etanol del 50 y 87 %, respectivamente. El proceso de optimización final generó 8.99 g de etanol/50 g de bagazo de *Agave tequilana*, que corresponde a un total de 56.75 % de etanol teórico (p/p), considerando la cantidad de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) presentes en el bagazo de *Agave tequilana*.

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIA PRIMA

Las fibras de bagazo de *A. tequilana* fueron proporcionadas por la compañía “Sol y Agaves” de Arandas, Jalisco. Las fibras se obtuvieron separando la parte fibrosa y no fibrosa del bagazo de agave usando un tamizador mecánico. Las fibras se molieron en un molino de cuchillas marca Pagani usando una malla de 5 mm.

2.2 PRETRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE

Se usó un reactor presurizado marca Parr, al que se alimentó con 37.5 g de fibra molida de bagazo de *A. tequilana* y se añadió 750 ml de agua destilada (relación fibras: agua 1:20). Posteriormente, se calentó el reactor a una velocidad de entre 2.9 y 3.4 °C/min hasta alcanzar las temperaturas de trabajo deseadas (150, 170, 190 y 210 °C). Se realizaron dos pruebas: en la primera, el reactor se mantuvo durante 1 minuto cuando éste alcanzó la temperatura de trabajo, se apagó el calentamiento y el reactor fue enfriado hasta que se alcanzó la temperatura de 40 °C; en la segunda prueba, al alcanzar la temperatura de trabajo se mantuvo esta temperatura durante 60 minutos, para posteriormente apagar el calentamiento y enfriar el reactor hasta la temperatura de 40 °C. Posteriormente se filtró el producto obtenido y se lavó con 100 ml agua, para recuperar la fracción sólida y la fracción líquida. La fracción sólida se secó a 105 °C en una estufa de convección hasta peso constante y la fracción líquida se guardó en un refrigerador hasta su caracterización.

2.3 PRETRATAMIENTO DE EXPLOSIÓN DE VAPOR

Se utilizó una caldera marca León, la cual fue conectada a un reactor Parr al cual se le suministró vapor de agua para realizar la prueba de explosión de vapor. El reactor Parr fue cargado con 100 g de bagazo de *Agave tequilana* y fue herméticamente sellado, se suministró el vapor de agua hasta que se alcanzó la presión de trabajo (5 o 10 bar). Una vez alcanzada la presión de trabajo, se dejó por un lapso de 10 minutos y súbitamente la presión fue liberada y las fibras fueron colectadas en un recipiente

conectado al reactor Parr. La fibra recolectada fue filtrada y lavada con agua para su posterior caracterización e hidrólisis enzimática.

2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA OBTENIDA DESPUES DE LOS PRETRATAMIENTOS

La fracción sólida, recuperada después de los pretratamientos, se caracterizó mediante la determinación de su composición química (extraíbles, lignina y holocelulosa), análisis térmico y microscopía electrónica.

2.4.1 DETERMINACIÓN DE EXTRAÍBLES

Se determinó el contenido de extraíbles de las fibras del bagazo *A. tequilana*, después del pretratamiento con agua líquida caliente, según las normas ANSI/ASTM (American National Standard Institute/American Society for Testing Materials). El procedimiento utilizado fue el siguiente: se prepararon 3 cartuchos de papel filtro y se secaron en la estufa hasta peso constante, se llenaron con 1 g de fibras de bagazo tratado o sin tratar y se extrajeron con una mezcla de benceno-etanol (Norma ASTM D1107-84) en un equipo de extracción soxhlet. Posteriormente se drenaron los cartuchos y se secaron durante 24 horas, se pesaron y se prepararon para la siguiente extracción. Los cartuchos secos se colocaron nuevamente al extractor soxhlet y se extrajeron con etanol utilizando el mismo procedimiento. Las fibras de bagazo libre de extraíbles se retiraron del cartucho y se calentaron a reflujo con agua durante 3 horas (Norma ASTM D1110-84). Se filtró el bagazo y la torta formada en los filtros, se lavó con 100 ml de agua caliente y 50 ml de etanol. Se secaron los residuos en la estufa durante 24 horas y se pesaron. El peso de extraíbles en cada etapa se calculó mediante la siguiente ecuación, siendo A y B los pesos secos antes y después de la extracción, respectivamente:

$$\text{Extraíbles} = \frac{A - B}{A}$$

2.4.2 DETERMINACIÓN DE LIGNINA KLASON

El residuo insoluble que queda después de la digestión con ácido concentrado de la muestra, se denomina Lignina Klason y su determinación se realiza de acuerdo con la norma ASTM D1106-84. El procedimiento usado es el siguiente: se colocaron 15 ml de ácido sulfúrico al 72%, a una temperatura de 15 °C en un vaso de precipitado y se le añadió las fibras libres de extraíbles obtenidas del proceso anterior. El contenido se homogeneizó unos minutos y se mantuvo con agitación durante 2 horas en un baño de temperatura constante (18 °C). El contenido del vaso se vació en un matraz balón con 560 ml de agua y se calentó a ebullición durante 4 horas. Se filtró el contenido del matraz y se lavó con agua caliente hasta que el filtrado clarificó. Se dejó secar durante 24 horas en estufa a 100 °C y se pesó.

2.4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Se utilizó un equipo marca JEOL modelo JSM-6360/LV. Se tomaron parte de las fibras pretratadas y se dispersaron sobre cinta adhesiva de doble cara de carbón pegadas a un soporte metálico, el material se metalizó con oro durante 60 segundos para mejorar el contraste. Las condiciones de observación fueron las siguientes: se utilizó en detector de electrones secundarios y se realizó barridos a las fibras con aumentos del orden de 200x (100 µm) y 500x (50 µm).

2.4.4 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

Se realizó el análisis termogravimétrico (TGV) de las fibras pretratadas en una balanza termogravimétrica TGA 7 de la marca Perkin Elmer. Se pesaron 3 mg de muestra y se realizó un barrido de temperatura de 50-700 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de N₂. Se graficó el porcentaje de masa residual con respecto al peso original contra la temperatura.

2.5 CARACTERIZACIÓN FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA DESPUES DE LOS PRETRATAMIENTOS

A la fracción líquida, recuperada después del pretratamiento hidrotérmicos de las fibras de bagazo, se le midió los grados Brix utilizando un refractómetro Abbe, se midió el pH de la fracción líquida antes y después del pretratamiento utilizando un potenciómetro y se les determinó los azúcares totales y reductores.

2.5.1 MEDICIÓN DE AZÚCARES TOTALES

La determinación de los azúcares totales se determinaron de acuerdo al método reportados por Dubois; *et al*, 1959 [66]. Se tomó 1 ml de muestra de la fracción líquida obtenida después del pretratamiento hidrotérmico de las fibras del bagazo de *Agave tequilana* y se aforó a 60 ml con agua destilada. Posteriormente de la dilución se tomó 1 ml y se le adicionó 1 ml de fenol y 5 ml de ácido sulfúrico. Su usó un baño de agua fría para mantener la temperatura constante a 8 °C por 15 minutos. Las muestras se colocaron en un espectrofotómetro marca JENWAY modelo 6405 UV-bis, se leyó la absorbancia a una longitud de 490 nm. La medición se realizó por triplicado realizando el mismo procedimiento y se corrió un blanco con agua destilada. La obtención de la concentración de azúcares se obtuvo de los valores de absorbancia medidos, utilizando una curva de calibración de absorbancia contra concentración de glucosa previamente obtenida.

2.5.2 MEDICIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La determinación de los azúcares reductores se determinaron de acuerdo al método reportados por Lorenz [67]. Se tomó 0.5 ml de muestra de la fracción líquida obtenida del después del pretratamiento hidrotérmico de las fibras del bagazo de *Agave Tequilana*, se adicionó 1.5 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS). Las muestras fueron puestas a Baño María por 15 minutos. Al término de este tiempo fueron enfriados a temperatura ambiente y se les adicionó 8 ml de agua destilada. Las muestras se colocaron en un espectrofotómetro marca JENWAY modelo 6405 UV-bis, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. La medición de azúcares reductores se realizó por triplicado y se corrió un blanco pero sin la adición de muestra. La obtención de la concentración de

azúcares se obtuvo de los valores de absorbancia medidos, utilizando una curva de calibración de absorbancia contra concentración de glucosa previamente obtenida.

2.6 SACARIFICACION DE LAS FIBRAS PRETRATADAS

Las fibras (fracción sólida) obtenida después de los pretratamientos se sacarificaron, rompimiento de los enlaces glicosídicos de los polisacáridos, mediante hidrólisis ácida o enzimática, para recuperar los monosacáridos que conforman las cadenas de celulosa y hemicelulosa.

2.6.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se pesó 2 g de la fibra pretratada y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al cual se le añadió 25 ml de ácido sulfúrico al 2 ó 5 %. Se colocaron las muestras por triplicado en una autoclave marca Felisa y se calentaron a una temperatura constante de 125 °C durante 20 o 40 minutos. Al término de la hidrólisis, las fracciones líquida y sólida fueron separadas mediante filtración. A la fracción líquida se le realizaron las pruebas de azúcares totales y reductores siguiendo los procedimientos reportados en las secciones 2.5.1 y 2.5.2, respectivamente.

2.6.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se pesó 1 g en base seca de las fibras pretratadas a un minuto y una hora de residencia del pretratamiento de agua caliente en matraces de 250 ml. Se agregó 20 ml de acetato de sodio 50 mM como solución buffer (pH=5). Posteriormente, se añadió 0.24 ml de la enzima celulasa de *Thricoderma reesei* y 0.53 ml de la enzima celobiasa de *Aspergillus niger* a cada muestra. Las muestras fueron incubadas a 40 °C a 100 rpm durante 48 hrs. Al término de la hidrólisis, las fracciones líquida y sólida fueron separadas mediante filtración. A la fracción líquida se le realizaron las pruebas de azúcares totales y reductores siguiendo los procedimientos reportados en las secciones 2.5.1 y 2.5.2, respectivamente.

2.6.3 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES POR HPLC

La cuantificación de azúcares por cromatografía líquida, se realizó en un equipo Perkin Elmer modelo Flexar de bomba binaria con detector de índice de refracción. Se utilizó una columna empacada ZORBAX Carbohydrates de 5 μm con un flujo de 1.4 ml/min y una relación de disolventes acetonitrilo: agua (80:20) a una temperatura de 25 °C. El volumen de inyección fue de 20 μL . Se toma 1 ml de muestra de los hidrolizados ácidos o enzimáticos de las fibras pretratadas y se añade 1 ml de acetonitrilo grado HPLC. La muestra se sonicó por 15 minutos para disolver sólidos presentes y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos. Por último, el líquido sobrenadante fue filtrado y posteriormente alimentado al cromatógrafo para la determinación de los azúcares presentes a partir de los tiempos de retención [68]. La obtención de la concentración de azúcares se obtuvo de los valores de área medidos de los picos del cromatograma obtenido, utilizando una curva de calibración de área contra concentración de estándares de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA OBTENIDA DESPUES DEL TRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE

3.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En el Tabla 3.1, se muestra el efecto de la temperatura y del tiempo de residencia del pretratamiento con agua caliente sobre la composición química de la fibra de bagazo de *A. tequilana*. Se observa que las fibras sin tratar presentan un alto contenido de holocelulosa (60.7%) que corresponde a las fracciones de celulosa y hemicelulosa presentes en las fibras, así como un alto porcentaje de extraíbles (25.1%). El alto contenido de extraíbles en agua (13.5 %) se podría deber a residuos de azúcares provenientes de la inulina durante la cocción de la piña fresca o de la degradación de las cadenas de polisacáridos, principalmente hemicelulosa, durante dicho proceso. Se ha reportado que durante la cocción de la piña se hidrolizan los fructanos y se liberan los carbohidratos fermentables. Sin embargo, esta hidrólisis no es completa y el jugo generado de la cocción (miel cocida) contiene fructanos incompletamente hidrolizados, parte de los cuales se quedan adheridos a la superficie de las fibras de bagazo [82]. El alto contenido de extraíbles con benceno-etanol es debido a la presencia de grasas, ceras, resinas así como productos de la degradación de celulosa y hemicelulosa como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), etc. [32]

Se observó que las fibras pretratadas con 1 min de residencia a la temperatura de pretratamiento pierden entre un 25 a 60 % en peso con respecto al peso original y que esta pérdida de peso se incrementa al aumentar la temperatura del pretratamiento. Se obtuvo una pérdida del 60% cuando se usó una temperatura de 210 °C y 1 min de de residencia. Un comportamiento similar se observó cuando se usó un tiempo de residencia de 60 minutos en el pretratamiento, pero con mayor pérdida de peso (24 a 60%). Esta pérdida de peso se puede atribuir a la solubilización de las fracciones de bajo peso molecular presentes en la fibra de bagazo, a la ruptura y solubilización de la estructura de la lignina, así como a la ruptura hidrolítica de las cadenas de hemicelulosa y a la degradación de las cadenas de celulosa en la fase amorfa de las fibras de celulosa. En estos dos últimos casos, se generan oligosacáridos que se pueden solubilizar en la fracción líquida si son lo suficientemente pequeños o bien quedarse como residuos en las fibras [69].

Tabla 3.1 Composición de la fracción sólida obtenida después del pretratamiento con agua caliente de las fibras de *A. tequilana*(base 100 g de fibra)

Temperatura del pretratamiento (°C)	Peso Residual (g)	Composición de la fracción sólida residual				
		Extraíbles (g)			Lignina (g)	Holo-celulosa (g)
		Benceno - EtOH	EtOH	H ₂ O		
S/T	100	11.5 ±0.62	0.4 ± 0.2	13.5 ± 0.3	13.7±0.87	60.9 ±0.1.3
1 minuto de tiempo de residencia en el reactor a la temperatura del pretratamiento						
150	75	7.2 ± 1.2	0.1 ±0.03	17.5 ± 1.4	7.9 ±0.65	42.6 ± 1.18
170	74	6.6 ± 0.78	0.0 ± 0	20.0 ± 2.1	0.5 ± 0.56	40.8 ± 1.25
190	57	4.1 ± 1.3	0.0 ± 0	17.4 ±0.98	5.4 ±0.97	30.8 ± 1.33
210	51	3.2 ± 0.45	0.0 ± 0	18.8 ± 1.2	4.3 ±0.77	25.0 ± 1.56
60 minutos de tiempo de residencia en el reactor temperatura del pretratamiento						
150	76	7.3 ± 0.43	0.1 ±0.01	17.7 ±2.45	8.0 ±0.86	42.9 ± 0.82
170	60	5.3 ± 2.12	0.0 ± 0	16.0 ±1.34	6.0 ±0.92	32.7 ± 4.76
190	52	3.6 ± 0.79	0.0 ± 0	15.7 ±1.58	4.9 ±0.45	27.8 ± 3.56
210	40	2.5 ± 1.27	0.0 ± 0.	14.7 ±1.11	3.3 ±0.74	19.5 ± 2.51

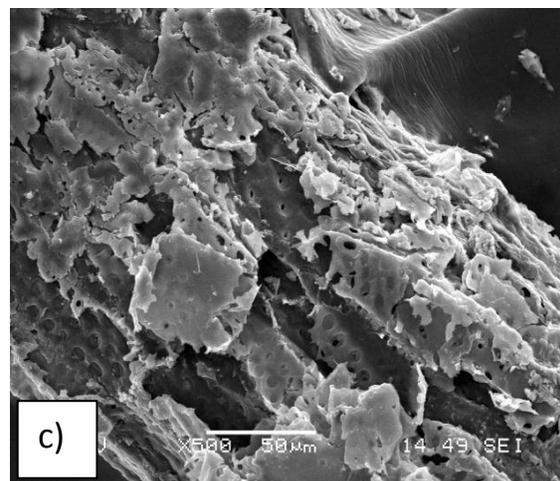
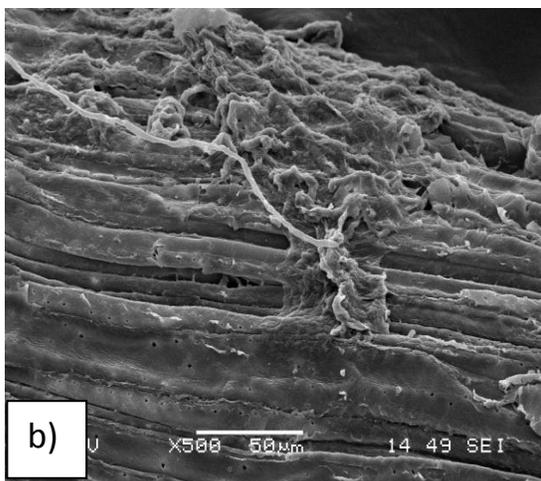
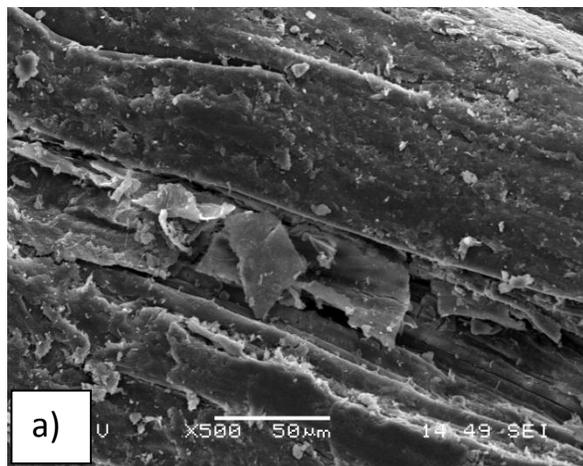
Este comportamiento se confirma con los cambios que se observan en la composición de la fracción sólida recuperada, en la que se observa una disminución en la fracciones de extraíbles con benceno-etanol, lignina y holocelulosa con un incremento de la temperatura o del tiempo de residencia. En el caso de la holocelulosa, se observa una disminución gradual que va del 20 al 58 % en peso, con respecto a la holocelulosa de la fibra no tratada, cuando el pretratamiento fue con 1 min de residencia y del 20 al 65% en el caso del pretratamiento con residencia de 60 min. La presencia de oligosacáridos en las fibras después del pretratamiento, se comprueba con el alto contenido de extraíbles acuosos de las fibras pretratadas.

Se observaron cambios en la pérdida de peso en la fracción holocelulósica, estos cambios son más notorios a temperaturas mayores de 170 °C donde la pérdida de masa

es de casi del 50 % y la degradación de holocelulosa también es notoria perdiéndose casi 60 % de esta fracción.

3.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

En las Figuras 3.1 y 3.2, se muestran las micrografías obtenidas por MEB de la fibra sin tratar y las obtenidas con diferentes temperaturas y tiempos de residencia. Se observa que la fibra sin tratar (Figura 3.1a y 3.2a), muestra una superficie lisa compuesta de lignina y hemicelulosa, las cuales recubren las microfibras de celulosa y que las mantienen aglomeradas en una matriz de lignina y hemicelulosa en forma de una fibra entera.



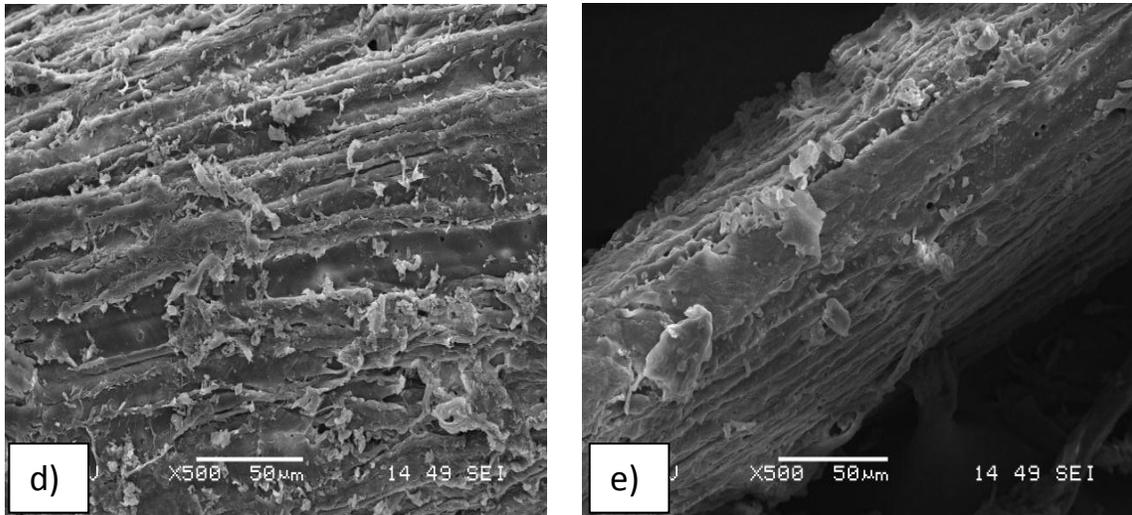
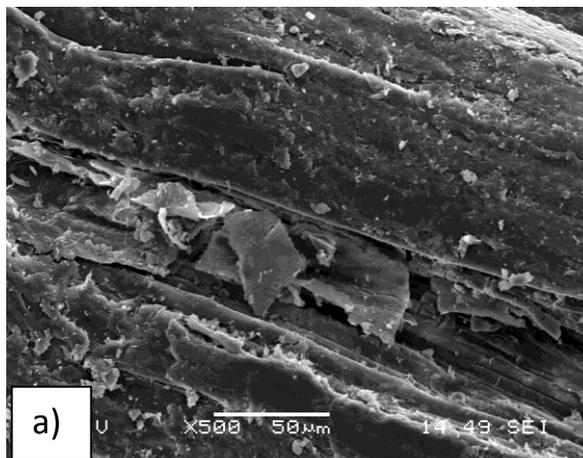


Figura 3.1 Micrografía MEB (500x) de la fibra de bagazo de *A. tequilana*.

- a) Sin tratamiento; después del pretratamiento con agua caliente con 1 minuto de residencia:
 b) 150 °C c) 170 °C, d) 190 °C y e) 210 °C

El tratamiento hidrotérmico modifica la superficie de las fibras mediante la remoción del material aglomerante (lignina y hemicelulosa), apreciándose exposición de las microfibras y nanofibras de celulosa (Figura 3.1 b), se observa un aumento del área superficial de la fibra así como de porosidad, lo que hace más accesible el ataque químico o enzimático durante el proceso de sacarificación. Esta modificación en la superficie de las fibras es más notoria en la Figura 3.2 (b, c, d y e), donde se puede apreciar fibras expuestas, desgarramiento del material aglomerante, mayor incremento de porosidad, incluso desprendimiento del material aglomerante, la liberación de las microfibras y nanofibras de celulosa, lo que nos indica que a mayor tiempo de residencia y calentamiento las fibras sufren un cambio en su estructura superficial.



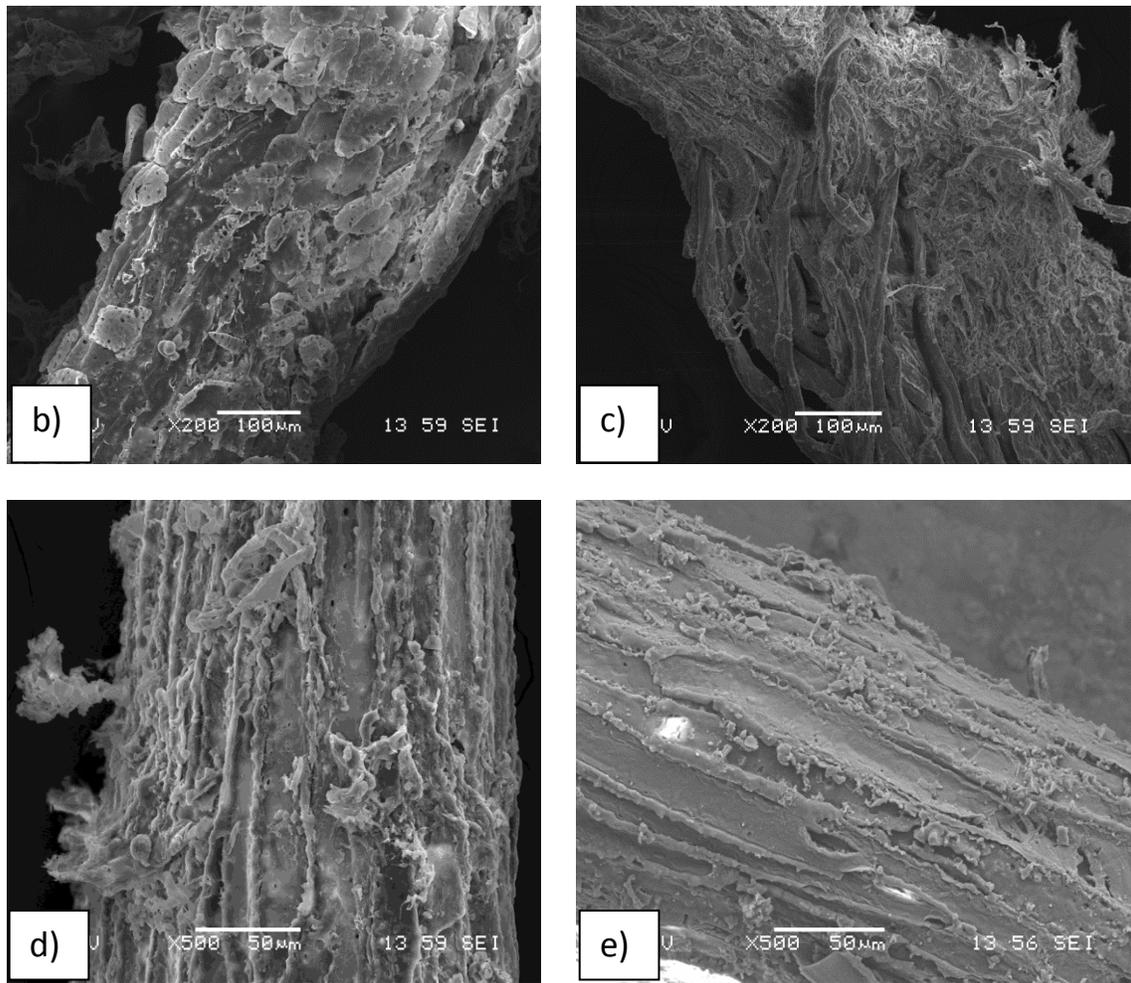


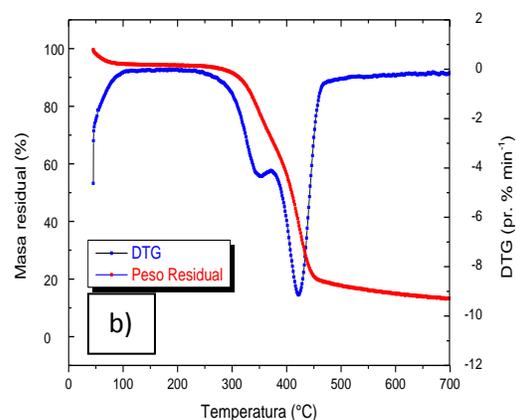
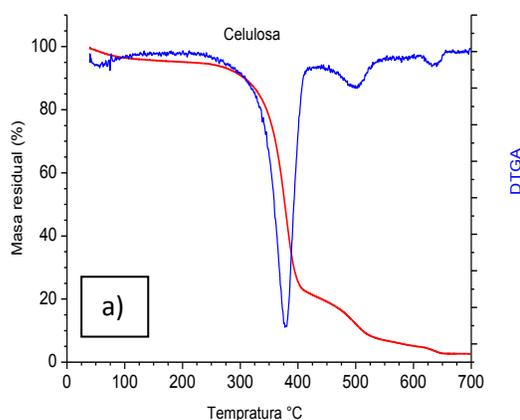
Figura 3.2 Micrografía MEB (500x) de la fibra de *A. tequilana* con una hora de residencia después de alcanzar la temperatura de trabajo. Sin tratamiento; después del pretratamiento con agua caliente con 60 minutos de residencia: b) 150 °C, c) 170 °C, d) 190 °C y e) 210 °C

3.1.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

Se realizó análisis termogravimétrico (TGA) a las fibras pretratadas, esta técnica permite la observación de la transformación química de la materia orgánica, debido a la descomposición de sus componentes por efecto de la temperatura. En la Figura 3.3, se muestran los termogramas de análisis termogravimétrico y las curvas derivadas del análisis termogravimétrico (DTGA) de la celulosa obtenida de la fibra de agave (Figura 3.3a), de las fibras sin tratamiento (Figura 3.3b) y de las fibras pretratadas (Figura 3.3c a

3.3f). La Figura 3.3 a) muestra la descomposición de la celulosa que tiene una TD_{max} a 390 °C, lo que indica que la celulosa esta dentro del rango de los componentes de alto peso molecular de la fibra de agave.

Los termogramas de las fibras del bagazo de *A. tequilana* muestran una descomposición principal en el rango de 250 – 450 °C, con una pérdida de masa del 70 %, debido principalmente a la degradación térmica de los componentes de las fibras de bagazo de *Agave tequilana*. La degradación térmica ocurre en dos etapas: En la primera etapa se observa una degradación de los componentes de bajo peso molecular así como de la hemicelulosa y en la segunda etapa ocurre la despolimerización de la celulosa por ruptura de las unidades glucosídicas. La descomposición a temperaturas mayores de 450 °C se atribuye a la degradación de la lignina. Debido a que estas descomposiciones térmicas se superponen, en las curvas de DTGA de las fibras sin pretratamiento (figura 3.3b) se aprecian dos temperaturas de descomposición máxima (TD_{max}): una como un pequeño hombro con máximo a 350 °C y otra en forma de un pico más intenso a 410 °C. Las fibras pretratadas con agua caliente a 150 °C muestran un comportamiento similar (figuras 3.3c y 3.3d) a las fibras sin tratamiento indicando que a esta condiciones, la fracción de hemicelulosa se mantiene en la fibra. En los termogramas de las fibras pretratadas con agua caliente a 210 °C (figuras 3.3e y 3.3f) se observa la desaparición del pico correspondiente a las hemicelulosas, indicando que a esta temperatura las cadenas de hemicelulosa pueden ser hidrolizadas y extraídas durante pretratamiento hidrotérmico con agua caliente [70, 71].



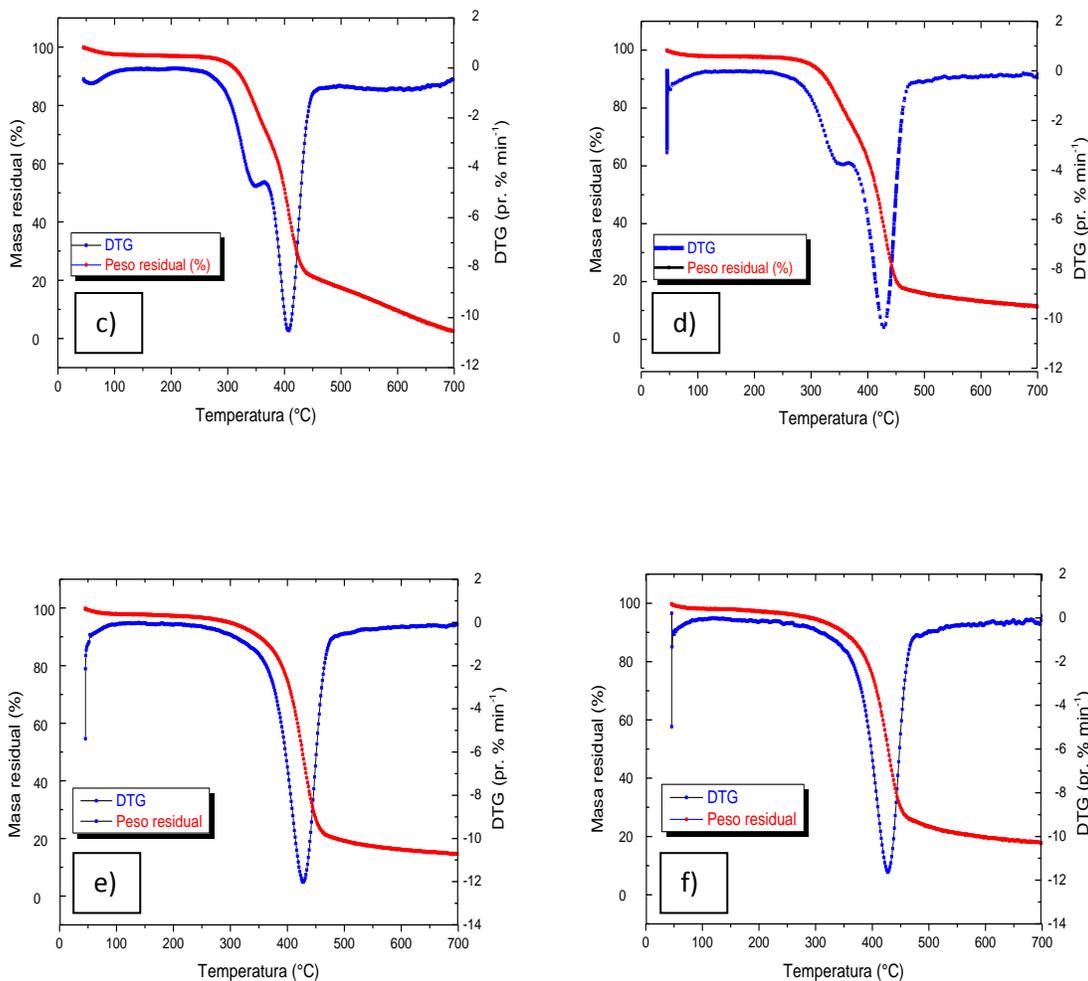


Figura 3.3 Termogramas de TGA y DTGA de las de fibras de bagazo de *Agave tequilana*.
a) Celulosa b) Fibra sin tratamiento c) Pretratada a 150 °C/1 min
d) Pretratada a 150 °C/ 60 min, e) Pretratada a 210 °C/1 min, f) Pretratada a 210 °C/60 min

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA DESPUES DEL PRETRATAMIENTO CON AGUA CALIENTE

En la tabla 3.2 se muestran los valores de pH, de azúcares reductores y totales y grados Brix de la fracción líquida recuperada después de los pretratamientos hidrotérmicos con agua caliente realizados a diferentes temperaturas y tiempos de residencia. Se observa que el contenido de sólidos solubles, medidos como ° Brix de la fracción líquida se incrementa al aumentar la temperatura de pretratamiento con agua

caliente, lo que está acorde con la mayor pérdida de peso observado después del pretratamiento. Como se ha indicado anteriormente, esto se debe tanto a la solubilización de compuestos de bajo peso molecular como a la hidrólisis de las cadenas de hemicelulosa.

Tabla 3.2 Azúcares, sólidos solubles y pH de la fracción líquida obtenida después del tratamiento con agua caliente de las fibras del bagazo de *Agave tequilana*

Temperatura del pretratamiento (°C)	Sólidos solubles (° Brix)	Concentración de azúcares (mg/ml)		pH
		Totales	Reductores	
1 minuto de tiempo de residencia en el reactor a la temperatura del pretratamiento				
Sin tratamiento	-----	-----	-----	6.92 ± 0.15
Temp. 150 °C	1 ± 0.13	1.97 ± 0.56	0.35 ± 0.23	6.17 ± 1.15
Temp. 170 °C	1 ± 0.22	2.47 ± 0.66	0.43 ± 0.06	6.02 ± 0.89
Temp. 190 °C	1.59 ± 0.05	2.23 ± 0.55	0.52 ± 0.33	5.31 ± 1.57
Temp. 210 °C	2 ± 0.32	2.27 ± 1.3	0.63 ± 0.08	5.12 ± 0.76
Temperatura del pretratamiento (°C)	° Brix	AZÚCARES (mg/ml)		pH
		Totales	Reductores	
60 minutos de tiempo de residencia en el reactor temperatura del pretratamiento				
Sin tratamiento	-----	-----	-----	6.92 ± 0.15
Temp. 150 °C	0.62 ± 0.34	3.81 ± 1.56	4.33 ± 1.12	3.70 ± 0.46
Temp. 170 °C	1.54 ± 0.76	12.59 ± 2.1	5.30 ± 1.54	3.44 ± 0.34
Temp. 190 °C	1.22 ± 1.1	8.44 ± 1.74	3.46 ± 0.76	3.17 ± 0.23
Temp. 210 °C	3.41 ± 1.2	3.67 ± 0.89	3.15 ± 1.34	2.95 ± 0.76

Con respecto a los azúcares totales y reductores, se observa que se tiene un máximo de azúcares totales a una temperatura de 170 °C, mientras que los azúcares reductores se incrementan al aumentar la temperatura de pretratamiento. Se observa que se obtuvo una disminución en los valores de pH, con respecto al pH inicial, obteniéndose valores más bajos al incrementar la temperatura y el tiempo de pretratamiento. El pH disminuyó de 6.91 hasta valores cercanos a 5 y de 3 al aplicar más tiempo de residencia cuando se usaron temperaturas arriba de 200 °C. Esta disminución de pH puede deberse a la generación de furfural, hidroximetil furfural y ácidos carboxílicos producto de la degradación de las pentosas y hexosas generadas principalmente a través de la ruptura hidrolítica de las cadenas de hemicelulosa [60]. La degradación de los azúcares es más notoria a temperaturas más altas como se observa de los bajos valores de pH a 210 °C.

3.3 SACARIFICACION DE LAS FIBRAS PRETRATADAS CON AGUA CALIENTE

3.3.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Las fibras pretratadas se sometieron a una hidrólisis ácida usando ácido sulfúrico diluido para determinar el efecto del pretratamiento sobre la sacarificación. La cuantificación de los azúcares resultantes de la sacarificación ácida con concentraciones de 2 y 5 % de H₂SO₄ se realizó por medio de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). En la Figura 3.4 se muestra un cromatograma típico del producto de la hidrólisis ácida (H₂SO₄ al 2%, a 125 °C durante 20 min) de la fibra pretratada donde se observa dos picos: el primero con tiempo de retención (t_R) cercano a 2 minutos corresponde al agua y el segundo con $t_R = 3.8$ min corresponde al monosacárido de xilosa. Mediante esta técnica, solamente se observó la presencia de xilosa en todas las muestras hidrolizadas químicamente de las fibras pretratadas, lo cual sugiere que a la temperatura usada en la hidrólisis ácida, solamente se hidroliza la fracción hemicelulósica presente en las fibras tratadas.

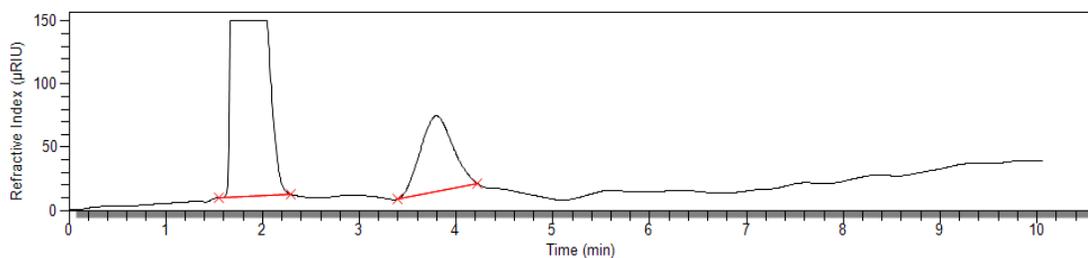


Figura 3.4 Cromatograma de xilosa de la fibra pretratada 150 °C/1min e hidrolizada químicamente al 2 %/ 20 min

En las Tablas 3.3 y 3.4 se muestran los resultados de la pérdida de peso después de la hidrólisis ácida de las fibras pretratadas y la cuantificación de los azúcares obtenidos. La pérdida de peso es más notoria en las fibras que fueron pretratadas a bajas temperaturas y con menor tiempo de residencia. Así, se obtuvo una pérdida de peso del 37 % y del 11% para las fibras pretratadas a 150 y 210 °C, respectivamente. Este comportamiento se debe a la menor cantidad de hemicelulosa presente en las muestras pretratadas a altas temperaturas como se señaló en el análisis termogravimétrico de las fibras pretratadas. Así, las fibras pretratadas a 190 y 210 °C en los que los termogramas de TGA no muestran la presencia de hemicelulosa, los porcentajes de pérdida de peso fueron menores y los azúcares no pudieron ser cuantificados (NC) como se muestra en las tablas 3.3 y 3.4.

Tabla 3.3 Cuantificación de azúcares obtenidos por hidrólisis ácida con H₂SO₄ al 2 % y a 125 °C de las fibras tratadas con agua caliente

Pretratamiento		Tiempo de hidrólisis			
		20 min.		40 min.	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Peso Perdido (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)	Peso Perdido (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)
150	1	37.8	9.54	38.5	25.12
170	1	32.5	6.97	33.5	14.20
190	1	16.6	5.81	17.9	7.32
210	1	11.1	NC	12.1	NC

Pretratamiento		Tiempo de hidrólisis			
		20 min.		40 min.	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Peso residual (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)	Peso residual (%)	Concentración Xilosa (mg/mL)
150	60	36.3	10.09	39.55	15.37
170	60	19.2	6.52	28.15	9.46
190	60	14.55	NC	23.65	NC
210	60	11.95	NC	9.75	NC

Aunque un incremento en la concentración de ácido y del tiempo de hidrólisis resulta en un incremento de la cantidad de xilosa obtenido, existe una limitante de las condiciones del proceso de hidrólisis ácida usado, que se ve reflejada en que solamente se obtuvo xilosa y que las concentraciones de ésta no rebasan los 25 mg/ml. Se ha reportado que se requieren temperaturas más altas para la sacarificación tanto de las cadenas de hemicelulosa como de celulosa en medio ácido [5].

Tabla 3.4 Cuantificación de azúcares obtenidos por hidrólisis ácida con H₂SO₄ al 5 % y a 125 °C de las fibras tratadas con agua caliente

Pretratamiento		Tiempo de hidrólisis			
		20 min.		40 min.	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Peso Perdido (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)	Peso Perdido (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)
150	1	37.75	24.25	40.3	24.63
170	1	20.65	23.45	24.4	23.94
190	1	17.85	6.68	22	6.81
210	1	21.15	NC	24.9	NC

Pretratamiento		Tiempo de hidrólisis			
		20 min.		40 min.	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Peso Perdido (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)	Peso Perdido (%)	Concentración Xilosa (mg/ml)
150	60	36.25	23.45	40.25	24.81
170	60	20.15	22.62	34.9	22.91
190	60	15.5	NC	25.65	6.02
210	60	9.95	NC	10.55	NC

La mayor concentración de xilosa se obtuvo con la fibra pretratada a 150 °C por 1 minuto de tiempo de residencia y con hidrólisis ácida al 2 % por 40 minutos, obteniéndose una concentración de 25.12 mg de xilosa/ml de hidrolizado.

3.3.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En la Figura 3.5 se muestra el cromatograma del hidrolizado enzimático de la fibra pretratada a 210 °C y 60 minutos de tiempo de residencia. Se observa en el cromatograma la presencia de dos picos: el primero con tiempo de retención (t_R) cercano a 2 minutos corresponde al agua y el segundo con $t_R = 5.35$ min correspondiente a la glucosa. Mediante la técnica de HPLC solamente se observó la presencia de glucosa en todas las muestras hidrolizadas enzimáticamente, esto es debido a que la mezcla de enzimas utilizada es más específica para romper los enlaces glucosídicos presentes en la celulosa y liberar las unidades de glucosa.

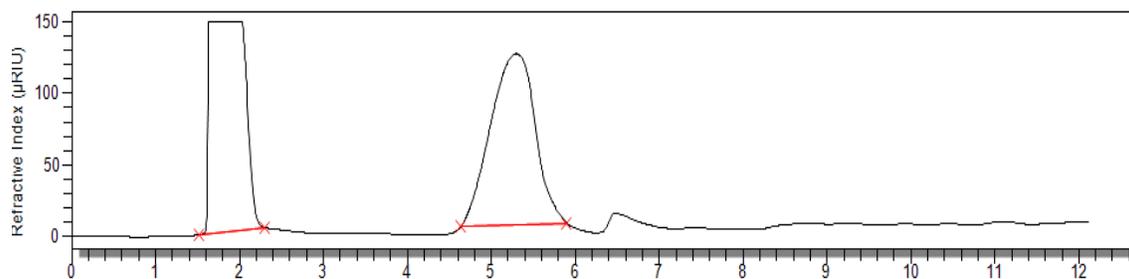


Figura 3.5 Cromatograma de glucosa de la fibra pretratada a 210 °C/60 min e hidrolizada enzimáticamente

En la tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática de las fibras pretratadas. Se observa que la cantidad de peso perdido por las fibras pretratadas después de la hidrólisis enzimática y la concentración aumentan conforme la temperatura a la que se trató la fibra usada fue pretratada a mayor temperatura. Así, las fibras pretratadas una temperatura de 150 °C y 1 minuto de tiempo de residencia tuvo un 3% de pérdida de peso después de la hidrólisis enzimática y no se pudo detectar glucosa en el hidrolizado enzimático, mientras que las fibras pretratadas a temperaturas de 210 °C y el mismo tiempo de residencia tuvieron una pérdida de peso del 46% y una concentración de glucosa de 13.18 g/ml de hidrolizado. El incremento del tiempo de pretratamiento de la fibra también resulta en una mayor cantidad de glucosa, ya que se obtuvo un concentración de glucosa de 33.78 g/ml de hidrolizado cuando se usaron fibras pretratadas a 210 °C y 60 minutos de tiempo de residencia. Este aumento en la concentración de glucosa de las fibras pretratadas a mayor temperatura y tiempo de residencia, se debe a que existe una mayor área superficial y accesibilidad de la mezcla de las enzimas celulasa y celobiosa hacia las cadenas de celulosa, para su función de desdoblamiento unidades básicas de monosacáridos.

Tabla 3.5 Cuantificación de azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática de las fibras tratadas con agua caliente

Fibras pret.	Hidrólisis enzimática						
	Fibras pretratadas con 1 min. de tiempo de residencia			Fibras pretratadas con 60 minutos de tiempo de residencia			
	Peso Inicial (g)	Peso Perdido (%)	Concentración glucosa (mg/ml)	Peso Inicial (g)	Peso Perdido (%)	Concentración glucosa (mg/ml)	Rend. Teórico de etanol (%)
150 °C	1	3.1	NC	1	11.3	NC	NC
170 °C	1	16.6	2.22	1	47.9	16.16	44.92
190 °C	1	43.9	12.66	1	49.3	30.58	57.16
210 °C	1	46.7	13.18	1	41.1	33.78	59.99

3.3.3 CÁLCULO DEL RENDIMIENTO TEÓRICO DE ETANOL

Para el cálculo del rendimiento teórico de producción de etanol a partir de los hidrolizados enzimáticos de las fibras de bagazo de agave pretratadas, se usaron las siguientes consideraciones:

- Por cada gramo de glucosa se producen 0.51 g de etanol teórico.
- La cantidad de material sacarificable presente en las fibras de bagazo de agave es de 609 g/kg de fibra (60.9% de holocelulosa de acuerdo a la composición química de la fibra). Por lo que el rendimiento máximo de etanol por kg de fibra sería de 306 g.
- 1 g de glucosa/ml de hidrolizado enzimático equivale a 10.18 g de celulosa/kg de bagazo y a 3.32 g de etanol/ kg de fibra.

Los datos de rendimiento teórico calculados se muestran en la tabla 3.5. Con base a estos datos se obtuvo un rendimiento del 57 % de etanol teórico (etanol obtenido con el hidrolizado enzimático con respecto del valor máximo de azúcares que se puede obtener de las fibras) cuando se hidrolizó enzimáticamente fibras pretratadas a 210 °C y 60 minutos de tiempo de residencia. Estos resultados son mayores que los reportados en la literatura para fibras de bagazo pretratadas con medio ácido. Saucedo, *et al*, [5], sacarificó químicamente en dos etapas en serie: para la primera etapa usó una temperatura de 151 °C, 2 % de H₂SO₄ y 10 minutos de reacción con un rendimiento de azúcares de 236 g/kg de materia seca y una concentración de 26.9 g/l; para la segunda etapa usó una temperatura de 175 °C, 2 % de H₂SO₄ y 30 minutos de reacción con un rendimiento de azúcares de 90 g/kg de materia seca y una concentración de 15 g/l. De manera global se obtuvo un rendimiento de 326 g de azúcares/kg de materia seca equivalente a un 48.05 % del valor teórico.

Los resultados demuestran que el pretratamiento con agua caliente es una opción viable para lograr mayores rendimientos de azúcares fermentables.

3.4 PRETRATAMIENTO POR EXPLOSIÓN DE VAPOR

3.4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA

En la tabla 3.6 se muestra la composición química de las fibras pretratadas mediante explosión de vapor. Se observa en la tabla, que hay una pérdida de peso, con

respecto a la fibra de tratamiento, del 8 y 10% cuando se usaron presiones de 10 y 15 bar, respectivamente. Del análisis de la composición de la fibra pretratada, se observa que no hay un efecto significativo del pretratamiento sobre el contenido de holocelulosa, ya que se mantiene casi constante. El efecto más notorio es la en el porcentaje de extraíbles con benceno-etanol y en el contenido de lignina, en los que se observa una disminución conforme se incrementa la presión utilizada. Este comportamiento indican que se el pretratamiento por explosión de vapor no solubiliza los oligosacáridos presentes en la fibra ni tampoco degrada a los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa).

Tabla 3.6 Composición de la fracción sólida obtenida después del pretratamiento de explosión de vapor de las fibras de *A. tequilana* (base 100 g de fibra)

Presión del pretratamiento	Peso Residual (g)	Composición de la fracción sólida residual				
		Extraíbles (g)			Lignina (g)	Holo-celulosa (g)
		Benceno - EtOH	EtOH	H ₂ O		
S/T	100	11.0 ±0.86	0.4 ±0.01	13.8 ±0.89	13.6±1.34	61.1 ± 1.32
10 bar	92	8.0 ± 1.45	0.1 ± 0	11.9 ±1.09	12.3±0.34	59.7 ± 1.23
15 bar	90.0	7.9 ± 2.1	0.0 ± 0	13.0 ±1.14	10.0±1.05	3.1 ± 0.81

3.4.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

En la Figura 3.6 se muestran las micrográficas obtenidas por MEB de la fibras sin tratar y las obtenidas después los pretratamientos de explosión de vapor a 5 bar y 10 bar de presión (Figuras 3.6 b) y c). En estas se muestra a la fibra sin tratamiento (Figura 3.6 a) totalmente lisa, aglomerada y con poca área superficial accesible. El pretratamiento de explosión de vapor no modifica la superficie de las fibras de manera significativa como se aprecia en las Figuras 3.6 a) y 3.6 b), donde se observa que con respecto a la fibra sin tratamiento no hay un cambio contrastante. A partir de tratar la muestra a 10 bar de presión ya empieza a haber una apertura de la fibra pero todavía no es tan notorio, por lo que habría que realizar este pretratamiento a más altas presiones con el fin de lograr una mayor apertura la fibra y mayor área superficial para que posteriormente al llevar a cabo

la hidrólisis química o enzimática se puedan obtener mayores concentraciones de azúcares fermentables. La poca área superficial accesible que presentan las fibras pretratadas redonda en las bajas concentraciones de azúcares que se obtuvieron al realizar la hidrólisis enzimática como se muestra en la Tabla 3.7.

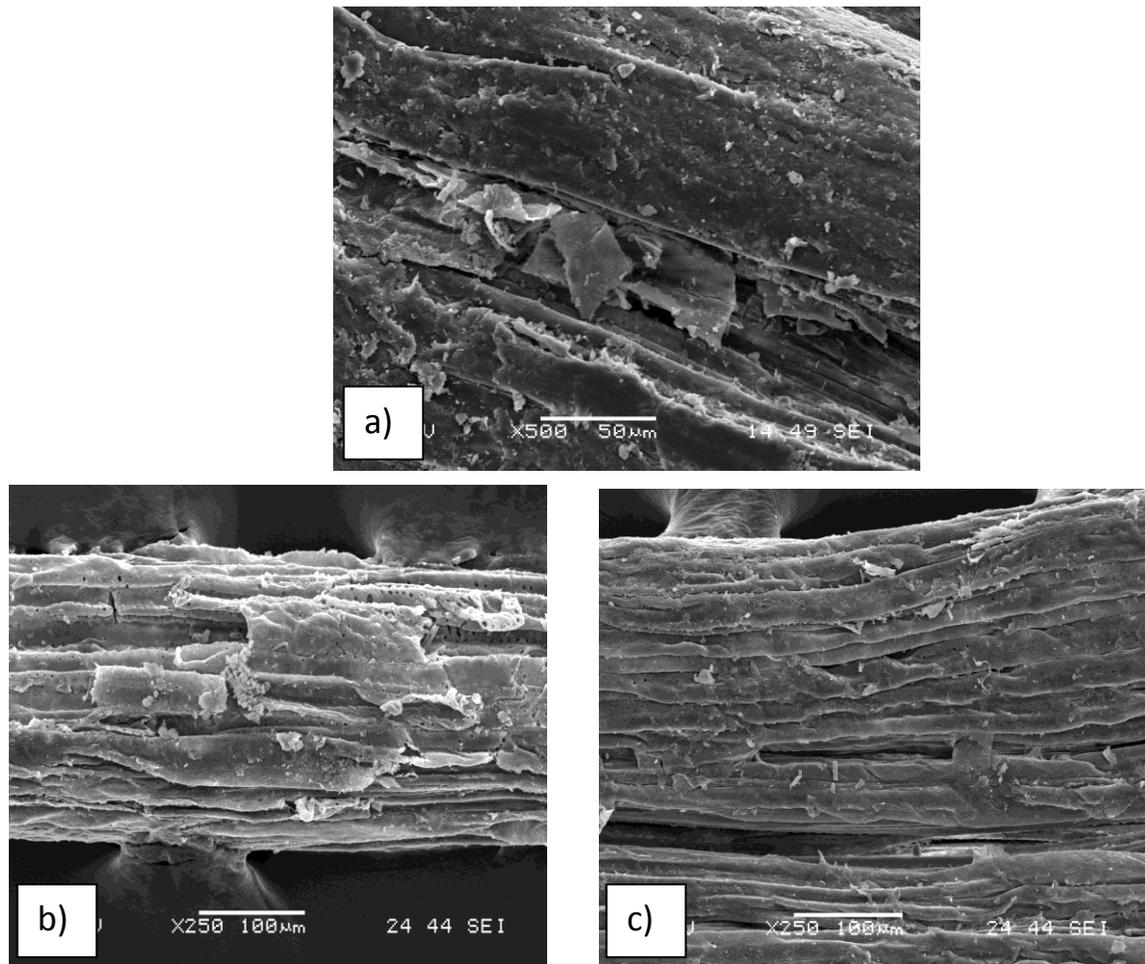


Figura 3.6 Micrografías de MEB (250 x) de fibras tratadas por explosión de vapor

a) Fibra sin tratamiento b) Pretratada a 5 bar c) Pretratada a 10 bar

3.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se realizó la hidrólisis enzimática a las fibras pretratadas mediante explosión de vapor y se cuantificaron los azúcares por medio de la técnica colorimétrica de DNS. Los azúcares reductores resultantes del proceso de hidrólisis enzimática de las fibras

pretratadas por explosión de vapor (Tabla 3.5) arrojaron valores bajos con respecto a los pretratados con agua caliente, esto es debido a que no hubo una apertura suficiente de la fibra, el área superficial accesible es baja y por lo tanto, las enzimas utilizadas no pudieron desdoblar en su totalidad la celulosa en glucosa. Habría que realizar el pretratamiento de explosión de vapor a más altas presiones para lograr una mayor apertura y área superficial de la fibra para así obtener mejores concentraciones de azúcares al momento de realizar la hidrólisis enzimática

Tabla 3.7 Cuantificación de azúcares obtenidos mediante hidrólisis enzimática de las fibras tratadas por explosión de vapor posterior a hidrólisis enzimática

Fibras pret.				
	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Azúcares reductores (mg/ml)	Rendimiento teórico de etanol (%)
10 bar	1	0.9012	5.13	16.22
15 bar	1	0.8870	6.74	20.95

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

El pretratamiento hidrotérmico con agua caliente solubiliza componentes de bajo peso molecular presentes en la fibra de bagazo de *Agave tequilana* y los oligosacáridos generados a través de la ruptura hidrolítica de las cadenas de hemicelulosa y de celulosa esto se demuestra con los análisis termogravimétricos (TGA) donde se observa que la pérdida de estos componentes es mayor conforme la fibra fue pretratada a más altas temperaturas y mayores tiempos de residencia. La fracción holocelulósica es la que presenta mayor pérdida de sus componentes debido a que el pretratamiento solubiliza la mayor parte de la hemicelulosa y también degrada azúcares presentes en otros productos como furfural, hidroximetilfurfural y ácidos carboxílicos.

De acuerdo con la microscopía electrónica de barrido (MEB) se observa que el pretratamiento de agua caliente logra exponer las fibras del bagazo del *Agave tequilana* donde se aprecia mayor porosidad y fibras separadas, estos cambios son más notorios a temperaturas y tiempos de residencia más altos.

La concentración de azúcares reductores medidos por los métodos colorimétricos de la fracción líquida va incrementándose conforme se aumenta la temperatura del pretratamiento de agua caliente y el tiempo de residencia.

La hidrólisis ácida desdobra solo la parte hemicelulósica, lo que genera monosacáridos como la xilosa; en este caso, hay un factor limitante en este proceso de hidrólisis que se ve reflejado en las concentraciones obtenidas por HPLC en donde no se pueden alcanzar concentraciones por encima de los 25 mg/ml; esto debido a que la temperatura de hidrólisis ácida es baja y se requiere temperaturas mayores de 125 °C para llevar a cabo una hidrólisis completa. Las concentraciones de azúcares obtenidos con la hidrólisis ácida son mayores con fibras pretratadas a más bajas temperaturas y con menor tiempo de residencia dentro del reactor Parr. La máxima concentración de xilosa se presenta con la fibra pretratada a 150 °C por 1 min. de residencia con hidrólisis ácida al 2 % a 40 minutos de reacción con 25.12 mg/ml.

El complejo de enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática son más específicas para desdoblar la fracción celulósica en glucosa. Las mayores concentraciones de azúcares se obtienen a temperaturas mayores y con mayor tiempo de residencia esto debido a que el área superficial accesible es mayor y que facilita la accesibilidad de las enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis. La mayor concentración se obtiene a 210 °C/60 min de residencia con 33.78 mg/ml.

El pretratamiento de explosión de vapor presenta en su composición química baja pérdida de masa, se recupera el 90 % de la fibra. El pretratamiento no modificó de manera significativa la fracción holocelulósica así como la lignina y los extraíbles, aunque si hay una pérdida de lignina conforme la presión del pretratamiento fue mayor, pero en un sentido práctico este pretratamiento no afecta la estructura de la fibra del bagazo de *Agave tequilana*. La microscopía óptica muestra que el área superficial accesible es casi la misma con respecto a la fibra original.

La hidrólisis enzimática realizada a las fibras pretratadas con explosión de vapor arroja concentraciones bajas con respecto a la concentración de azúcares hidrolizados enzimáticamente de las fibras pretratadas con agua caliente, esto debido a la poca área superficial accesible en las fibras por las presiones tan bajas utilizadas, dichos azúcares fueron medidos colorimétricamente. Habría que utilizar temperaturas y presiones más altas para lograr una buena apertura de la fibra para su posterior hidrólisis ácida o enzimática.

El rendimiento teórico de etanol obtenido a partir de la máxima concentración de azúcares (33.78 mg/ml) fue de 57 %. Con respecto a lo realizado por Saucedo L. *et al.*, 2010, donde se obtiene un rendimiento teórico de etanol del 48.05 % sacarificando químicamente, el pretratamiento hidrotérmico de agua caliente es una opción viable para obtener mayores rendimientos de azúcares durante la sacarificación enzimática.

RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se incluyen recomendaciones que podrían mejorar y eficientar los procesos, tanto de los pretratamientos hidrotérmicos como de sacarificación y evaluación de la composición química de las fibras:

Habría que investigar técnicas para medir solamente la fracción celulósica y hemicelulósica para no englobarlas en una sola (holocelulosa).

Es recomendable evaluar la concentración de los productos de degradación como furfural, hidroximetilfurfural y ácidos carboxílicos, que aunque están reportados en la literatura en este trabajo no se evaluó su concentración.

Realizar la hidrólisis ácida con H_2SO_4 a temperaturas mayores de 125 °C y que oscilen entre 150 – 200 °C, la limitante en este trabajo en las reacciones de hidrólisis química fue la temperatura que no permitió que se realice una hidrólisis completa.

Hay que realizar pruebas para medir la cristalinidad de la celulosa conforme se aumenta la temperatura y el tiempo de residencia de los pretratamientos, por ejemplo difracción de rayos X.

Al pretratamiento de explosión de vapor es necesario realizar pruebas con presiones mayores a 20 bar para lograr aperturar la fibra de buena forma. También es necesario encontrar recipientes colectores que atrapen la mayor cantidad de sólido, por ejemplo, un ciclón.

Realizar pruebas en serie de hidrólisis ácida y enzimática con el fin de observar si se obtienen mayores concentraciones de azúcares fermentables.

BIBLIOGRAFÍA

1. McLaren JS. The economic realities, sustainable opportunities, and technical promises of biofuels. *AgroBioForum*. 11:8–20, 2008.
2. Tirado Acevedo O., (2004), Characterization of microorganism with carbohydrase from tropical ecosystems, University of Puerto Rico, Doctoral Thesis.
3. González Y. González O. Nungaray J. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*, año/vol. 3. 2005. p. 1-18
4. Linerio J. Residuos Tequileros, Normatividad y Medio Ambiente, Bebidas Mexicanas .CIATEJ. México. 1998
5. Saucedo J, Castro A. J., Rico J. L., Campos J. Optimization of Acid Hydrolysis of bagasse from *Agave tequilana* Weber. *Rev Mex Ing Quím*. 2010.
6. Ye Sun, Jiayang Cheng. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 83, 1–11, 2002.
7. Sánchez, Julián. Cardona, Carlos. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. México. vol. 30, número 011 pp. 671-678, 2005
8. Perlack RD., Wright LL., Graham RL., et al. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. USDA and DOE Joint Report 2005, DOE/GO-102005-2135 or ORNL/TM-2005/66, 2005.
9. Faaij A. Modern Biomass Conversion Technologies. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change. 11(2): p. 335-367, 2006.

10. Johnson JM-F, Coleman MD, Gesch R, et al. Biomass-bioenergy crops in the United States: a changing paradigm. *Am. J Plant Sci Biotechnol.* 1:1–28, 2007.
11. Howard R.L. Abotsi E2. Jansen van Rensburg E.L. Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol.* Vol. 2 (12), 602-619. 2003.
12. Wong KKY., Tan LUL., Saddler JN. Multiplicity of b-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbio Rev.* 52:305–317, 1988.
13. Parveen Kumar, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, and Pieter Stroeve. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng Chem. Research*, 2009.
14. Lynd R.L. Paul J. Weimer. Willem H. van Zyl. Isak S. Pretorius. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Molec Bio Rev*, Vol 66, No. 3, p. 506–577. 2002.
15. Lynd, L.R., C.E. Wyman, and T.U. Gerngross. Biocommodity Engineering. *Biotechnol Progress.* 15(5): p. 777-793, 1999.
16. Marchessault, R. H., and P. R. Sundararajan en *Cellulose*, p. 11–95 In G. O. Aspinall (ed.), *The polysaccharides*, vol. 2. Academic Press, Inc., New York, N.Y., 1993.
17. Brown Jr. R.M. and I.M. Saxena. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physio Biochem.* 38(1-2): 57-67, 2000.
18. Atalla, R. H., J. M. Hackney, I. Uhlin, and N. S. Thompson. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int. J Biol Macromole.* 15:109–112, 1993.
19. Langan, P., Y. Nishiyama, and H. Chanzy, X-ray Structure of Mercerized Cellulose II at 1 Å Resolution. *Biomacro.* 2(2): p. 410-416. 2001.

20. Deguchi, S., K. Tsujii, and K. Horikoshi. Crystalline-to-amorphous transformation of cellulose in hot and compressed water and its implications for hydrothermal conversion. *Green Chem.* 10(2): p. 191-196. 2008.
21. Ehara, K. and S. Saka. A comparative study on chemical conversion of cellulose between the batch-type and flow-type systems in supercritical water. *Cellulose.* 9(3): p. 301-311. 2002.
22. Sasaki, M., T. Adschiri, and K. Arai. Kinetics of cellulose conversion at 25 MPa in sub- and supercritical water. *AIChE J.* 50(1): 192-202. 2004.
23. Zeikus JG., Lee C., Lee YE., Saha BC. Thermostable saccharidases: new sources, uses, and biodesign. In: Leatham GF, Himmel ME (eds) *Enzymes in biomass conversion*. American Chemical Society, Washington, D.C., pp 36–51, 1991.
24. Laine C. Structure of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. *Res Proj.* ISSN 1457-6252, pp. 16-17, 2005.
25. Viikari L., Tenkanen M., Buchert J., Ratto M., Bailey M., Siikaaho M., Linko M. Hemicellulases for industrial applications. In: Saddler JN (ed). *Bioconv forest agri plant resid.* CAB, Oxford, pp 131–182, 1993.
26. Nissen AM., Anker L., Munk N., Lange NK. Xylanases for the pulp and paper industry. In: Visser J, Beldman G, Kusters-Van Someren MA, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*. Elsevier, Amsterdam, pp 325–337, 1992.
27. Viikari L., Kantelinen A., Sundquist J., Linko M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol Rev.* 13:335–350, 1994.
28. Coughlan MP., Hazlewood GP. β -1,4-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Appl. Biotechnol Biochem.* 17:259–289, 1993.

29. Idarraga G., Ramos J., Zuniga V., Sahin T., Young R. Pulp and Paper from Blue Agave Waste from Tequila Production. *J Agri Food Chem.* 47: 4450-4455, 1999.
30. Hamelinck C. Van Hooijdonk G. Faaij A. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass Bioener.* 28: 384-410. 2005.
31. Galbe M. Zacchi G. Production of ethanol from biomass-Research in Sweden. *J Sci Ind Res.* Vol. 64, pp. 905-919. 2005.
32. Taherzadeh Mohammad J. and Keikhosro Karimi. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *J Bioresour.* 2007.
33. Taherzadeh Mohammad J. and Keikhosro Karimi. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int J of Mol Sci.* 9, 1621-1651. 2008.
34. Galbe M, Sassner P. Wingren A. Zacchi G. Process Engineering Economics of Bioethanol Production. *Adv. Biochem Engineering Biotech.* 108: 303-327. 2007.
35. Chang, V. S., Barry Burr, and Mark T. Holtzapple. Lime Pretreatment of Switchgrass. *Appl. Biochem Biotech.* 63-65, 3-19, 1997.
37. Holtzapple M. T., Jun J.-H., Ashok G., Patibandla, S. L., and Dale, B. E. The ammonia freeze explosion (AFEX) process. *Appl. Biochem Biotech.* 59-74, 1991.
38. Hogan C. M. and Mes-Hartree M. Recycle of cellulases and the use of lignocellulosic residue for enzyme production after hydrolysis of steam-pretreated aspenwood. *J Ind. Microbiol.* 253-262, 1990.
38. Galbe M. Zacchi G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv. Biochem Engineering Biotech.* 108: 41-65. 2007.

39. Philip T. Pienkos, Min Zhang. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 16:743–762. Springer. 2009.
40. Cuervo L., Folch J.L., Quiroz R.E. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTec*, Vol. 13 No. 3, 2009.
41. Teramoto Y., Tanaka N., Lee S., Endo T. Pretreatment of eucalyptus wood chips for enzymatic saccharification using combined sulfuric acid-free ethanol cooking and ball milling. *Biotechnol Bioeng*. 99, 75–85, 2008.
42. Hashaikeh, R., Fang, Z., Butler, I.S., Hawari, J., Kozinski, J.A. Hydrothermal dissolution of willow in hot compressed water as a model for biomass conversion. *Fuel* 86. 1614–1622. 2007.
43. Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J, Goffner D. Lignins and lignocellulosics a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science*. 8(12):576-581. 2003.
44. Aleixandre J.L., et al., Varietal Differentiation of Red Wines in the Valencian Region (Spain). *J Agri Food Chem*. 751-755, 2002.
45. Arrizon J. Fiore C. Acosta G. Romano P. Gschaedler A. Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek*.181–189, 2006.
46. Garrote, G., Cruz, J.M., Domínguez, H., Parajó, J.C. Non-isothermal autohydrolysis of barley husks: product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions. *J Food Eng*. 84, 544–552. 2008.
47. Cara, C., Romero, I., Oliva, J.M., Sáez, F., Castro, E. Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Appl. Biochem Biotech*. 136–140, 379–394. 2007.

48. Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J., Lynd, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pre-treatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour Technol.* 81, 33–44. 2002.
49. Díaz, M.J. Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw. *Bio.* 101(7): p. 2428-2435, 2010.
50. Zhang, B., et al., Hot-water pretreatment of cattails for extraction of cellulose. *J Ind. Microbiol Biotechnol*, p. 1-6, 2010.
51. Mosier, N., et al., Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Appl. Biochem Biotech*, 125(2): 77-97, 2005.
52. Sasaki M, Furukawa M, Minami K, Adschiri T and Arai K. Kinetics and Mechanism of Cellobiose Hydrolysis and Retro-Aldol condensation in Subcritical and Supercritical Water. *Ind. Eng Chem.* Vol. 41, pp.6642-6648. 2002..
53. Mosier N., et al., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 96(6): p. 673-686, 2005.
54. Ballesteros, I., et al., Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. *Appl. Biochem Biotech.* 717-732, 2002.
55. Zhang, M., et al., Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Optimizing Enzyme Complexes. *Appl. Biochem Biotech.* 160(5): p. 1407-1414, 2010.
56. Karimi, K., Kheradmandinia, S., and Taherzadeh, M. J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass Bioener.* 30(3), 247-253, 2006.
57. Cedeño M. Tequila production from agave: historical influences and contemporary process. In: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall DR (eds) *The alcohol textbook*, 4th edn. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 225-241, 2003.

58. NOM-006-SCFI-2005. Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Secretaría de Economía, Diario Oficial de la Federación. México, 6 de enero de 2006.
59. López M.G., N.A. Mancilla-Margalli and G. Mendoza-Díaz. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J Agri Food Chem.* 51(27): p. 7835-7840, 2003.
59. Mancilla-Margalli, N.A. and M.G. López. Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasyliirion Species. *J Agri Food Chem.* 54(20): 7832-7839, 2006.
61. Iñiguez C.G., AcostaT.N, Martínez C.L., Parra J, González O. Utilización de subproductos de la industria tequilera, Parte7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Rev Int Contamin Amb.* 17(2). 2004.
62. Iñiguez C. G., Fuentes T. F.J., Lange S.E., Rowell R.M. Bagazo de agave como materia prima para la fabricación de tableros aglomerados. Obtención de Materiales Compuestos Empleando Polímeros Naturales. Eds. Francisco J. Fuentes Talavera, José Antonio Silva Guzmán, Juan Ramos Quitarte. Impreso en México, 2007.
63. Iniguez-Covarrubias G, Lange SE, Rowell RM. Utilization of byproducts from the tequila industry: part 2 potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresour Technol.* 77:101-108. 2001.
64. Iniguez-Covarrubias G, Lange SE, Rowell RM. Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and berboard. *Bioresour Technol.* 77:25-32. 2001.
65. Academia Mexicana del tequila, A.C. Fecha de consulta: 23/08/2011.
<http://www.acamextequila.com.mx/amt3/elagave.html> .

66. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. Colorimetric Method for determination of sugars and substances related. *Analytical Chem.* p. 320. 1959.
67. Lorenz G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* Vol. 31 No. 3, 1959.
68. G. Sesta, "Determination of sugars in royal jelly by HPLC". *Apidologie* 37: 84–90, 2006.
69. Kim Y. Hendrickson R. Mosier N.S. Ladisch M.R. Liquid hot water pretreatment of cellulosic biomass. Chapter 7. *Biofuels.* vol. 581. 2009.
70. R.J. Balam Cocom. S. Duarte Aranda. G. Canché Escamilla. Obtención y caracterización de materiales compuestos de fibras de la "piña" de henequén y polipropileno. *Rev Mex Ing Quím.* Noviembre, vol. 5, número Su1: p. 39-44. 2006.
71. Íñiguez C.G. Valadez A. Manríquez R. and Moreno M.V. Utilization of by-products from the tequila industry. part 10: characterization of different decomposition stages of *Agave tequilana* webber bagasse using ftir spectroscopy, thermogravimetric analysis and scanning electron microscopy. *Rev Int Contamin Amb.* 27 (1) 61-74. 2011.
72. Benn S.M. and T.L. Peppard. Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis. *J Agri Food Chem.* 557-566, 1996.
73. Bozell, J.J., Moens, L., Elliott, D.C., Wang, Y., Neuenschwander, G.G., Fitzpatrick, S.W., Bilski, R.J. and Jarnefeld, J.L.. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Resour Conserv Recyc.* 28, 227-239. 2000.
74. Ballesteros I. Oliva J.M., Navarro A.A., González A., Carrasco J., Ballesteros M. Effect of chip Size on Steam Explosion Pretreatment of Softwood. *Appl. Biochem Biotech,* Vol. 84–86, 2000.

75. Mancilla-Margalli N., Lopez M.G. Generation of Maillard compounds from inulin during thermal processing of *Agave tequilana* blue variety. *J Agri Food Chem.* 50:806–812, 2002.
76. M.J. Taherzadeh and K. Karimi. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J Mol Sci.* 9, 1621-1651, 2008
77. Mosier, N., et al., Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour Technol.* 96(18): 1986-1993, 2005.
78. Negro M. Manzanares P. Ballesteros I. Oliva J.M. Cabañas A. Ballesteros M. Hydrothermal Pretreatment Condition to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. *Appl. Biochem Biotech*, Vol. 105–108, 2003.
79. Negro M. Manzanares P. Ballesteros I. Oliva J.M. Cabañas A. Ballesteros M. Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Appl. Biochem Biotech*, Vol. 129–132, 2006.
80. Patrouilleau R.D. Lacoste C. Yapura P. Casanovas M. Perspectiva de los biocombustibles en Argentina, con énfasis en el etanol de base celulósica. Unidad de Coyuntura y Prospectiva. 2006.
81. Pinal L. Cornejo E. Arellano M. Herrera E. Núñez L. Arrizon J. Gschaedler A. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 36:655–661, 2009.
82. Pinal L. Cedeño M. Gutiérrez H. Alvarez-Jacobs J. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol Lett.* 19:13–56, 1997.
83. Rapp A. Volatile flavor of wine: correlation between instrumental analysis and sensory analysis. *Nahrung.* 42:351–363, 1998.

84. Rogelio, P.-R., et al., The role of distillation on the quality of tequila. *Int J Food Sci Technol.* 40(7): p. 701-708, 2005.
85. Sabon, I., et al. Determination of Volatile Compounds in Grenache Wines in Relation with Different Terroirs in the Rhone Valley. *J Agri Food Chem.* 50(22): p. 6341-6345, 2002.
86. Waleckx E., et al. Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production. *Food Chem.* 124(4): 1533-1542, 2011.