



**Secretaría de Educación Pública**



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**  
**Instituto Tecnológico de Veracruz**

**“Estudio de la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y  
*Agave angustifolia* para la producción de azúcares  
fermentables”**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de:**

**Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica**

**Presenta:**

**IBQ. María Guadalupe Moran Aguilar**

**Asesores:**

**Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga**

**Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez**

**Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez (UAT)**

**H. Veracruz Ver.**

**Abril, 2018**

**“Estudio de la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* para la producción de azúcares fermentables”**

por:

**IBQ. MARÍA GUADALUPE MORAN AGUILAR**

Tesis propuesta a la:

**Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos**

del

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

ASESORES:

**Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga**

**Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez**

**Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez (UAT)**

Veracruz, Ver, 26 de abril de 2018.

## DEDICATORIA

A Dios por permitirme alcanzar una meta más en mi vida, apoyándome en todo momento y poniendo a las personas indicadas en mi camino.

A mi madre, por enseñarme a ser una mujer valiente y responsable y estar conmigo en todo momento durante esta etapa de mi vida, este grado nos lo ganamos mami.

A mi abuelita por ser la luz de mi corazón, quererme, apoyarme y creer siempre en mí.

A mis hermanos Roberto y Arturo, que siempre han estado conmigo y me han alentado a ser mejor persona, soñar y trabajar duro para alcanzar mis metas y jamás rendirme.

A mis tías (Blanca, Reina, Marita y María) que siempre han estado conmigo apoyándome y tratándome como una hija más, escuchándome, aconsejándome y ayudando a alcanzar mis sueños, gracias a todas.

A mi tía Chapí, por darme el ejemplo de una mujer trabajadora e inteligente capaz de conseguir y alcanzar sus sueños, trabajando siempre con todo el corazón, gracias tía por todas las oportunidades y enseñanzas que me ha dejado en este tiempo siempre se lo agradeceré.

A mis amigas del laboratorio por todas las risas, carcajadas y experiencias que formaron parte de una etapa más de mi vida, gracias por los concejos y por la amistad.

A todos mis amigos de la maestría, por estar siempre conmigo sin un horario fijo y apoyándome en todo momento intercambiando reactivos y prestándome la balanza, gracias chicos.

A mis amigos Alicia, David e Iván, por la hospitalidad y por la bonita amistad que nos brindaron en todo momento, por todas las risas, las aventuras y los ratos inolvidables.

## RECONOCIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Veracruz, que por medio de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos y los programas de calidad para la formación y progreso de científicos y tecnólogos, ayudan al desarrollo e innovación de nuestra nación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada y los incentivos de promoción recibidos para realizar estancias fuera del país.

A la Dra. Guadalupe Aguilar, mi asesora, apoyo y motivación en todo momento, gracias por los consejos, la paciencia y sobre todo por creer en mí.

A las Doctoras, Beatriz Torrestiana S., Carolina Peña M., Madeleine Hidalgo M. por apoyarme en mi desarrollo, presentación y culminación de mi trabajo, y que a lo largo de mi maestría contribuyeron de manera importante en mi formación profesional.

A mi amigo y asesor el Doc. Castañón quien desde la licenciatura me brindo su amistad y apoyo en el laboratorio y quien durante la maestría estuvo siempre para ayudarme a mejorar mi trabajo, gracias por las minuciosas revisiones en mi tesis y tu mucha paciencia conmigo.

A la Universidad de Vigo en España, pero en especial al Doctor José Manuel Domínguez Gonzáles que me permitió vivir una muy grata experiencia durante mi estancia, gracias por todo su apoyo y por todas las atenciones que me ayudaron para desarrollar técnicas y procesos que enriquecieron mi proyecto de maestría.

A la Maestra Dulce, por su apoyo incondicional y por siempre ayudarnos a resolver nuestras dudas y problemas.

## RESUMEN

Moran Aguilar, María Guadalupe. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Abril, 2018. “Estudio de la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* para la producción de azúcares fermentables”. Asesores: Aguilar Uscanga María Guadalupe, Torrestiana Sánchez Beatriz, Castañón Rodríguez Juan Francisco.

El bagazo de caña de azúcar (BC) y *Agave angustifolia* (BAA) por su composición lignocelulósica poseen potencial para la generación de productos de valor agregado, sin embargo, debido a la complejidad de su estructura lignocelulosa, es necesaria la optimización de cada etapa del proceso de pretratamiento, para así lograr una mayor producción de azúcares fermentables durante la etapa enzimática. Por lo que el objetivo general del trabajo fue obtener las mejores condiciones de pretratamiento considerando dos procesos: proceso (1), pretratamiento ácido (HA) y alcalino (HAL) seguido de la hidrólisis enzimática (HE), proceso (2), pretratamiento HAL e HE. Cada pretratamiento fue optimizado utilizando un diseño de experimentos Box Behnken seguido de la etapa de sacarificación utilizando la enzima Cellic CTec3 para la obtención de glucosa y xilosa. Para ello se evaluó la concentración de  $H_2SO_4$  (v/v), la relación líquido-sólido RLS (mL:g) y el tiempo de reacción (min) en la HA, mientras que en la HAL se evaluó la concentración de  $H_2O_2$  (v/v), la RLS y el tiempo de reacción (h). Para la HA las mejores condiciones obtenidas fueron: 3%  $H_2SO_4$ , una RLS de 6:1 y 15 min para el BC, y 4%  $H_2SO_4$ , una RLS de 4:1 y 35 min a 121°C para el BAA, obteniendo una concentración final de 29.17 g/L y 27.73 g/L de xilosa, respectivamente. En la HAL las condiciones que removieron la mayor cantidad de lignina fueron: 9%  $H_2O_2$ , RLS 19:1 y 44 h para el BC y en el BAA 6%  $H_2O_2$ , RLS 15:1 y 45 h a temperatura ambiente, removiendo hasta una concentración de 2.76 y 10.23% de lignina respectivamente. Para el proceso (2) las condiciones óptimas utilizando bagazo crudo fueron: 6%  $H_2O_2$ , RLS de 12:1 y 37 h en el BC y 6%  $H_2O_2$ , RLS 10:1 y 37 h para el BAA, dando como resultado un porcentaje de lignina residual de 7.54 y 10%, respectivamente. La producción de azúcares finales para el primer proceso fue de 167.92 y 117.12 g/L en BC y BAA y para el proceso No. 2, 159.57 y 44.32 g/L para BC y BAA. Se generó mayor cantidad de azúcares fermentables en el proceso (1) utilizando una etapa ácida y una alcalina antes de la hidrólisis enzimática, sin embargo, el proceso (2) alcanzó una conversión del 80 y 55% en glucosa y 98 y 17% en xilosa para BC y BAA, utilizando únicamente un pretratamiento alcalino y una celulasa (Cellic CTec3), lo que disminuye el número de etapas del pretratamiento y por ende el costo del proceso. Por lo anterior se puede concluir que el uso de Cellic CTec3 en comparación con lo reportado en la literatura, utilizando otros complejos enzimáticos mejora la conversión de azúcares fermentables, por lo que el uso industrial de esta enzima de última generación es viable para el proceso de obtención de glucosa y xilosa.

## ABSTRACT

Moran Aguilar, María Guadalupe. Master of Science in Biochemical Engineering. Food Research and Development Unit of the Veracruz Institute of Technology. April, 2018. "Study of the saccharification of sugarcane and *Agave angustifolia* bagasses for fermentable sugar production". Advisors: Aguilar Uscanga, María Guadalupe, Torrestiana Sánchez, Beatriz, Castañón Rodríguez, Juan Francisco.

Sugarcane bagasse (SB) and *Agave angustifolia* bagasse (AAB) due to their lignocellulosic composition, have the potential to generate value-added products. However, due to the complexity of their lignocellulosic structure, it is necessary to optimize each stage of the pretreatment process, in order to generate a higher production of fermentable sugars during the enzymatic stage. Therefore, the approach of this work was to obtain the best pretreatment conditions considering two processes: either acid pretreatment (AP) and alkaline pretreatment (ALP) followed by an enzymatic hydrolysis (EH) or only ALP followed by EH. Each pretreatment was optimized using a Box Behnken experiment design followed by the saccharification stage using the Cellic CTec3 enzyme to obtain glucose and xylose. In the AP, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v) concentration, liquid-solid ratio (LSR; mL:g) and reaction time (min) were assessed, while in the ALP H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) concentration, LSR (mL:g) and reaction time (h) were tested.

The best conditions obtained in the AP were a 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration, a 6:1 LSR for 15 min for SB, and 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a 4:1 LSR for 35 min at 121°C for AAB, obtaining final concentrations of 29.17 and 27.73 g/L xylose, respectively. Likewise, in the ALP, the conditions that removed the highest amount of lignin were 9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 19:1 LSR for 44 h with SB and 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 15:1 LSR for 45 h at room temperature for AAB, removing 2.74 and 10.23% lignin respectively. During the second process, the optimal conditions using raw bagasse were 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 12:1 LSR for 37 h for SB and 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 10:1 LSR for 37 h in AAB, obtaining final percentages of 7.54 and 10% residual lignin respectively. The final productions of fermentable sugars according to the first process were 167.92 and 117.12 g/L in SB and AAB respectively and for the second process, 159.57 and 44.32 g/L SB and AAB respectively. The first process generated a greater production of fermentable sugars using an acid hydrolysis and an alkaline stage before enzymatic hydrolysis; however, during the second process percentage conversions of 80 and 55% glucans and 98 and 17% xylans in SB and AAB respectively were obtained using only an alkaline pretreatment and a cellulase (Cellic CTec3), which decreases the number of pretreatment stages and therefore process cost. Consequently, it can be concluded that the use of Cellic CTec3, in comparison with other enzymatic complexes reported in the literature, improves the conversion of fermentable sugars, making the industrial use of this last generation enzyme viable for the process of obtaining glucose and xylose

# CONTENIDO

RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	V
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	XI
I. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Materiales lignocelulósicos.....	3
2.1.1. Bagazo de caña de azúcar. ....	4
2.1.2. Bagazo de <i>Agave angustifolia</i> .....	5
2.1.3. Composición y estructura de la materia lignocelulósica. ....	5
2.1.3.1. Celulosa. ....	7
2.1.3.2. Hemicelulosa.....	7
2.1.3.3. Lignina. ....	8
2.2. Pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables. ....	8
2.2.1. Pretratamiento mecánico. ....	8
2.2.2. Pretratamiento químico.....	9
2.2.2.1. Hidrólisis ácida. ....	9
2.2.2.2. Hidrólisis alcalina. ....	9
2.2.2.3. Deslignificación oxidativa. ....	9
2.2.3. Pretratamientos biológicos.....	10
2.2.3.1. Hidrólisis enzimática.....	10
2.2.3.2. Celulasas comerciales ....	12
2.2.3.3. Enzimas de última generación. ....	15
2.2.3.3.1. Cellic CTec3. ....	16
2.2.3.3.2 Cellic HTec3. ....	17
2.3. Bioetanol. ....	18
2.3.1. Bioetanol de segunda generación.....	19
3. JUSTIFICACIÓN. ....	21

4. OBJETIVOS.....	23
4.1. OBJETIVO GENERAL. ....	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	24
5.1. Obtención del bagazo de caña de azúcar y <i>Agave angustifolia</i> . ....	26
5.2. Caracterización del bagazo de caña de azúcar y <i>Agave angustifolia</i> . ....	26
5.3. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento ácido del proceso No.1. ....	27
5.3.1. Optimización de la hidrólisis ácida en el BC.....	28
5.3.2. Optimización de la hidrólisis ácida en el BAA. ....	30
5.4. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino en el proceso No.1. ....	30
5.4.1. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BC pretratado con ácido. ....	31
5.4.2. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BAA pretratado con ácido.....	34
5.5. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación en el proceso No 1. ....	35
5.5.1. Hidrólisis enzimática en el BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación. ....	36
5.5.2. Hidrólisis enzimática del BAA pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación. ....	37
5.6. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino del proceso No. 2.....	38
5.7. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 de última generación en el proceso No. 2. ....	39
5.7.1. Hidrólisis enzimática del BC pretratado utilizando Cellic CTec3.....	39
5.7.2. Hidrólisis enzimática del BC pretratado utilizando las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3. ....	40
5.7.3. Hidrólisis enzimática del BAA pretratado utilizando Cellic CTec3. ....	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. Caracterización del bagazo de caña de azúcar y <i>Agave angustifolia</i> . ....	41
6.2. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento ácido del proceso No.1. ....	43
6.2.1. Optimización de la hidrólisis ácida en el BC.....	43



6.2.2. Optimización de la hidrólisis ácida en BAA. ....	46
6.3. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino del proceso No 1. ....	50
6.3.1. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BC pretratado con ácido. ....	50
6.3.2. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BAA pretratado con ácido. ....	54
6.4. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación en el proceso No 1. ....	57
6.4.1. Hidrólisis enzimática del BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación. ....	57
6.4.2. Hidrólisis enzimática del BAA pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación. ....	60
6.5. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino en el proceso No. 2. ....	62
6.5.1. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BC crudo. ....	62
6.5.2. Optimización de la hidrólisis alcalina en BAA crudo. ....	66
6.6. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 de última generación en el proceso No. 2. ....	69
6.6.1. Hidrólisis enzimática en el BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3. ....	69
6.6.2. Hidrólisis enzimática en el BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 y Cellic HTec3. ....	72
6.6.3. Hidrólisis enzimática en el BAA pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3. ....	73
7. CONCLUSIONES .....	75
8. BIBLIOGRAFÍA .....	76

## LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1	Composición lignocelulósica promedio de materiales de desecho .....	6
TABLA 2.2	Microorganismos y propiedades bioquímicas en la producción de celulasas .....	13
TABLA 2.3	Aplicaciones de las celulasas en la industria .....	14
TABLA 5.1	Parámetros para la caracterización del BC y BAA .....	27
TABLA 5.2	Diseño de experimentos para el pretratamiento ácido en BC .....	28
TABLA 5.3	Diseño de experimentos para el pretratamiento ácido en BAA .....	30
TABLA 5.4	Condiciones óptimas establecidas para la producción de glucosa en bagazo de sorgo dulce pretratado.....	36
TABLA 6.1	Valores de la caracterización lignocelulósica obtenidos para el BC .....	41
TABLA 6.2	Valores de la caracterización lignocelulósica obtenidos para el BAA .....	42
TABLA 6.3	Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis ácida en el BC .....	44
TABLA 6.4	Antecedentes de la etapa de hidrólisis ácida en BC .....	46
TABLA 6.5	Condiciones óptimas obtenidas del pretratamiento ácido en BAA .....	48
TABLA 6.6	Antecedentes de hidrólisis ácida en BAA .....	50
TABLA 6.7	Resultados obtenidos de lignina remante para el BC pretratado .....	51
TABLA 6.8	Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en BC pretratado .....	52
TABLA 6.9	Resultados obtenidos de lignina remanente para BAA pretratado .....	54
TABLA 6.10	Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en el BAA pretratado .....	55
TABLA 6.11	Hidrólisis enzimática con enzimas comerciales .....	59
TABLA 6.12	Etapas de producción para la obtención de glucosa a partir del BC .....	60
TABLA 6.13	Resultados obtenidos de lignina remanente para el pretratamiento alcalino en el BC .....	63
TABLA 6.14	Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en el BC .....	64
TABLA 6.15	Resultados obtenidos de lignina remanente para el pretratamiento alcalino en el BAA .....	67
TABLA 6.16	Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en el BAA.....	68

TABLA 6.17	Concentraciones de azúcares fermentables obtenidos por diferentes complejos enzimáticos .....	71
------------	---	----

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1.	Representación esquemática de las etapas involucradas en la conversión de la biomasa en bioetanol y otros productos de valor agregado en el mercado (Alvira <i>et al.</i> , 2010) .....	3
FIGURA 2.2.	Bagazo de caña de azúcar obtenido después de la molienda.....	4
FIGURA 2.3.	Fibras de bagazo de <i>Agave angustifolia</i> apilado en el tradicional “Palenque” (Hidalgo-Reyes <i>et al.</i> , 2015) .....	5
FIGURA 2.4.	Estructura esquemática del material lignocelulósico (Conde-Mejía <i>et al.</i> , 2012).....	7
FIGURA 2.5.	Sitios de acción del complejo enzimático en la celulosa (Saini <i>et al.</i> , 2015) .....	11
FIGURA 2.6.	Sitios de acción del complejo enzimático en la hemicelulosa (Coughlan y Hazlewood, 1993) .....	11
FIGURA 2.7.	Eficiencia de conversión de Cellic CTec3 (Novozymes, 2012).....	15
FIGURA 2.8.	Rendimiento relativo del producto de Cellic CTec3 con respecto a la temperatura de reacción para el rastrojo de maíz durante 3-5 días y pH de 5 (Novozymes, 2012) .....	16
FIGURA 2.9.	Rendimiento relativo del producto de Cellic CTec3 con respecto al pH de reacción para el rastrojo de maíz, durante 3-5 días y temperatura 52.5 °C (Novozymes, 2012) .....	17
FIGURA 2.10.	Respuesta de la dosis de Cellic HTec3 en comparación con Cellic HTec2 para la producción de xilosa a partir de mazorca de maíz (Novozymes, 2012) .....	18
FIGURA 2.11.	Pretratamientos utilizados para la conversión de los polisacáridos estructurales en azúcares simples para la producción de bioetanol.....	20
FIGURA 5.1.	Metodología general para los dos procesos de producción de azúcares fermentables evaluados.....	25
FIGURA 5.2.	BC después de ser sometido a una hidrólisis ácida .....	29
FIGURA 5.3.	Pretratamiento alcalino utilizando BC pretratado para la remoción de lignina.....	31
FIGURA 5.4.	Etapas de la metodología NREL: a) BC molido; b) Hidrólisis con ácido concentrado; c) Hidrólisis con ácido diluido; d) Residuo de lignina de Klason para cuantificar .....	32
FIGURA 5.5.	Experimentos del pretratamiento alcalino en BAA.....	35
FIGURA 5.6.	BC residual después del pretratamiento ácido y alcalino.....	37
FIGURA 5.7.	BAA residual después del pretratamiento ácido y alcalino.....	38
FIGURA 5.8.	Bagazo residual después del pretratamiento alcalino: a) BC; b) BAA .....	39
FIGURA 6.1.	Bagazo residual después de la hidrólisis ácida utilizando BC .....	43

FIGURA 6.2.	Gráficas de producción de xilosa (g/L) en la hidrólisis ácida del BC por el efecto de: a) RLS vs concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y b) RLS vs Tiempo.....	45
FIGURA 6.3.	Bagazo residual después de la hidrólisis ácida utilizando BAA.....	47
FIGURA 6.4.	Gráficas de producción de xilosa (g/L) en la hidrólisis ácida del BAA del efecto de: a) RLS vs Tiempo y b) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vs Tiempo.....	49
FIGURA 6.5.	Porcentaje de lignina residual después del pretratamiento alcalino en BC del efecto de: a) RLS vs Tiempo; b) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs Tiempo; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs RLS.....	53
FIGURA 6.6.	Gráficas del porcentaje de lignina residual en el BAA después del pretratamiento alcalino del efecto de: a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs Tiempo; b) RLS vs Tiempo.....	57
FIGURA 6.7.	Cinética enzimática en BC pretratado utilizando Cellic CTec3 .....	58
FIGURA 6.8.	Cinética enzimática utilizando BAA pretratado para la producción de glucosa.....	61
FIGURA 6.9.	Gráficas del porcentaje de lignina residual en el BC después del pretratamiento alcalino del efecto de: a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs RLS; b) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs Tiempo; c) RLS vs Tiempo.....	66
FIGURA 6.10	Gráficas de porcentaje de lignina remanente en el BAA del efecto de: a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs RLS; b) Tiempo vs RLS.....	69
FIGURA 6.11.	Cinética enzimática en BC pretratado utilizando Cellic CTec3.....	70
FIGURA 6.12.	Cinética enzimática utilizando BC pretratado y las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 .....	72
FIGURA 6.13.	Cinética enzimática en BAA pretratado utilizando Cellic CTec3.....	73

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la generación de alternativas energéticas distintas a las tradicionales obtenidas principalmente de la explotación del petróleo, ha llevado al uso, investigación y desarrollo de materias primas renovables que sustituyan el uso de fuentes no renovables.

En México, con la nueva reforma energética se ha implementado el uso del etanol como sustituto oxigenante de la gasolina en un 5.8%, lo que implica un incremento en la demanda nacional, así mismo, esto ha generado el interés de la industria alcoholera en aumentar su producción considerando otras materias primas alternas, entre las que se encuentran los residuos lignocelulósicos.

La biomasa lignocelulósica generada principalmente de los desechos agroindustriales se ha convertido en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de alcohol carburante uno de los más importantes. Sin embargo, debido a su estructura lignocelulósica de compleja degradación es necesario la aplicación de diversos pretratamientos (físicos, químicos, y/o biológicos) los cuales liberen los polisacáridos estructurales en azúcares simples, para su posterior fermentación a bioetanol (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010).

El bioetanol de segunda generación producido a partir de residuos lignocelulósicos ha tomado un reciente interés debido a sus ventajas tales como: no compite con la materia prima para producción de insumos de consumo humano, hay disponibilidad en abundancia y es considerado un desecho.

México es un país cañero y mezcalero por tradición, por lo cual su industria azucarera y alcoholera genera grandes cantidades de bagazo de caña de azúcar y de *Agave angustifolia* las cuales son materias primas con un alto contenido lignocelulósico que pueden ser utilizados para la producción de etanol.

Sin embargo, el material lignocelulósico debe ser sometido a pretratamientos previos: físicos, químicos y biológicos, que reduzcan el contenido de lignina, disminuyan la cristalinidad de la celulosa e incrementen el área de contacto (Hernández-Salas *et al.*, 2009). Esto es, para una mayor accesibilidad de los azúcares durante la hidrólisis enzimática, y así obtener una mayor eficiencia en la conversión de glucosa y xilosa, que son los principales carbohidratos que se fermentan a etanol.

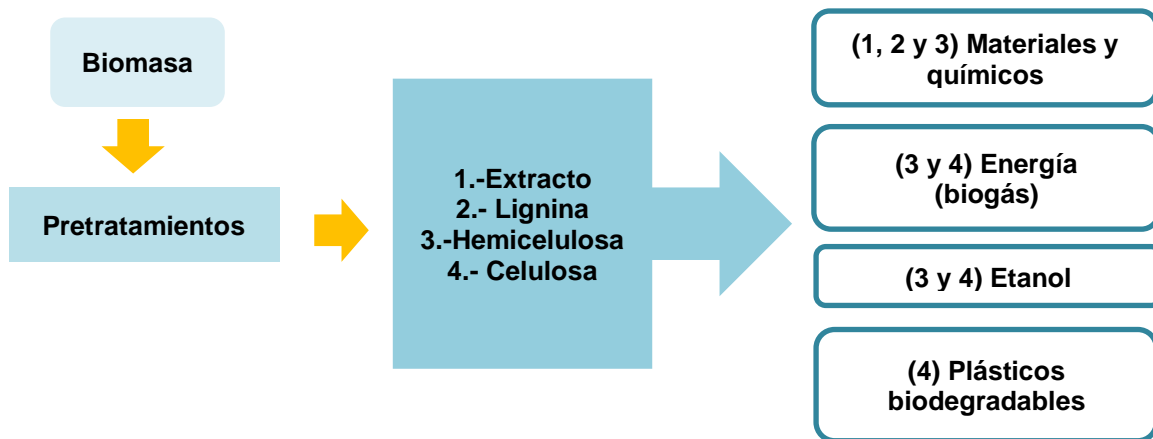
Debido a que los procesos para la producción etanol de segunda generación no han mostrado eficiencias por arriba del 80%, el objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones de pretratamiento y sacarificación del bagazo de caña de azúcar y del *Agave angustifolia* utilizando las enzimas de última generación Cellic CTec3 y Cellic HTec3 para la producción de azúcares fermentables.

En este trabajo se describe en la primera parte una revisión bibliográfica sobre residuos lignocelulósicos, enzimas y descripción de procesos de etanol de segunda generación, posteriormente los materiales y métodos utilizados y finalmente los resultados obtenidos y conclusiones.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Materiales lignocelulósicos

En la actualidad la biomasa lignocelulósica, en especial los residuos agroindustriales (bagazo de caña, agave, rastrojo de maíz y paja) se generan en gran cantidad, siendo utilizados solo el 30% de estos en alimento para ganado y fertilizante principalmente, mientras que el resto es quemado generando contaminación al ambiente. Debido a esto se han realizado investigaciones para la obtención de productos de alto valor en el mercado (Figura 2.1) a partir de estos desechos (Venkatesh y Pradeep, 2013).



**FIGURA 2.1.** Representación esquemática de las etapas involucradas en la conversión de la biomasa en bioetanol y otros productos de valor agregado en el mercado (Alvira *et al.*, 2010).



### **2.1.1. Bagazo de caña de azúcar.**

El bagazo de caña de azúcar (BC) (Figura 2.2) es un material lignocelulósico abundante y de bajo costo que se obtiene como residuo del proceso de extracción del jugo de la caña de azúcar (Ferrara *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2000). Este corresponde generalmente al 25% del peso total y contiene entre 60-80% de carbohidratos.



**FIGURA 2.2. Bagazo de caña de azúcar obtenido después de la molienda.**

Se ha reportado que una tonelada de caña de azúcar genera entre 280 a 300 Kg de bagazo (Sun *et al.*, 2004). Por lo que la fermentación de los carbohidratos de este material podría incrementar significativamente la productividad de etanol en la industrial alcoholera, así como la sostenibilidad del proceso, sin embargo, el bagazo se desecha como residuo agrícola o es quemado para el suministro de energía en las calderas de las fábricas de azúcar y etanol.

### **2.1.2. Bagazo de *Agave angustifolia*.**

El bagazo de *Agave angustifolia* (BAA) (Figura 2.3) es un desecho lignocelulósico proveniente del proceso de producción de mezcal, que se genera después de la cocción, molienda y extracción del jugo fermentable de la piña del agave.



**FIGURA 2.3. Fibras de bagazo de *Agave angustifolia* apilado en el tradicional “Palenque” (Hidalgo-Reyes *et al.*, 2015).**

Se sabe que la industria del mezcal en Oaxaca genera aproximadamente 123 mil toneladas de bagazo de agave mezcalero anualmente y se considera que el 40% del peso total de agave corresponde al bagazo residual, lo que ocasiona grandes volúmenes de desecho sin uso alguno, además de generar problemas en la modificación del pH del suelo, contaminación al ambiente y presencia de microorganismos patógenos (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

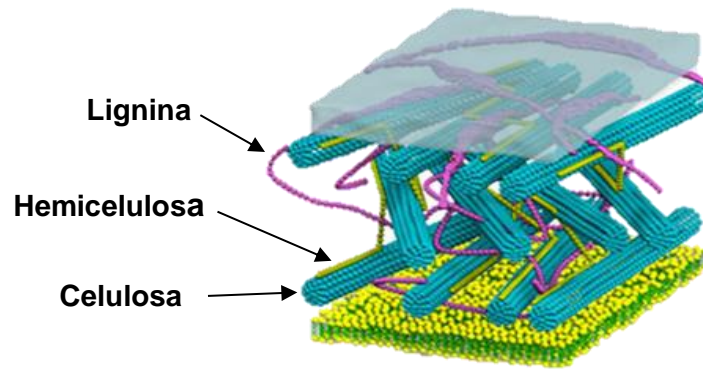
### **2.1.3. Composición y estructura de la materia lignocelulósica.**

Los materiales lignocelulósicos (MLC) derivados de los residuos agrícolas, agroindustriales, forestales y desechos sólidos municipales (Tabla 2.1) están principalmente constituidos de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) e incrustados en una matriz de lignina (Figura 2.4). Estos generalmente se obtienen a partir de la extracción del jugo de la planta, que representa aproximadamente entre el

25 y 40% del material procesado dependiendo del contenido de fibra en la materia prima y la eficiencia de la extracción del molino utilizado (Pernalet *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2011).

**TABLA 2.1. Composición lignocelulósica promedio de materiales de desecho.**

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>Celulosa % (p/p)</b>	<b>Hemicelulosa % (p/p)</b>	<b>Lignina % (p/p)</b>	<b>Referencias</b>
<b>Cascarilla de arroz</b>	26-39	18-21	18-25	(Valverde <i>et al.</i> , 2007)
<b>Bagazo de caña</b>	49	25	26	(Area, 2002)
<b>Bagazo de <i>Agave angustifolia</i></b>	48	34	20	(Hidalgo-Reyes <i>et al.</i> , 2015)
<b>Subproductos de Plátano (cáscara y banano)</b>	13.2	14.8	14	(Monsalve <i>et al.</i> , 2006)



**FIGURA 2.4. Estructura esquemática del material lignocelulósico (Conde-Mejía *et al.*, 2012).**

### **2.1.3.1. Celulosa.**

La celulosa es un homopolisacárido lineal compuesto de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4) (Li *et al.*, 2010). Los numerosos grupos hidroxilo de la celulosa favorecen la formación de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, formando en cada unidad de glucosa dos enlaces intramoleculares y uno intermolecular. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares se establecen con otras cadenas que están en el mismo plano, así como con cadenas en planos superiores e inferiores, de este modo, las cadenas de celulosa se unen dando lugar a microfibrillas, y la unión de estas entre sí da lugar a la fibra de la celulosa (Tomas, 2010; Marques, 2010).

### **2.1.3.2. Hemicelulosa.**

La hemicelulosa es un heteropolisacárido ya que su estructura está compuesta por pentosas como: D-xilosa, D-arabinosa y hexosas tales como: D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, así como también de ácido D-glucurónico y ácido 4-Ometil-D-glucurónico (Li *et al.*, 2010). Este heteropolisacárido sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, además de proporcionar rigidez a la planta.

### **2.1.3.3. Lignina.**

La lignina, es un polímero tridimensional aromático, el cual está formado por la condensación oxidativa de precursores fenólicos (unidades de fenilpropano oxigenadas) como *p*-coumaril, coniferil y alcohol sinapílico unidas por enlaces carbono-carbono o enlaces tipo éter (Mooney *et al.*, 1998; Camparros, 2009; Ahuja, 2011).

La lignina provee de rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos, así mismo participa en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Las uniones lignina-hemicelulosa se realizan mediante intermediarios cinamílicos tales como el ácido ferúlico, el ácido diferúlico y el ácido *p*-cumárico, los cuales se unen mediante diferentes intermediarios monoméricos a la cadena principal del xilano (Tomás, 2010).

## **2.2. Pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables.**

Las tecnologías implicadas en la transformación del material lignocelulósico son necesarias para mejorar los rendimientos de azúcares simples fermentables que se liberan por hidrólisis enzimática, por lo que un pretratamiento efectivo debe minimizar la degradación de carbohidratos, la producción de inhibidores enzimáticos y productos tóxicos para la fermentación de microorganismos (Taherzadeh y Karimi, 2008; Krishnan *et al.*, 2010).

Así mismo estos deben de generar una modificación macro y microscópica de la estructura del material lignocelulósico, favorecer la explosión de las fibras de celulosa para facilitar el acceso de las enzimas, esto es incrementando la porosidad del material lignocelulósico, disminuir y remover la lignina (deslignificación), y promover las regiones amorfas de la celulosa (Sun y Cheng, 2002; Taherzadeh y Karimi, 2008; Cardona *et al.*, 2010)

### **2.2.1. Pretratamiento mecánico.**

La trituración mecánica consiste en la molienda para reducción del tamaño de partícula de malla inferior a 40, sin embargo, este pretratamiento solo, tiene un efecto mínimo en los rendimientos de hidrólisis para azúcares estructurales (Chang y Hotzapple, 2000).

## **2.2.2. Pretratamiento químico.**

### **2.2.2.1. Hidrólisis ácida.**

La hidrólisis ácida es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Utilizando diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. Este método se agrupa en dos tipos: ácidos concentrados (10-30%), los cuales trabajan a bajas temperaturas (30-90°C) y mayor tiempo de residencia y ácidos diluidos (1-5%): utilizan temperaturas altas (100-240°C) y el tiempo de reacción de minutos (Galbe y Zacchi, 2002; Liu y Wyman, 2003). Este último método es el más utilizado debido a su efectividad y bajo costo, ya que los métodos basados en ácidos concentrados son muy caros y causan significativos problemas operacionales (Wyman, 1994; Carvalheiro *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

### **2.2.2.2. Hidrólisis alcalina.**

La hidrólisis alcalina promueve la digestibilidad de la celulosa, debido a que los grupos hidroxilo generan un hinchamiento en el material lignocelulósico, así mismo debido a la remoción de la lignina disminuye el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa (Arni *et al.*, 2007; Carvalheiro *et al.*, 2008).

Este pretratamiento consiste en la adición de un compuesto alcalino, y se pueden dividir en dos grupos: los que utilizan hidróxido de sodio (NaOH), potasio (KOH), y calcio (Ca (OH)<sub>2</sub>) y los que utilizan hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH). Este método genera reacciones tales como: sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, rompimientos de vínculos de alquil, aril, éter o de núcleos aromáticos (Hon y Shiraishi, 2001).

### **2.2.2.3. Deslignificación oxidativa.**

Este proceso implica el tratamiento de la biomasa lignocelulósica mediante agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el ozono y oxígeno (Nakamura *et al.*, 2004). Durante el pretratamiento oxidativo pueden tener lugar varias reacciones químicas tales como la sustitución electrofílica, los desplazamientos de la cadena lateral y la

escisión oxidativa de los enlaces de éter en el anillo aromático, lo que causa la deslignificación fraccionando la lignina en ácidos, sin embargo, estos pueden actuar como inhibidores, por lo que deben ser eliminados (Alvira *et al.*, 2010).

El agente oxidante más comúnmente empleado es el peróxido de hidrógeno. Se ha encontrado que la hidrólisis del peróxido de hidrógeno conduce a la formación de radicales hidroxilos ( $\text{OH}^\cdot$ ) los cuales son responsables de la degradación de la lignina y la producción de productos de bajo peso molecular. La eliminación de la lignina de la lignocelulosa expone celulosa y hemicelulosa, lo que conduce a una mayor hidrólisis enzimática (Hammel *et al.*, 2002).

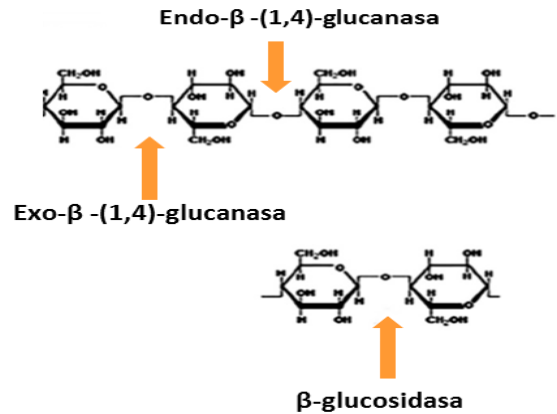
Según Saha y Cotta (2007) el pretratamiento con peróxido en condiciones alcalinas (adición de NaOH) aumentó la producción de azúcares reductores con más del 96% de conversión celulósica en comparación con la ausencia de álcali, así mismo Cao *et al.* (2012) realizaron el pretratamiento de bagazo de sorgo dulce a través de diferentes procesos de pretratamiento y encontraron el mayor rendimiento con NaOH diluido seguido de pretratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Esto ocurre ya que la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en condiciones alcalinas es rápida y como consecuencia genera radicales más reactivos ( $\text{OH}^\cdot$ ) y aniones superóxidos ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ) los cuales degradan la lignina de la biomasa lignocelulósica.

### **2.2.3. Pretratamientos biológicos.**

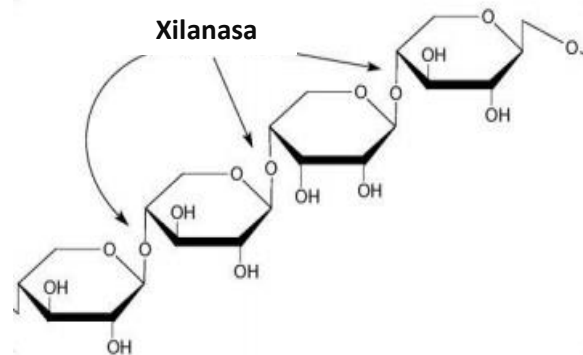
#### **2.2.3.1. Hidrólisis enzimática.**

Esta reacción es catalizada por las enzimas denominadas celulasas, cuyo propósito es la degradación de celulosa, este complejo enzimático (Figura 2.5) está compuesto principalmente de: endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa, exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa (Percival *et al.*, 2006; Kuhad *et al.*, 1997; Deswal *et al.*, 2011). Las endoglucanasas atacan aleatoriamente el enlace interno O-glicosídico, produciendo cadenas de glucosa de diferentes tamaños. Las exoglucanasas actúan en los extremos de la cadena de celulosa y genera como producto final la  $\beta$ -celobiosa. La  $\beta$ -glucosidasa actúa específicamente en el disacárido  $\beta$ -celobiosa generando el monosacárido de glucosa (Bayer *et al.*, 1994; Singh, 1999).



**FIGURA 2.5. Sitios de acción del complejo enzimático en la celulosa (Saini *et al.*, 2015).**

Así mismo el uso de xilanasas (Figura 2.6) como pretratamiento para la degradación de hemicelulosa en sus monómeros utilizando un sistema complejo de enzimas, las cuales atacan la cadena principal, lo que origina el desprendimiento de grupos laterales unidos a los residuos de xilosa (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas,  $\beta$ -1,4-xilosidasas y exo-xilanasas) (Loera-Corral, 2002).



**FIGURA 2.6. Sitios de acción del complejo enzimático en la hemicelulosa (Coughlan y Hazlewood, 1993).**



Las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (E.C. 3.2.1.8.) rompen los enlaces glicosídicos internos del esqueleto del heteroxilano, este ataque depende de la cantidad y tipo de sustituyentes en la cadena principal (Coughlan, 1992). Las enzimas  $\beta$ -xilosidasas o 1,4-xilosidoxilohidrolasas (E.C. 3.2.1.37) pueden ser mono, di o tetraméricas, son expresadas por hongos o bacterias, las cuales son capaces de romper enlaces  $\beta$ -xilósidos artificiales, así como oligómeros puros de xilosa con enlaces  $\beta$ -1,4, incluyendo xilobiosa, generando dos moléculas libres de xilosa (Coughlan *et al.*, 1993).

### **2.2.3.2. Celulasas comerciales**

La conversión biotecnológica de biomasa celulósica es un enfoque potencialmente sostenible para desarrollar nuevos bioprocesos y productos, en donde las celulasas microbianas se han convertido en los biocatalizadores principales debido a su naturaleza compleja y sus diversas aplicaciones industriales. Las celulasas son enzimas inducibles sintetizadas por una gran diversidad de microorganismos que incluyen hongos y bacterias durante su crecimiento en materiales celulósicos (Tabla 2.2). Estos microorganismos pueden ser aeróbicos, anaeróbicos, mesófilos o termófilos, entre los cuales destacan los géneros de *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus*, ya que son los microorganismos productores de celulasas más estudiados

**TABLA 2.2. Microorganismos y propiedades bioquímicas en la producción de celulasas.**

<b>Fuente</b>	<b>Mr (kDa)</b>	<b>pH óptimo</b>	<b>Temperatura óptima (°C)</b>
<b>β-glucosidasas</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	105-330	4.6-5.3	55-70
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	NR	3.5	60
<i>Fomitopsis pinicola</i>	105	4.5	50
<i>Melanocarpus sp.</i>	92	6	60
<i>Penicillium purpurogenum</i>	110	5	65
<b>Celulasas</b>			
<i>Trichoderma reesei</i>	48	4-5	50
<i>Aspergillus nidulans</i>	83	5	50
<i>Geotrichum sp.</i>	80	5.5	55
<i>Fusarium oxysporum</i>	42.7	5	75

Fuente: Rashid y Siddiqui (1998)

NR: no reportado

### 2.2.3.2.1. Aplicación industrial.

Las celulasas microbianas encuentran aplicaciones en varias industrias como se muestra en la Tabla 2.3.

**TABLA 2.3. Aplicaciones de las celulasas en la industria.**

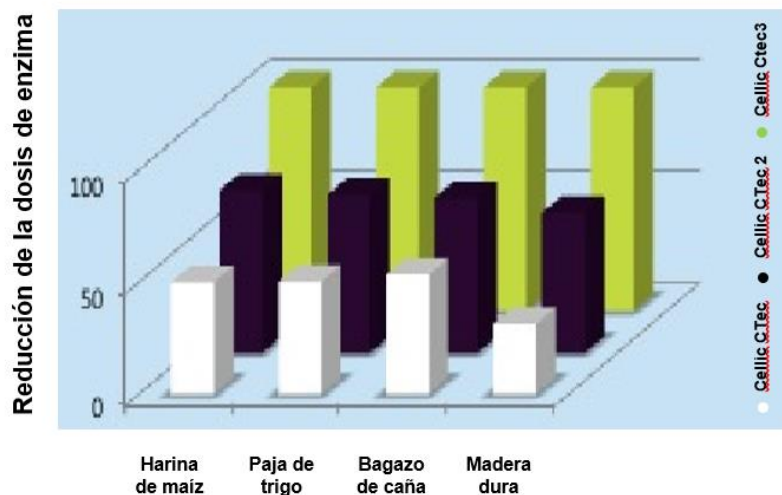
<b>Industria</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Agricultura</b>	Mejoramiento de la calidad del suelo y menor dependencia de los fertilizantes minerales.
<b>Bioconversión</b>	Conversión de materiales celulósicos en etanol, disolventes, ácidos orgánicos, proteínas de células individuales y lípidos.
<b>Detergentes</b>	Eliminación de protuberancias ásperas en tejidos de algodón.
<b>Fermentaciones</b>	Mayor calidad en el malteado, macerado y aroma de vinos. Mejoramiento del rendimiento en la fermentación primaria y calidad de la cerveza.
<b>Alimenticia</b>	Mayor rendimiento en la extracción de almidón y proteína, maceración, prensado y extracción del color de frutas y verduras.
<b>Papel</b>	Coaditivo en el blanqueamiento de la pasta, pulpa biomecánica, destintado enzimático, menor requerimiento de energía y cloro en el proceso.
<b>Textil</b>	Mayor estabilidad de los tejidos celulósicos y la eliminación del exceso de colorante de las telas
<b>Otros</b>	Mejoramiento de la calidad y extracción de carotenoides y aceite de oliva. Menor riesgo de desechos de biomasa y residuos tóxicos.

Fuente: Ramesh *et al.* (2011)

### 2.2.3.3. Enzimas de última generación.

La conversión de biomasa lignocelulósica en etanol implica la fracción y liberación de azúcares. Estos materiales se componen de tres fracciones principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y la hemicelulosa contienen azúcares en forma polimérica que pueden convertirse por enzimas en monómeros para su fermentación y producción de etanol. Por lo que en la actualidad el estudio para la generación de enzimas altamente específicas sobre sustratos lignocelulósicos y con mayores rendimientos en cuanto a la conversión de azúcares fermentables ha incrementado.

Entre las enzimas de última generación destacan las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 catalizadores producidos por la empresa Novozymes las cuáles poseen mayor rendimiento que otras enzimas comerciales.



**FIGURA 2.7. Eficiencia de conversión de Cellic CTec3 (Novozymes, 2012).**

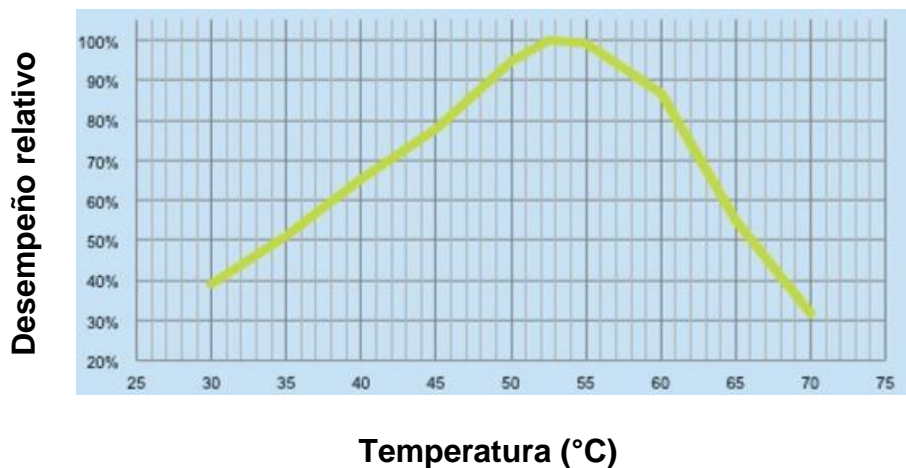
En la Figura 2.7 se muestra la eficiencia de conversión de Cellic CTec3 la cual aumenta 1.5 veces en comparación con sus antecesoras. Dentro de la familia Cellic, Cellic CTec3 ha demostrado su eficacia en una amplia variedad de tipos de materia prima pretratados, incluidos rastrojo de maíz, mazorca de maíz, fibra de maíz, paja de trigo,

bagazo de caña de azúcar, pulpa de madera y desechos sólidos municipales (Novozymes, 2012).

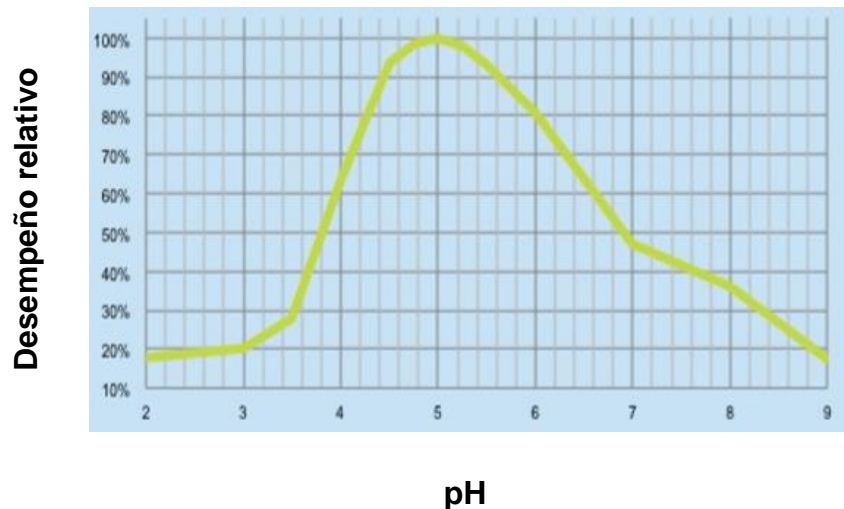
### 2.2.3.3.1. Cellic CTec3.

Cellic CTec3 (E.C. 3.2.1.4.) es un complejo enzimático con una actividad celulasa y un alto nivel de  $\beta$ -glucosidasas-xilanasa para degradación de celulosa a glucosa principalmente. Su presentación comercial consiste en una preparación líquida estable a rangos de pH entre 4-9 con una densidad de 1.2 g/mL.

Sin embargo, el rendimiento óptimo del complejo se produce en un rango de temperatura de 50-55°C (Figura 2.8) y en un pH de 4.75-5.25 (Figura 2.9), además este contiene una actividad enzimática de 1.700 BHU/g-producto (Unidades de Hidrólisis de Biomasa).



**FIGURA 2.8.** Rendimiento relativo del producto de Cellic CTec3 con respecto a la temperatura de reacción para el rastrojo de maíz, durante 3-5 días y pH 5 (Novozymes, 2012).



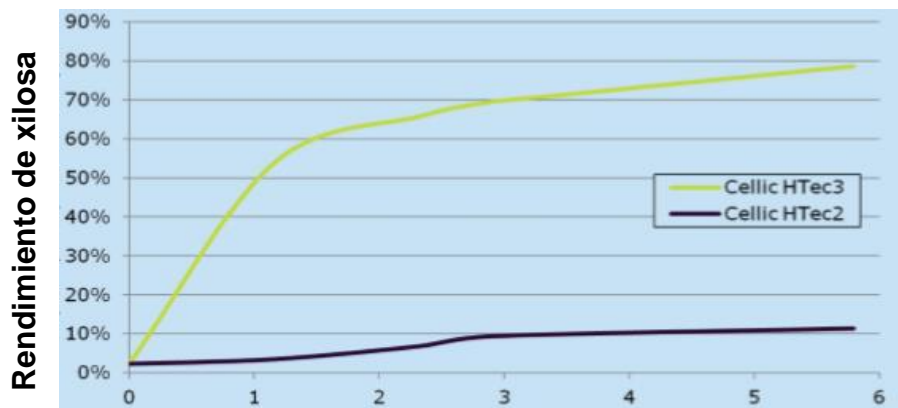
**FIGURA 2.9. Rendimiento relativo del producto de Cellic CTec3 con respecto al pH de reacción para el rastrojo de maíz, durante 3-5 días y temperatura 52.5°C (Novozymes, 2012).**

Se ha estudiado que este complejo enzimático realiza un trabajo cinco veces mejor que el producto antecesor Cellic CTec2, ya que se estima que se requiere aproximadamente 50 Kg de Cellic CTec3 para convertir una tonelada de biomasa a azúcares fermentables para la producción de etanol, en comparación con su antecesor que se requiere 250 Kg de enzima para la conversión de la misma cantidad de biomasa (Novozymes, 2012).

### **2.2.3.3.2 Cellic HTec3.**

Cellic HTec3 (E.C. 3.2.1.37) es un complejo enzimático con actividad declarada de xilanasas (endo-1,4), el cual consiste en una preparación líquida de xilanasas, estable en rangos de pH entre 4-9 con una densidad de 1.2 g/mL.

Cellic HTec3 ha demostrado mayor eficiencia de conversión de hemicelulosa a xilosa principalmente en comparación con su antecesor Cellic HTec2 como se muestra en la Figura 2.10.



**Carga enzimática (g Cellic HTec3/100 g xilosa)**

**FIGURA 2.10. Respuesta a la dosis de Cellic HTec3 en comparación con Cellic HTec2 para la producción de xilosa a partir de mazorca de maíz (Novozymes, 2012).**

El rendimiento óptimo de Cellic HTec3 según la ficha técnica se produce a un rango de temperatura de 40-45°C y a pH 4.8-5.2, sin embargo, las condiciones óptimas pueden variar con los sustratos de pretratamiento específicos y las condiciones del proceso.

### **2.3. Bioetanol.**

El bioetanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) es producido debido a la fermentación de azúcares y almidones presentes en diversas materias orgánicas. Bajo condiciones ordinarias, el bioetanol es volátil, inflamable y se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares.

En la actualidad el bioetanol ha tomado un interés potencial como biocombustible debido a diversas ventajas tales como:

- No incrementa los niveles de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera, por lo cual reduce el efecto invernadero y contaminación ambiental.
- Proporciona una fuente de energía reciclable y por lo tanto inagotable.

- Reactivan la economía rural, debido a la generación de empleo al favorecer la puesta en marcha de un nuevo sector en el ámbito agrícola.
- Disminución de los excedentes agrícolas que se generan en grandes cantidades sin uso alguno.
- Competitividad al no depender de las energías tradicionales extranjeras (Núñez-García y García-Triñanes, s.f.).

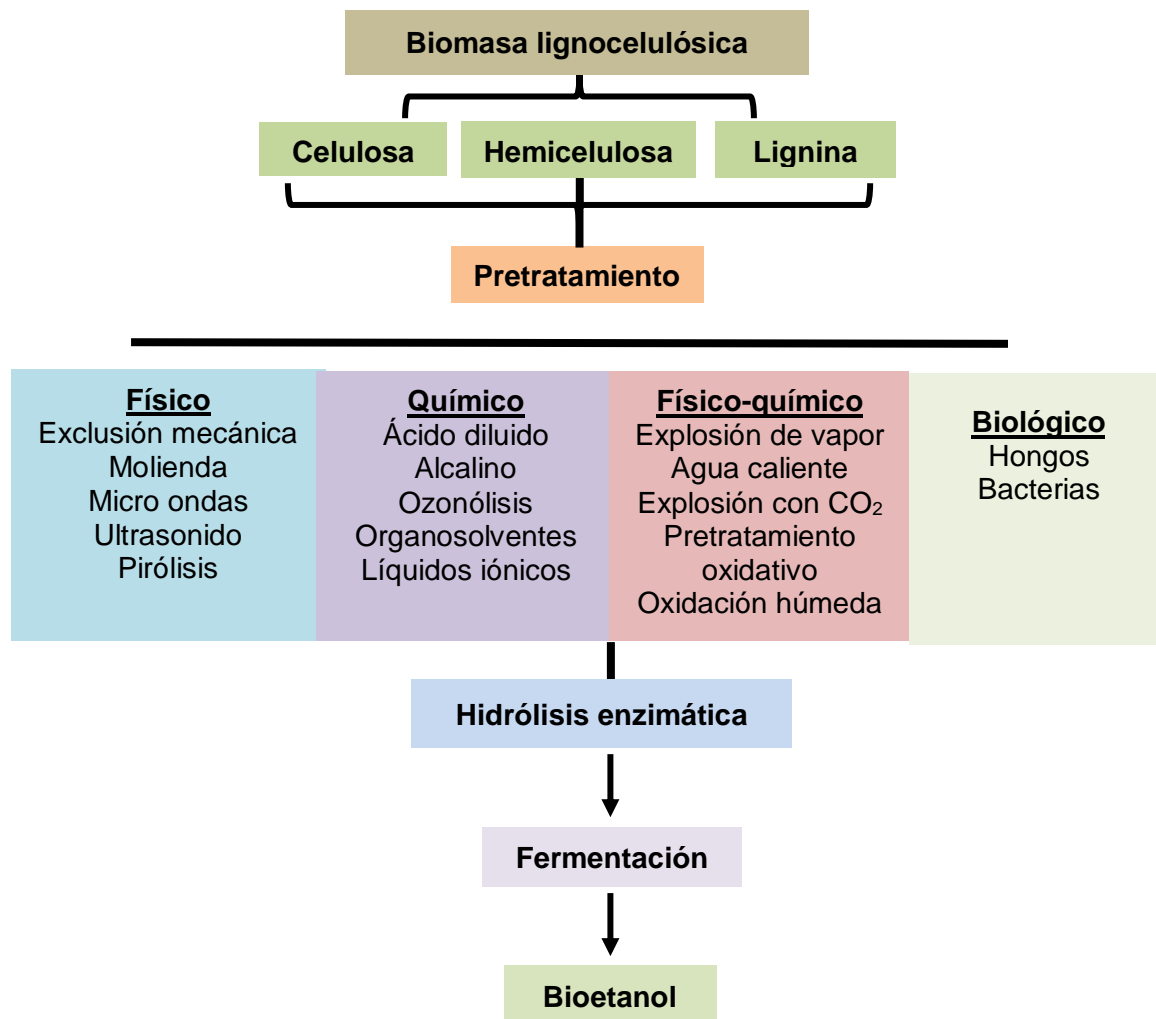
### **2.3.1. Bioetanol de segunda generación.**

El bioetanol de segunda generación (Figura 2.11) es aquel que se produce mediante el pretratamiento (físico, químico y biológico) de residuos lignocelulósicos en donde se hidrolizan los polisacáridos estructurales generando azúcares simples para su fermentación y producción de materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de alcohol carburante una de las más importantes (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010)

El proceso de obtención de etanol de segunda generación requiere de más etapas respecto al de primera generación debido a la estructura compleja de la biomasa, así mismo de este proceso se obtiene una variedad de productos tales como: metanol, gas de síntesis (mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno), biodiesel, 2,5-dimetilfurano (DMF), entre otros.

Sin embargo, durante el proceso de segunda generación la etapa de pretratamiento es un parteaguas para la mayor producción de azúcares y así potencializar la etapa de fermentación. Por lo tanto, se buscan pretratamientos viables tanto en proceso como económicamente para la conversión de los residuos, así mismo el uso de microorganismos, hongos y/o bacterias con características deseables a nivel industrial (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010).





**FIGURA 2.11. Pretratamientos utilizados para la conversión de los polisacáridos estructurales en azúcares simples para la producción de bioetanol.**

### 3. JUSTIFICACIÓN.

El reciente incremento del uso del etanol como biocombustible u oxigenante en la gasolina ha provocado el interés de la industria alcoholera en aumentar su producción considerando otras materias primas alternas. En México, con la nueva reforma energética se ha implementado el uso del etanol como sustituto oxigenante de la gasolina en un 5.8%, lo que involucra un incremento en la demanda nacional.

Debido a lo anterior el bioetanol de segunda generación, producido a partir de residuos lignocelulósicos ha generado un reciente interés ya que ofrece ventajas tales como: no compite con la materia prima para producción de insumos de consumo humano, hay disponibilidad en abundancia y es considerado un desecho sin valor agregado. Así mismo, México es considerado un país cañero y mezcalero por tradición, por lo cual su industria azucarera y alcoholera genera grandes cantidades de bagazo de caña de azúcar y de *Agave angustifolia*, los cuales son materias primas con un alto contenido lignocelulósico que pueden ser utilizados para la producción de etanol de segunda generación.

Sin embargo, la optimización de cada etapa del proceso de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar y agave, son elementos importantes para una obtención eficiente de azúcares fermentables para obtener un máximo rendimiento y productividad de etanol. Así mismo se ha encontrado que el uso de enzimas de última generación Cellic CTec3 y Cellic HTec3 en bagazo de sorgo es 2.5 veces mayor que el obtenido por otras enzimas comerciales en cuanto a la conversión de azúcares fermentables, además no se han encontrado trabajos en donde reporten el uso de estas enzimas en bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia*.

Por último, se ha observado que el proceso de fermentación a partir del hidrolizado de residuos lignocelulósicos no ha mostrado tener eficiencias por arriba del 85% por lo

cual, es necesario el estudio y establecimiento de condiciones adecuadas para mejorar el proceso de etanol de segunda generación.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar las mejores condiciones para la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* utilizando la enzima Cellic CTec3 para la producción de azúcares fermentables.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Caracterizar la composición lignocelulosa del material (bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia*)
- Establecer las mejores condiciones de hidrólisis ácida en el bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia*.
- Establecer las mejores condiciones de hidrólisis alcalina en el bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* en bagazo pretratado.
- Establecer las mejores condiciones de hidrólisis alcalina en el bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* en bagazo crudo.
- Sacarificar el bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* pretratado con la enzima de última generación Cellic CTec3, para la producción de glucosa y xilosa.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

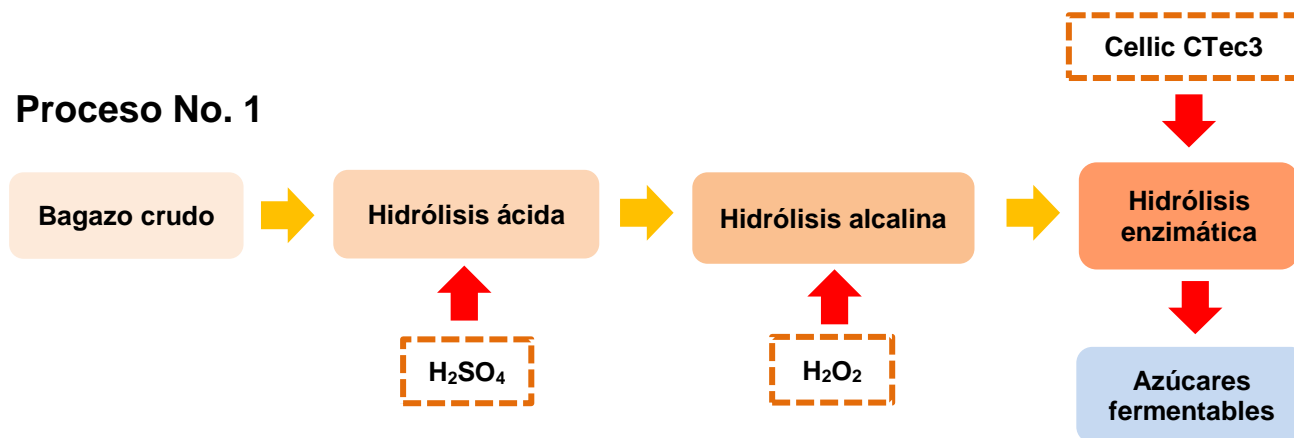
Un factor importante en el proceso de producción de azúcares fermentables a partir de residuos agroindustriales es el establecimiento de las mejores condiciones en cada una de las etapas de los pretratamientos.

Por lo anterior dos procesos utilizando diferentes etapas de pretratamientos fueron evaluados, para obtener un rendimiento por arriba del 85% de conversión del material pretratado a glucosa y xilosa.

Como se muestra en la Figura 5.1, el proceso No. 1 inició con una pretratamiento ácido, el cual degrada el polímero de hemicelulosa a monómeros (xilosa y glucosa principalmente), teniendo como variable de respuesta la concentración de xilosa (g/L) presente en el sobrenadante líquido, posteriormente después de haber evaluado el diseño Box Behnken y establecido las mejores condiciones de esta etapa, utilizando bagazo pretratado con las condiciones ácidas determinadas pasa a una deslignificación utilizando  $H_2O_2$ , en donde las variables se evaluaron mediante un diseño Box Behnken y una vez que se obtuvo el mejor pretratamiento deslignificador pasó a una última etapa, la cual consistió en degradar la fracción de celulosa que queda después de los dos pretratamientos utilizando la enzima de última generación (Cellic CTec3), aplicando las condiciones establecidas por Guarneros-Flores (2017) para la mayor producción de glucosa.

Se ha reportado que durante el pretratamiento ácido se generan productos inhibidores tales como: el ácido acético, hidroximetilfurfural y furfural, los cuales disminuyen el rendimiento durante la fermentación. Por tal motivo se optó por evaluar la aplicación de dos etapas de pretratamiento, por lo que en el proceso No.2 se eliminó la etapa de hidrólisis ácida, iniciando con la optimización de la hidrólisis alcalina utilizando  $H_2O_2$  y un diseño Box Behnken, una vez obtenidas las mejores condiciones de esta fase se prosiguió a la sacarificación de la biomasa utilizando una celulasa (Cellic CTec3) para la conversión de glucanos a glucosa principalmente.

### Proceso No. 1



### Proceso No. 2

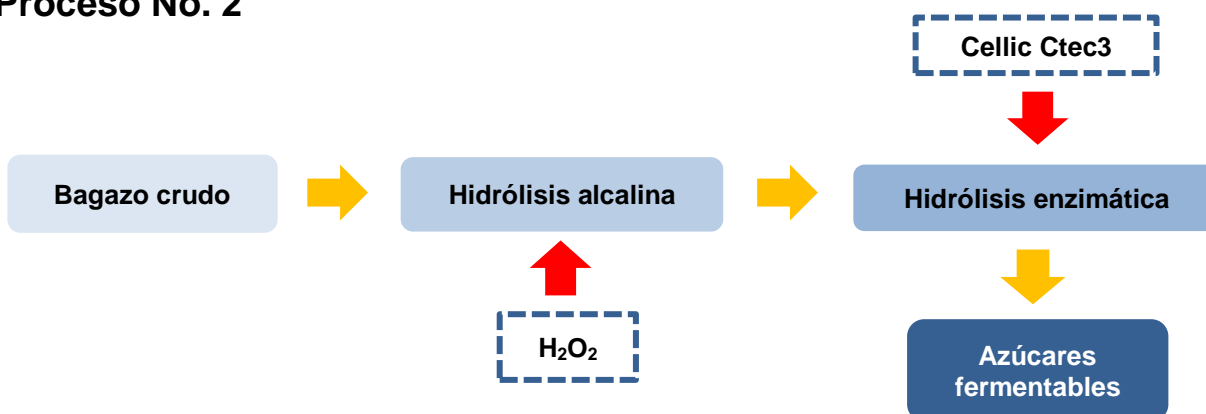


FIGURA 5.1. Metodología general para los dos procesos de producción de azúcares fermentables evaluados.

### **5.1. Obtención del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia*.**

El bagazo de caña de azúcar (BC) fue donado del pueblo Rodríguez Tejeda, localizado en el municipio de Tierra Blanca. El residuo lignocelulósico fue secado a temperatura ambiente (35°C) durante 2 días para evitar la proliferación de microorganismos que consuman los azúcares presentes en el bagazo, hasta disminuir su humedad <15%. Seguido de esto fue molido en una picadora, guardado en bolsas de plástico y almacenado a una temperatura de 25°C hasta su uso.

El bagazo de *Agave angustifolia* (BAA) fue donado de una mezcalería localizada en Sola de Vega, la cual se localiza en la parte sur occidental del Estado de Oaxaca a 98 kilómetros de la capital.

El BAA fue secado durante dos días a una temperatura de 50°C, hasta disminuir su humedad <15%. Posteriormente se molió en una picadora, se guardó en bolsas de plástico y se almacenó a una temperatura de 25°C hasta su utilización.

### **5.2. Caracterización del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia*.**

La caracterización del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* consistió en determinar: humedad, cenizas y contenido de glucanos, xilanos y lignina. Mediante las normas AOCS (Sociedad Americana de Químicos del Petróleo) y el método tecnológico NREL (Laboratorio Nacional de Energía Renovable) (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1. Parámetros para la caracterización del BC y BAA.**

<b>Prueba</b>	<b>Método</b>
Humedad	AOCD Ab 2-49
Cenizas	AOCS Ba 5 <sup>a</sup> -49
Glucanos, xilanos y lignina	NREL

### **5.3. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento ácido del proceso No.1.**

Durante el pretratamiento de hidrólisis ácida se pretende la mayor degradación de la hemicelulosa presente en la materia prima en xilosa y pequeñas cantidades de glucosa. Ya que estos monosacáridos son utilizados para la generación de productos de alto valor agregado, como el etanol, xilitol, entre otros.

De acuerdo a estudios previos (Aguilar *et al.*, 2002; Hernández-Salas *et al.*, 2009; Sausedo-Luna *et al.*, 2011; Nochebuena, 2012; Castañón-Rodríguez, 2014; Guilherme *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015) se optó por analizar la influencia de tres factores con el fin de encontrar las mejores condiciones para cuantificar la conversión de hemicelulosa a xilosa. Por lo anterior se planteó un diseño de experimentos Box-Behnken de tres variables y dos niveles respectivamente, resultando en un número total de corridas experimentales de 15 (Tabla 5.2). Teniendo como variable de respuesta la concentración de xilosa (g/L) presente en la fase líquida.



**TABLA 5.2. Diseño de experimentos para el pretratamiento ácido en BC.**

	<b>Concentración H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (% v/v)</b>	<b>RLS (mL:g)</b>	<b>Tiempo de reacción (min)</b>
Mínimo	2	5:1	25
Central	3	10:1	35
Máximo	4	15:1	45

RLS: relación líquido-sólido

### **5.3.1. Optimización de la hidrólisis ácida en el BC.**

Para llevar a cabo la optimización ácida (Figura 5.2) se utilizaron muestras de 20 g de BC crudo. Posteriormente de acuerdo al diseño experimental se le adicionó una relación líquido sólido (RLS) de 5:1, 10:1 y 15:1 (mL:g) de una solución con una concentración de 2, 3 y 4% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se aplicó una temperatura de 121°C utilizando una autoclave marca AESA, modelo CV-250, a diferentes tiempos de reacción, 25, 35 y 45 min (Tabla 5.2).



**Figura 5.2. BC después de ser sometido a una hidrólisis ácida.**

Una vez que finalizó el proceso térmico, las muestras son sacadas de la autoclave y puestas a enfriar a temperatura ambiente (25°C), a continuación, se preno cada muestra por separado, el líquido residual el cual contiene la xilosa y otros monosacáridos producto del pretratamiento ácido fueron guardados y rotulados en microtubos y posteriormente almacenados a una temperatura de -4°C.

Para el análisis de xilosa y glucosa (g/L), cada muestra fue centrifugada en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5424 a 10 000 rpm durante 10 min, se tomó 1 mL de sobrenadante al cual se le adicionaron 125 µL de óxido de bario 0.3 M y 125 µL de sulfato de zinc al 5% (p/v), se dejó reposar unos minutos para después ser centrifugado durante 10 min más a 10 000 rpm.

Por último, las muestras líquidas fueron filtradas en filtros de 0.2 µm y analizadas en HPLC marca Waters modelo 2414, el cual posee una columna Shodex SH1011 que utiliza como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una concentración de 5 mM a un flujo de 0.6 mL/min a 55°C y detector índice de refracción a 50°C.

### 5.3.2. Optimización de la hidrólisis ácida en el BAA.

Para obtener las muestras correspondientes a esta etapa de pretratamiento se utilizaron 5 g de BAA crudo. Posteriormente de acuerdo al diseño de experimentos se le adicionó una relación líquido sólido (RLS) de 4:1, 6:1 y 8:1 (mL:g) de una solución con una concentración de 2, 3 y 4% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se aplicó una temperatura de 121°C utilizando una autoclave marca AESA, modelo CV-250, a diferentes tiempos de reacción: 25, 35 y 45 min (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3. Diseño de experimentos para el pretratamiento ácido en BAA.**

	Concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	RLS (mL:g)	Tiempo de reacción (min)
Mínimo	2	4:1	25
Central	3	6:1	35
Máximo	4	8:1	45

RLS: relación líquido-sólido

Posteriormente cada muestra fue prensada para el análisis del licor rico en xilosa por HPLC y pretratadas como se describe en la sección 5.3.1.

### 5.4. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino en el proceso No.1.

Durante el pretratamiento de hidrólisis alcalina se pretende el mayor desprendimiento de lignina presente en la estructura del bagazo, ya que esto incrementa la accesibilidad de las enzimas a la superficie de la celulosa lo que genera una mayor eficiencia durante la hidrólisis enzimática.

De acuerdo a la literatura revisada (Guilherme *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015; Hernández-Salas *et al.*, 2009; Pietrobon *et al.*, 2011) se planteó un diseño de experimentos Box-Behnken considerando tres variables y dos niveles para cada una: concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 y 6%), RLS (5:1 y 15:1), tiempo de reacción (25 y 45 h) con un número total de corridas experimentales de 15.

#### 5.4.1. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BC pretratado con ácido.

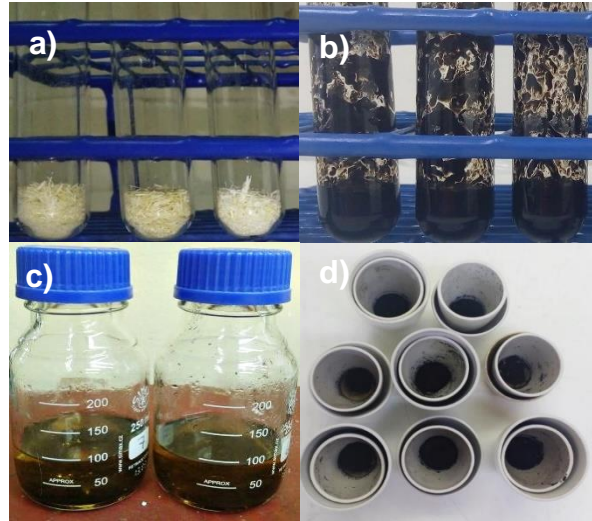
Se pesaron 10 g de BC pretratado con las mejores condiciones de hidrólisis ácida de la sección 5.3.1. A continuación, a cada muestra se le se le adicionó una RLS de 5:1, 10:1 y 15:1 mL de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 g de bagazo, con una concentración de 2, 4 y 6% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos de reacción: 25, 35 y 45 h a temperatura ambiente de acuerdo al diseño de experimentos (Figura 5.3).

Al final de cada periodo de tiempo de reacción el bagazo residual fue filtrado y lavado con agua destilada para después ser secado a 50°C durante 48 h para reducir la humedad (< 15%) del material.



**FIGURA 5.3. Pretratamiento alcalino utilizando BC pretratado para la remoción de lignina.**

Para la cuantificación de lignina residual en cada experimento se utilizó la metodología NREL para residuos lignocelulósicos (Figura 5.4), utilizando el bagazo residual después de cada pretratamiento según el diseño de experimentos, el cual fue molido a un tamaño de partícula de 0.6 mm, después fue sometido a una hidrólisis ácida para fraccionar la hemicelulosa, celulosa y lignina del material.



**FIGURA 5.4. Etapas de la metodología NREL: a) BC molido; b) Hidrólisis con ácido concentrado; c) Hidrólisis con ácido diluido; c) Residuo de lignina de Klason para cuantificar.**

Esto se llevó a cabo utilizando 0.3 g de muestra y adicionando 3 mL de ácido sulfúrico al 72% (p/p), posteriormente se dejó 1 h a 30°C en un baño de agua. Al finalizar este periodo se diluyó el ácido hasta un 4% (p/p) para romper las cadenas de oligómeros a monómeros y disacáridos, llevando cada muestra a un volumen final con agua desionizada de 86.73 mL, posteriormente esta muestra se llevó a la autoclave a 121°C (1.02 atm) durante 1 h. Una vez terminado este periodo la muestra fue enfriada y filtrada en crisoles Gooch de peso conocido.

Para la cuantificación de la lignina insoluble en ácido o lignina de Klason (CLK) se ocupó el residuo remanente del filtrado el cual fue secado en un horno (Modelo 3606, marca Thermo SCIENTIFIC) a 105°C durante 24 h hasta alcanzar un peso constante, para posteriormente ser pesada y aplicar la Ecuación 5.1.

$$\text{CLK} = \frac{\text{PRMS} - \text{PRS}}{\text{PMH} * (1 - \text{H})} * (100 - \text{CE}) \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Donde:

- PRMS: Peso en gramos del crisol con la muestra seca
- PRS: Peso en gramos del crisol seco
- PMH: Peso en gramos del material lignocelulósico húmedo inicial que se sometió a la hidrólisis ácida cuantitativa
- H: Es la humedad del material lignocelulósico en g de agua/g de material lignocelulósico húmedo
- CE: Es el contenido de extractivos

La Ecuación 5.1 está calculada en g de lignina de Klason/100 g de material lignocelulósico en base seca. Para la cuantificación de la lignina soluble en ácido (LSA) se utilizó la Ecuación 5.2.

$$LSA = \frac{Abs * V \text{ filtrado} * D}{\epsilon * PMS * LO} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

Donde:

Abs: Absorbancia obtenida a 240 nm

V filtrado: Volumen del hidrolizado= 0.08673 L

$\epsilon$ : Es la absorbancia a 240 nm (L/g cm) = 25

D: la relación de la dilución

LO: Longitud de onda de la celda UV-Vis en cm = 1

Para la cuantificación de humedad se pesó 0.5 g de muestra de cada experimento en crisoles de peso conocido, posteriormente se introdujeron en un horno (Modelo 3606, marca Thermo SCIENTIFIC) a 105°C durante 24 h. Después se aplicó la Ecuación 5.3,

la cual está calculada en gramos de agua por cada gramo de material lignocelulósico húmedo.

$$H = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} \quad (\text{Ec. 5.3})$$

Donde:

- PRMH: Es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial
- PRS: es el peso en gramos del recipiente seco
- PRMS: es el peso en gramos del recipiente con la muestra seca

#### **5.4.2. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BAA pretratado con ácido.**

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando muestras de 5 g de BAA pretratado con las mejores condiciones de hidrólisis ácida de la sección 5.3.2. A continuación, a cada muestra se le adicionó una RLS de 5:1, 10:1 y 15:1 mL de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 g de bagazo, de una solución con una concentración de 2, 4 y 6% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos de reacción: 25, 35 y 45 h a temperatura ambiente de acuerdo al diseño de experimentos.

Cada muestra de bagazo residual fue filtrado y lavado con agua destilada hasta neutralizar su pH, después cada una fue secada a 50°C durante 48 h para reducir la humedad (< 15%) del material (Figura 5.5).



**FIGURA 5.5. Experimentos del pretratamiento alcalino en BAA.**

Una vez que cada muestra fue secada, prosiguió a ser molida para la cuantificación de lignina residual siguiendo la metodología NREL para residuos lignocelulósicos descrita en la sección 5.4.1.

### **5.5. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación en el proceso No 1.**

Debido a que después de los pretratamientos ácido y alcalino el bagazo residual está compuesto principalmente de celulosa se utilizan enzimas celulolíticas con alta especificidad por el sustrato, las cuales rompen el enlace glucosídico de la celulosa para generar como producto glucosa, este proceso se lleva a cabo con un pH 4.5-5 y una temperatura entre 45-50°C. Entre las enzimas de última generación se encuentra la Cellic CTec3 la cual ha mostrado 2.5 veces mayor eficiencia que las enzimas comerciales, para la hidrólisis en residuos lignocelulósicos (Partida *et al.*, 2017).

Por lo anterior tomando las condiciones (Tabla 5.4) establecidas por Guarneros-Flores (2017), quien utilizando como materia prima bagazo de sorgo dulce pretratado y bajo un diseño Box Behnken y la enzima Cellic CTec3 obtuvo las condiciones óptimas para



la mayor conversión de celulosa a glucosa. Obteniendo una concentración de glucosa a las 51 h de 125.20 g/L.

**TABLA 5.4. Condiciones óptimas establecidas para la producción de glucosa en bagazo de sorgo dulce pretratado.**

Variable	Valor
Concentración de enzima	5 (% p/p)
Tiempo	51 h
RLS	5:1 (mL:g)
250 rpm	
50°C	

Fuente: Guarneros-Flores (2017)

### **5.5.1. Hidrólisis enzimática en el BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación.**

Una vez que se generó la celulosa (bagazo pretratado) procedente de los pretratamientos ácido y alcalino en el BC (Figura 5.6), se llevó a cabo una cinética enzimática utilizando la enzima de última generación Cellic CTec3 ocupando las condiciones óptimas reportadas por Guarneros-Flores (2017).

Se prepararon muestras utilizando 2.5 g de bagazo pretratado a las cuales se les adicionó 12.5 mL de buffer de CH<sub>3</sub>COONa 0.05 M, ajustando el pH a 5 mediante CH<sub>3</sub>COOH glacial, todo esto se realizó en matraces de 50 mL, tomando muestra cada 6 h por duplicado utilizando pruebas destructivas durante 42 h.



**FIGURA 5.6. BC residual después del pretratamiento ácido y alcalino.**

Al terminar la hidrólisis enzimática de cada muestra se desnaturizó la enzima introduciendo el matraz en un baño de agua a 100°C durante 10 min, posteriormente cada muestra fue filtrada para separar la fracción líquida de la celulosa no degradada que es una mezcla de celulosa amorfa y cristalina para de esta manera cuantificar los azúcares hidrolizados.

La fracción líquida de cada muestra se le analizó el contenido de glucosa (g/L) en HPLC marca Waters modelo 2414.

#### **5.5.2. Hidrólisis enzimática del BAA pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación.**

Se llevó a cabo una cinética enzimática utilizando bagazo pretratado procedente de los pretratamientos ácido y alcalino (Figura 5.7), utilizando la enzima de última generación Cellic CTec3 ocupando las condiciones óptimas reportadas por Guarneros-Flores (2017).

Se utilizaron muestras de 2.5 g de bagazo pretratado a las cuales se les adicionó 12.5 mL de buffer de CH<sub>3</sub>COONa 0.05 M, ajustando el pH a 5 mediante CH<sub>3</sub>COOH glacial, todo esto se llevó a cabo en pruebas de destrucción utilizando matraces con un volumen de 50 mL, tomando muestra cada 12 h por duplicado durante 48 h.

Cada punto muestreado fue pretratado como se describe en la sección 5.5.1 para cuantificar los azúcares hidrolizados durante el pretratamiento enzimático.



**FIGURA 5.7. BAA residual después del pretratamiento ácido y alcalino.**

### **5.6. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino del proceso No. 2**

Esta etapa se llevó a cabo con BC y BAA crudo utilizando las mismas condiciones que en la sección 5.4 para el diseño experimental alcalino utilizando un diseño de experimentos Box-Behnken. Con la finalidad de deslignificar (Figura 5.8) y exponer los polisacáridos al ataque enzimático, ya que este es un paso importante para un mayor rendimiento durante la hidrólisis enzimática.

Durante esta etapa se obtuvo un modelo de regresión a través del análisis del diseño de superficie de respuesta empleando el software NCSS para predecir la respuesta que se aproxime a la óptima del proceso minimizando el porcentaje de lignina en el bagazo residual del pretratamiento.



**FIGURA 5.8. Bagazo residual después del pretratamiento alcalino: a) BC; b) BAA.**

### **5.7. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 de última generación en el proceso No. 2.**

Debido a que la composición predominante del bagazo pretratado es de celulosa y hemicelulosa, el uso de enzimas altamente específicas es necesario para la mayor conversión de los polímeros a azúcares fermentables. Por lo anterior se realizó una hidrólisis enzimática utilizando Cellic CTec3 para la degradación de los polisacáridos, debido a que en su composición enzimática posee celulasa y en menor cantidad xilanasas.

#### **5.7.1. Hidrólisis enzimática del BC pretratado utilizando Cellic CTec3.**

La cinética enzimática se realizó utilizando las mejores condiciones propuestas por Guarneros-Flores (2017) en el bagazo pretratado con peróxido utilizando únicamente la enzima Cellic CTec3, durante esta etapa se evaluó la sacarificación del residuo lignocelulósico a xilosa y glucosa (g/L) principalmente. Esto se llevó a cabo utilizando pruebas destructivas tomando muestra cada 6 horas durante 42 horas, ocupando 2.5 g de bagazo de caña hidrolizado únicamente con un pretratamiento alcalino, utilizando

una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M a una temperatura de 50°C, una RLS de 5:1 (mL:g) y una concentración de enzima del 5% (p/p).

Por último, cada muestra fue filtrada y el líquido residual fue analizado para cuantificar la concentración de azúcares fermentables por HPLC.

### **5.7.2. Hidrólisis enzimática del BC pretratado utilizando las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3.**

Se evaluó el uso de dos enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 para la mayor producción de azúcares fermentables y reducción de tiempo durante el pretratamiento enzimático.

Utilizando una carga enzimática de 5% y 3% (p/p) de Cellic CTec3 y Cellic HTec3 respectivamente y 2.5 g de bagazo deslignificado, con una solución de buffer de acetato de sodio 0.05 M a una temperatura de 50°C, una RLS de 5:1 (mL: g) durante 54 h de reacción, tomando muestra cada 6 h.

Posteriormente cada muestra fue filtrada y se analizó el líquido residual para la cuantificación de azúcares totales por HPLC.

### **5.7.3. Hidrólisis enzimática del BAA pretratado utilizando Cellic CTec3.**

Se utilizaron 3 g de bagazo pretratado al cual se le aplicaron las mejores condiciones de hidrólisis enzimática obtenidas por Guarneros-Flores (2017), utilizando una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M. Tomando muestra por duplicado cada 7 h durante 49 h utilizando pruebas destructivas.

Al término de cada tiempo de reacción cada muestra fue filtrada y posteriormente se analizó el líquido residual para la cuantificación de azúcares fermentables por HPLC.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. Caracterización del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia*.

La caracterización del BC y BAA se realizó de acuerdo a las normas AOCS (Sociedad Americana de Químicos del Petróleo) para humedad y cenizas y el método NREL (Laboratorio Nacional de Energía Renovable) para la determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa.

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados obtenidos y el método utilizado para la caracterización del bagazo de caña de azúcar.

**TABLA 6.1. Valores de la caracterización lignocelulósica obtenidos para BC.**

Componente	Método	Resultado
Humedad	AOCS Ab 2-49	6.74%
Cenizas	AOCS Ba 5 <sup>a</sup> -49	2.08%
Xilanos	NREL	24.25%
Glucanos	NREL	33.40%
Lignina	NREL	27.95%

El BC obtenido presenta una composición respecto al contenido de glucanos y xilanos parecida a lo reportado por Nochebuena (2012), Castañón-Rodríguez (2014) y Guilherme *et al.* (2015). Sin embargo, la concentración de lignina para esta muestra ha reportado aproximadamente 10% más de contenido de lignina que lo obtenido por Nochebuena (2012), Castañón-Rodríguez (2014) y Guilherme *et al.* (2015), (12, 18.40 y 17.79% de lignina respectivamente), no obstante, se sabe que esta puede variar de acuerdo al método utilizado para cuantificarla y la procedencia de la materia, así mismo

que esta puede oscilar en un rango de 9-30% (Escamilla-Treviño, 2012; García-Moya y Romero-Manzanares, 2011).

A continuación, en la Tabla 6.2 se muestran los valores de la caracterización lignocelulósica encontrados utilizando el método NREL para el BAA.

**Tabla 6.2. Valores de la caracterización lignocelulósica obtenidos para BAA.**

Componente	Método	Resultado
Humedad	AOCS Ab 2-49	7.57%
Cenizas	AOCS Ba 5 <sup>a</sup> -49	11.85%
Xilanos	NREL	18.85%
Glucanos	NREL	22.57%
Lignina	NREL	25.85%

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura por Yang *et al.* (2015), Vieira *et al.* (2002), Cedeno-Cruz y Alvares-Jacobs (1999) en cuanto a la fracción holocelulósica del bagazo, no obstante, en cuanto al contenido de lignina estos reportaron un 15, 15.3 y 13.8% respectivamente utilizando bagazo de *Agave tequilana* y *lechugilla* sin embargo Hidalgo-Reyes *et al.* (2015) utilizando bagazo de *Agave angustifolia* reporta un contenido de lignina de 20.7% similar al reportado en el presente trabajo.

La variabilidad lignocelulósica presentada anteriormente se debe al tipo de especie de agave, así como el tipo de proceso utilizado durante la cocción y molienda de la piña, ya que el desecho lignocelulósico puede arrastrar residuos de madera y hojas de la piña, por lo que durante la cuantificación debido a la sensibilidad del método se determina un mayor contenido de lignina (Escamilla-Treviño, 2012).



## **6.2. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento ácido del proceso No.1.**

### **6.2.1. Optimización de la hidrólisis ácida en el BC.**

El pretratamiento ácido (Figura 6.1) en el material lignocelulósico tiene como fin hidrolizar la fracción de hemicelulosa en monosacáridos como xilosa y glucosa principalmente.



**FIGURA 6.1. Bagazo residual después de la hidrólisis ácida utilizando BC.**

Por lo anterior, después de haber aplicado las condiciones del diseño Box Behnken para cada experimento utilizando como materia prima BC como lo indica la sección 5.3.1 y utilizando el software estadístico NCSS se llevó a cabo un análisis de regresión, utilizando el método de superficie de respuesta con el fin de determinar el polinomio que representa el comportamiento del proceso de hidrólisis ácida y así obtener las condiciones óptimas para la mayor conversión de hemicelulosa del BC a xilosa (g/L) principalmente.

Los resultados obtenidos que reportaron la mayor remoción de hemicelulosa (xilosa g/L) predichas por el programa NCSS y validadas experimentalmente en el BC se muestran en la Tabla 6.3.

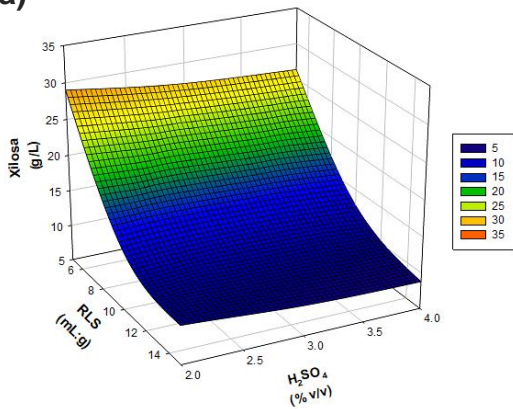


**TABLA 6.3. Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis ácida en BC.**

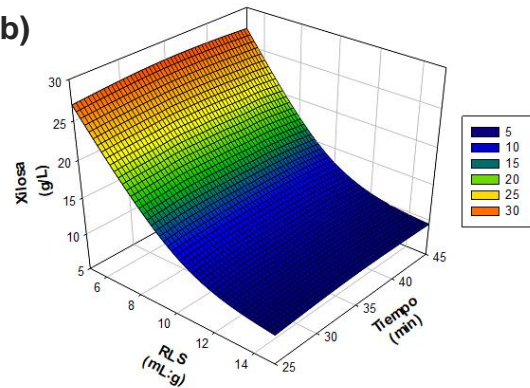
<b>Variable</b>	<b>Condición</b>
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	3% (v/v)
RLS	6:1 (mL/g)
Tiempo	15 min
Temperatura	121°C.
Valor predicho	28.21 g/L de xilosa
Valor experimental	29.17 g/L de xilosa

En la Figura 6.2 se muestra el gráfico de superficie de respuesta con las distintas combinaciones de los efectos de las variables.

a)



b)



**FIGURA 6.2. Gráficas de producción de xilosa (g/L) en la hidrólisis ácida del BC por el efecto de: a) RLS vs concentración de  $H_2SO_4$  y b) RLS vs Tiempo.**

Se puede observar que los niveles en donde se produce mayor concentración de xilosa oscilan dentro de las condiciones óptimas reportadas (3% (v/v) de una solución de  $H_2SO_4$ , RLS 6:1 (mL/g) y 15 min de reacción), así mismo estas fueron comprobadas de manera experimental realizando una prueba por triplicado, obteniendo concentraciones de: 31.47, 29.17 y 26.90 g/L teniendo como promedio una concentración de 29.18 g/L de xilosa, con lo que se valida el modelo matemático obtenido reportado en la Ecuación 6.1, el cual presenta un ajuste (coeficiente de determinación,  $R^2$ ) de 0.999, muy cercano a 1 lo que indica una buena correlación en los datos y una reproductibilidad del proceso.

$$\text{Xilosa (g/L)} = 64.75 + 607.92 \text{ H}_2\text{SO}_4 - 6 \text{ RLS} - 1.30 \text{ Tiempo} - 11755 \text{ H}_2\text{SO}_4^2 + 0.11 \text{ RLS}^2 + 0.01 \text{ Tiempo}^2 - 50.06 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ RLS} + 7.29 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ Tiempo} + 0.10 \text{ RLS Tiempo} + 2.45 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ RLS}^2 + 0 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ Tiempo}^2 - 0 \text{ RLS Tiempo} \quad (\text{Ec. 6.1})$$

En la Tabla 6.4 se muestran las concentraciones de xilosa obtenidos en este trabajo en comparación con otros reportados, utilizando BC. En donde se muestra que se alcanzan valores similares a los obtenidos por Castañón-Rodríguez (2014) y Guiherme *et al.* (2015) en un periodo de tiempo más corto de 15 min aumentando la concentración de ácido sulfúrico de 2% a 3% v/v, así como también se obtuvieron mejores rendimientos que los reportados por Aguilar *et al.* (2002) disminuyendo la RLS de 10:1 a 6:1 (mL: g). Por lo anterior se obtuvo como resultado una remoción del 72% de xilanos en el bagazo crudo, así mismo un pretratamiento ácido con menor requerimiento energético debido a que se requiere menor tiempo (15 min) de aplicación de energía durante el proceso térmico que los procesos reportados.

**TABLA 6.4. Antecedentes de la etapa de hidrólisis ácida en BC.**

Condiciones				
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	RLS	Tiempo	Concentración de xilosa (g/L)	Referencia
2% (v/v)	5:1 (mL:g)	30 min	20.89	(Guiherme <i>et al.</i> , 2015)
2% (p/p)	10:1 (mL:g)	24 min	21.60	(Aguilar <i>et al.</i> , 2002)
2% (v/v)	6:1 (mL:g)	40 min	30.00	(Castañón-Rodríguez, 2014)
<b>3% (v/v)</b>	<b>6:1 (mL:g)</b>	<b>15 min</b>	<b>29.17</b>	<b>Presente trabajo</b>

### 6.2.2. Optimización de la hidrólisis ácida en BAA.

Para la obtención de las mejores condiciones que generen la mayor remoción de xilosa (g/L) de la hidrólisis ácida utilizando BAA (Figura 6.3) se aplicó el diseño Box Behnken de la sección 5.3.2, posteriormente se empleó el software estadístico NCSS para el análisis de los datos obtenidos utilizando el método de superficie de respuesta.



**FIGURA 6.3. Bagazo residual después de la hidrólisis ácida utilizando BAA.**

Por medio de una regresión lineal se obtuvo el polinomio (Ecuación. 6.2) que representa el comportamiento del proceso, para ello se consideraron como variables independientes la concentración de ácido sulfúrico (% v/v), la relación líquido-sólido (mL:g) y el tiempo en minutos y como variable de respuesta la máxima concentración de xilosa (g/L) generada durante el pretratamiento ácido. El modelo presentado en la Ecuación 6.2, presenta un ajuste del 97%, lo que garantiza la reproducibilidad del proceso.

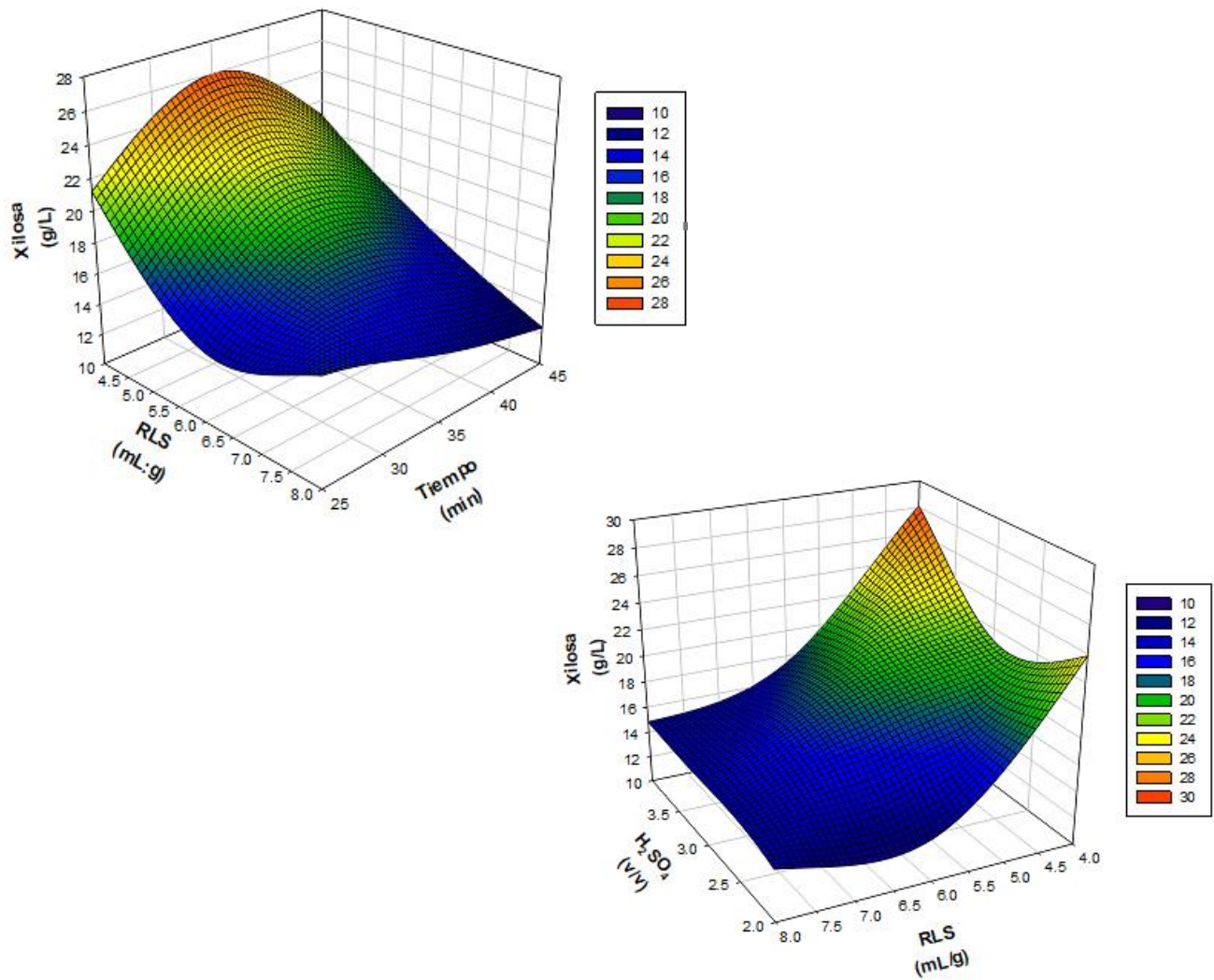
$$\text{Xilosa (g/L)} = - 7.1 + 5.78 \text{ H}_2\text{SO}_4 - 5.28 \text{ RLS} + 2.14 \text{ Tiempo} - 0.54 \text{ H}_2\text{SO}_4^2 + 0.503 \text{ RLS}^2 - 0.02 \text{ Tiempo}^2 - 0.40 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ RLS} + 0.04 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ Tiempo} - 0.05 \text{ RLS Tiempo} \quad \text{(Ec. 6.2)}$$

En la Tabla 6.5 se muestran las condiciones óptimas obtenidas del diseño de experimentos con un valor predicho por el polinomio de 27.36 g/L de xilosa. Estas condiciones fueron validadas de manera experimental por triplicado.

**TABLA 6.5. Condiciones óptimas obtenidas del pretratamiento ácido en BAA.**

<b>Variable</b>	<b>Condición</b>
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	4% (v/v)
RLS	4:1 (mL/g)
Tiempo	35 min
Temperatura	121°C.
Valor predicho	28.09 g/L de xilosa
Valor experimental	27.73 g/L de xilosa

Finalmente, en la Figura 6.4 se muestran las gráficas de superficie de respuesta que se generaron con el fin de determinar las regiones de trabajo que muestren el efecto de la variación de la respuesta (xilosa g/L) en función de los rangos graficados de las variables independientes para la mayor remoción de xilanos en el bagazo de BAA crudo.



**Figura 6.4. Gráficas de producción de xilosa (g/L) en la hidrólisis ácida del BAA del efecto de: a) RLS vs H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y b) Tiempo vs H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**

Utilizando las condiciones óptimas de este trabajo (Tabla 6.5) se obtuvo una remoción de 87% de xilanos en el bagazo crudo mezcalero. En la Tabla 6.6 se muestran las condiciones de operación utilizadas en este trabajo en comparación con otros trabajos reportados, utilizando diferentes variedades de bagazo de agave. En donde se muestra que aplicando una mayor concentración de ácido de 2 a 4% y una RLS menor de 10 a 4 mL:g se removió una mayor concentración de xilosa que lo reportado por

Saucedo-Luna *et al.* (2011), así como también que el uso de ácido sulfúrico respecto al ácido clorhídrico produjo mejores rendimiento de xilosa (27.73 g/L) en 35 min, menor a las 4 h reportadas por Hernández-Salas *et al.* (2009) con una concentración de 22.13 g/L de xilosa.

**TABLA 6.6. Antecedentes de hidrólisis ácida en BAA.**

Condiciones				
Ácido	RLS	Tiempo	Concentración de xilosa (g/L)	Referencia
HCl 1.2% (v/v)	15:1 (mL:g)	4 h	22.13	(Hernández-Salas <i>et al.</i> , 2009)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2% (p/p)	10:1 (mL:g)	15 min	25.80	(Saucedo-Luna <i>et al.</i> , 2011)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4% (v/v)</b>	<b>4:1 (mL:g)</b>	<b>35 min</b>	<b>27.73</b>	<b>Presente trabajo</b>

Por lo anterior las condiciones óptimas reportadas para esta etapa presentan ventajas económicas respecto al uso de periodos más cortos de energía térmica durante el pretratamiento ácido (35 min) y RLS menores de 15-4:1 mL:g para la producción de un licor con una concentración de 27.73 g/L de xilosa, mayor a lo reportado por otros trabajos.

### **6.3. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino del proceso No 1.**

#### **6.3.1. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BC pretratado con ácido.**

Uno de los obstáculos para una hidrólisis enzimática eficiente es la presencia de lignina en el material lignocelulósico ya que esta recubre la celulosa presente evitando la acción enzimática, por lo que en esta etapa se aplicaron las condiciones del diseño Box-Behnken descritas en la sección 5.4.1 utilizando bagazo pretratado con las mejores condiciones ácidas (Tabla 6.3), con el objetivo de remover la mayor cantidad de lignina posible. Esta etapa se evaluó cuantificando el porcentaje de lignina presente después de cada experimento, utilizando la metodología de NREL para residuos

lignocelulósicos, tomando el porcentaje de lignina remanente en el bagazo pretratado como variable de respuesta.

Los resultados obtenidos de aplicar el diseño de experimentos para la optimización alcalina son los que se muestran en la Tabla 6.7.

**TABLA 6.7. Resultados obtenidos de lignina remanente para el BC pretratado.**

Experimento	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	RLS (mL:g)	Tiempo (h)	Lignina remanente (%)	Lignina removida (%)
1	2	5	35	27.87	1.97
2	2	15	35	25.64	9.81
3	6	5	35	20.77	26.94
4	6	15	35	5.79	79.63
5	2	10	25	26.60	6.44
6	2	10	45	27.50	3.27
7	6	10	25	12.90	54.63
8	6	10	45	10.56	62.86
9	4	5	25	26.53	6.68
10	4	5	45	25.86	9.04
11	4	15	25	15.17	46.64
12	4	15	45	8.47	70.21
13	4	10	35	14.69	48.33
14	4	10	35	13.65	51.99
15	4	10	35	13.78	51.53



En la Tabla 6.7 se puede observar que los rangos de lignina remanente en el BC van de 5.79-27.87%, demostrando que concentraciones bajas de peróxido no remueven fracciones considerables de lignina (2-10%), sin embargo, el uso de soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con concentraciones mayores (6% v/v) deslignifican hasta un 79.63% de este polímero.

Posteriormente empleando el software estadístico NCSS, se realizó un análisis de regresión, utilizando el método de superficie de respuesta, para determinar el valor óptimo de los factores experimentales (Tabla 6.8) que generen el valor mínimo de la variable de respuesta (lignina remanente %).

**TABLA 6.8. Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en BC pretratado.**

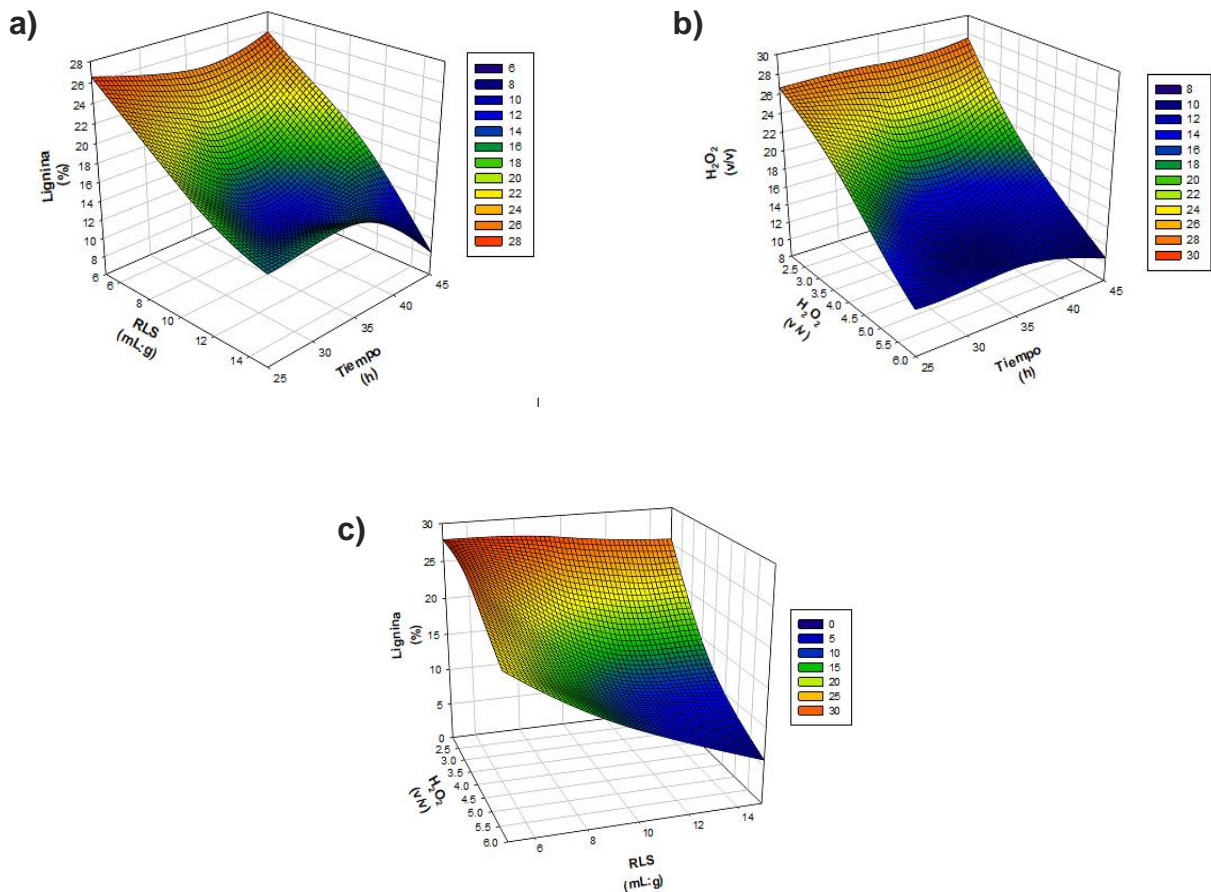
Variables	Condición
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	9% (v/v)
RLS	19:1 (mL:g)
Tiempo	44 h
Valor predicho	2.87% de lignina remanente
Valor experimental	2.76% de lignina remanente

Las condiciones predichas en la Tabla 6.8 fueron llevadas a cabo de manera experimental por triplicado obteniendo como resultado 2.8, 2.78 y 2.72% de lignina presente en el BC después del pretratamiento alcalino, dando como promedio 2.76% de lignina residual, lo que generó un 90% de remoción de este polímero. En la Ecuación 6.3 se muestra el polinomio que describe el comportamiento de esta etapa.

$$\text{Lignina (\%)} = 129.5618 - 4.0612 \text{ H}_2\text{O}_2 - 6.4855 \text{ RLS} - 5.3161 \text{ Tiempo} + 0.8362 \text{ H}_2\text{O}_2^2 + 0.0446 \text{ RLS}^2 + 0.0810 \text{ Tiempo}^2 - 0.6884 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS} - 0.04062 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo} + 0.3734 \text{ RLS Tiempo} + 0.0184 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS}^2 + 1.1493 \times 10^{-10} \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo}^2 - 0.0057 \text{ RLS Tiempo}^2$$

(Ec. 6.3)

Con los datos obtenidos se generaron las siguientes gráficas de superficie de respuesta ilustradas en la Figura 6.5. En donde se observa que, aumentado la concentración de peróxido, la RLS y el tiempo de reacción genera un mayor desprendimiento de la fracción de lignina en el bagazo pretratado.



**FIGURA 6.5.** Porcentaje de lignina residual después del pretratamiento alcalino en BC del efecto de: a) RLS vs Tiempo; b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Tiempo; c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs RLS.

### 6.3.2. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BAA pretratado con ácido.

En esta etapa se aplicaron las condiciones del diseño Box Behnken descritas en la sección 5.4.2 utilizando bagazo pretratado con las mejores condiciones ácidas (Tabla 6.5), con el objetivo de remover la mayor cantidad de fibra remanente.

En el diseño de experimentos se evaluó el porcentaje de lignina residual presente en cada experimento después del pretratamiento alcalino, utilizando la metodología de NREL para residuos lignocelulósicos, tomando el porcentaje de lignina remanente como variable de respuesta.

Después de haber deslignificado el BAA prehidrolizado, se procedió a cuantificar el contenido de fibra remanente, los resultados de la composición lignocelulósica se muestran en la Tabla 6.9.

**TABLA 6.9. Resultados obtenidos de lignina remanente para BAA pretratado.**

Experimento	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	RLS (mL:g)	Tiempo (h)	Lignina remanente (%)	Lignina removida (%)
1	2	5	35	21.50	36.54
2	2	15	35	14.20	58.08
3	6	5	35	12.98	61.68
4	6	15	35	11.95	64.72
5	2	10	25	15.96	17.92
6	2	10	45	13.48	60.21
7	6	10	25	11.71	65.43
8	6	10	45	10.82	68.06
9	4	5	25	14.83	56.22

Continua Tabla 6.9

10	4	5	45	17.68	47.81
11	4	15	25	10.47	69.09
12	4	15	45	10.73	68.32
13	4	10	35	15.12	55.37
14	4	10	35	15.28	54.89
15	4	10	35	14.45	57.34

Los resultados obtenidos después del pretratamiento alcalino muestran un rango que va desde 18-69% de lignina removida del bagazo pretratado, teniendo que al aumentar la concentración de peróxido 4-6% v/v produce una mayor remoción de este polímero, eliminando así, hasta un 69% de lignina en el bagazo pretratado.

Posteriormente empleando el software estadístico NCSS, se llevó a cabo un análisis de regresión, usando el método de superficie de respuesta, para determinar (Tabla 6.10) el valor mínimo de la variable de respuesta (% lignina residual).

**TABLA 6.10. Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en el BAA pretratado.**

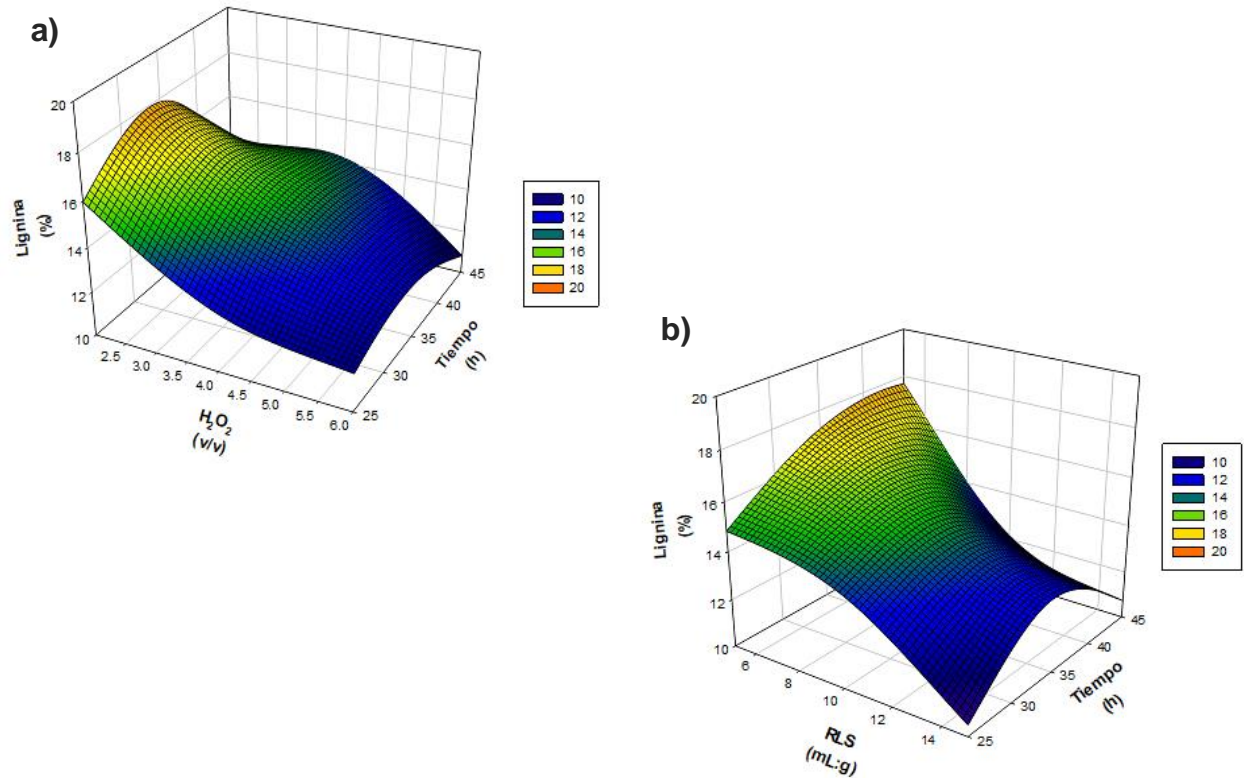
Variable	Condición
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	6% (v/v)
RLS	15:1 (mL: g)
Tiempo	45 h
Valor predicho	10% de lignina residual
Valor experimental	10.23% de lignina residual

Las condiciones predichas en la Tabla 6.10 fueron llevadas a cabo de manera experimental por triplicado obteniendo como resultado 10.5, 9.89 y 10.3% de lignina residual después del pretratamiento alcalino en el BAA dando un promedio de 10.23%, lo que generó un 70% de remoción de lignina en el bagazo pretratado. En la Ecuación 6.3 se muestra el polinomio que describe el comportamiento de esta etapa.

$$\text{Lignina (\%)} = 7.2 - 3.14 \text{ H}_2\text{O}_2 - 0.922 \text{ RLS} + 1.33 \text{ Tiempo} - 0.028 \text{ H}_2\text{O}_2^2 + 0.0129 \text{ RLS}^2 - 0.01844 \text{ Tiempo}^2 - 0.1567 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS} + 0.0199 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo} - 0.0129 \text{ RLS Tiempo}$$

**(Ec. 6.3)**

Con los datos obtenidos se generaron las siguientes graficas de superficie de respuesta ilustradas en la Figura 6.6. En donde se observa que, aumentado la concentración de peróxido, la RLS y el tiempo de reacción se produce un mayor desprendimiento de la fracción de lignina en el bagazo de agave pretratado. Esto debido a que a mayor concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hay mayor formación de radicales reactivos ( $\text{OH}^\cdot$ ) y aniones superóxidos ( $\text{O}_2^\cdot$ ) los cuales son los responsables del fraccionamiento de la lignina del material lignocelulósico.

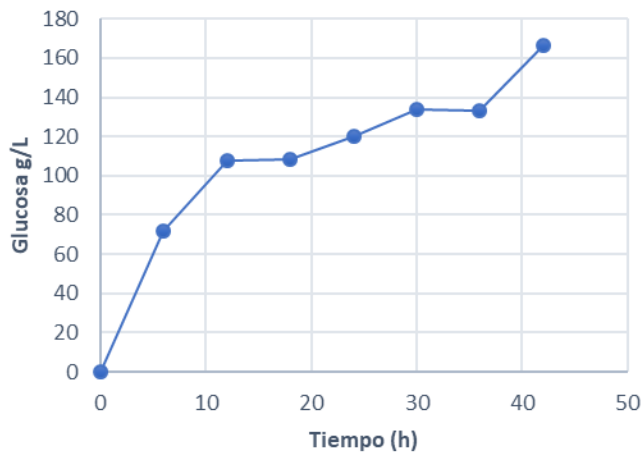


**Figura 6.6. Gráficas del porcentaje de lignina residual en el BAA después del pretratamiento alcalino del efecto de: a)  $H_2O_2$  vs Tiempo; b) RLS vs Tiempo.**

#### **6.4. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación en el proceso No 1.**

##### **6.4.1. Hidrólisis enzimática del BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación.**

Ya que el objetivo principal de esta etapa es la conversión de celulosa a glucosa por medio de enzimas con alta especificidad en el sustrato, se llevó a cabo un seguimiento de la conversión del polisacárido utilizando la enzima Cellic CTec3, tomando muestra cada 6 h durante 42 h. Los resultados obtenidos son los que se muestran en la Figura 6.7.



**FIGURA 6.7. Cinética enzimática en BC pretratado utilizando Cellic CTec3.**

En la Figura 6.7 se observa que a las 42 h se obtuvo una concentración máxima de 167.92 g/L de glucosa teniendo una conversión del 98% del polímero, esto indica que las optimizaciones de los pretratamientos fisicoquímicos empleados durante este proceso generaron una modificación macro y microscópica de la estructura de la biomasa, incrementando la porosidad del material, así como también la disminución de lignina, lo que favoreció la exposición de las fibras de celulosa promoviendo las regiones amorfas de este polímero, lo que facilitó el acceso a las enzimas para una mayor conversión de azúcares fermentables.

En la Tabla 6.11 se compara la producción máxima de glucosa obtenida en este trabajo con lo reportado por otros autores utilizando diversos cocteles enzimáticos, obteniendo hasta 8 veces más lo reportado por Guiherme *et al.* (2015) en un tiempo de 48 h y 2.8 veces lo obtenido por Nochebuena (2012) en un tiempo menor a 96 h.

**Tabla 6.11. Hidrólisis enzimática con enzimas comerciales.**

<b>Materia prima</b>	<b>Enzimas comerciales</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Xilosa (g/L)</b>	<b>Tiempo de conversión (h)</b>	<b>Referencia</b>
Bagazo de caña de azúcar	NS22074 Celulasas NS50010 B-Glucosidase	20.89	2.39	48	Guiherme <i>et al.</i> , (2015)
Bagazo de caña de azúcar	Celluclast 1.5 L Celobiosa Novozymes 188	61.08	0	96	Nochebuena, (2012)
Bagazo de sorgo dulce	Cellic CTec 3	125.20	0	51	Guarneros-Flores, (2017)
<b>Bagazo de caña de azúcar</b>	<b>Cellic CTec 3</b>	<b>167.92</b>	<b>0</b>	<b>42</b>	<b>Presente trabajo</b>

En la Tabla 6.12 se muestra detalladamente el orden y condiciones de los pretratamientos utilizados durante el proceso No. 1 para la obtención de glucosa (g/L) en el BC. La etapa No. 1, la cual consiste en el fraccionamiento de la hemicelulosa utilizando un pretratamiento ácido, produjo una remoción del 72% de xilanos en el material crudo, esto generó una biomasa rica en celulosa y lignina. Debido a esto, este bagazo residual paso a una etapa alcalina en la cual se removió la mayor cantidad de lignina (90%) lo que genero un material más poroso con mayores regiones de celulosa amorfa la cual fue hidrolizada a moléculas de glucosa, mediante un pretratamiento enzimático utilizando enzimas de última generación. En esta etapa se produjo un licor con una concentración aproximada de 167.92 g/L de glucosa.

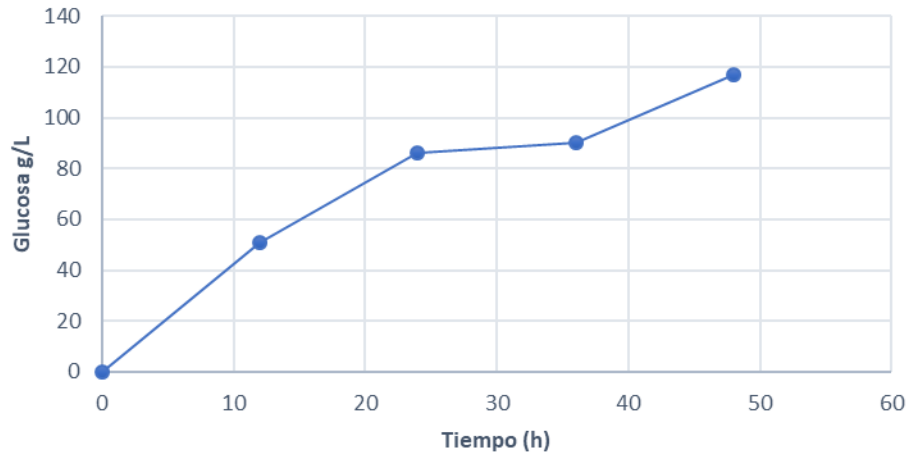


**TABLA 6.12. Etapas de producción para la obtención de glucosa a partir del BC.**

Pretratamiento	Reactivo	RLS (mL: g)	Temperatura (°C)	Tiempo
Ácido	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 3% (v/v)	6:1	121	15 min
Alcalino	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 9% (v/v)	19:1	25-30	44 h
Enzimático	Enzima 5% (p/p)	5:1	50	42 h

#### **6.4.2. Hidrólisis enzimática del BAA pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 de última generación**

Se llevó a cabo una cinética enzimática utilizando BAA pretratado, tomando muestra cada 12 h durante 48 h de reacción como se muestra en la Figura 6.8, con el fin de evaluar la degradación de los polímeros a través del tiempo, así como encontrar el punto en el cual alcanza la mayor conversión de glucosa.



**FIGURA 6.8. Cinética enzimática utilizando BAA pretratado para la producción de glucosa.**

En la Figura 6.8 se observa una concentración máxima producida de 117.12 g/L de glucosa a las 48 horas de reacción, esto es, más del doble de la concentración final reportada por Saucedo-Luna, *et al.* (2011), utilizando Celluclast 1.5L y Novozyme 188, a las 72 h de hidrólisis enzimática, obteniendo una concentración de 41 g/L de azúcares fermentables. Así mismo Hernández-Salas, *et al.* (2009) reportaron una concentración de 56.37 g/L de azúcares reductores utilizando tres enzimas, Celluclast, Novozyme y Viscozyme. Por otro lado, Ávila-Lara, *et al.* (2015), utilizando *Agave tequilana weber* y la enzima Cellic CTec2, antecesor de la enzima utilizada en este trabajo, generaron una concentración de 13.8 g/L de azúcares totales en dos horas de hidrólisis.

De acuerdo a los resultados reportados por otros trabajos, se muestra que el uso de las enzimas Cellic CTec3 respecto a otros cocteles enzimáticos muestran mayor eficiencia en la conversión de polisacáridos a monosacáridos en un rango que va desde 41-117 g/L de glucosa, esto es un incremento del 65% en la producción de azúcares fermentables.

## **6.5. Evaluación de factores para el diseño de experimentos del pretratamiento alcalino en el proceso No. 2.**

La lignina es un complejo polifenólico asociado a las hemicelulosas y que forma matrices que rodean a las microfibrillas de celulosa, lo que impide la degradación de la hemicelulosa y celulosa utilizando enzimas. Por lo tanto, en esta etapa se planteó la remoción del mayor porcentaje de lignina presente en el material crudo del BC y BAA para facilitar el ataque enzimático de Cellic CTec3.

En esta etapa inicial se aplicaron las condiciones del diseño Box Behnken para cada materia prima (BC y BAA) cruda, utilizando las condiciones ya descritas en la sección 5.4., tomando como variable de respuesta el porcentaje de lignina residual, cuantificado por el método NREL.

### **6.5.1. Optimización de la hidrólisis alcalina en el BC crudo.**

Los resultados que se generaron del diseño de experimentos descrito en la sección 5.4.1 son los que se muestran en la Tabla 6.13.

**TABLA 6.13. Resultados obtenidos de lignina remanente para el pretratamiento alcalino en el BC.**

Experimento	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (% v/v)	RLS (mL: g)	Tiempo (h)	Lignina remanente (%)	Lignina removida (%)
1	2	5	35	21.80	22.00
2	2	15	35	22.54	19.36
3	6	5	35	20.33	27.26
4	6	15	35	8.00	71.38
5	2	10	25	23.56	15.71
6	2	10	45	23.04	17.57
7	6	10	25	12.44	55.49
8	6	10	45	11.62	58.43
9	4	5	25	23.62	15.49
10	4	5	45	22.62	19.07
11	4	15	25	13.84	50.48
12	4	15	45	12.00	57.07
13	4	10	35	17.74	36.53
14	4	10	35	18.81	32.70
15	4	10	35	18.22	34.81

De acuerdo a la Tabla 6.13 los tratamientos que removieron mayor cantidad de lignina son el experimento 4 y 8 los cuales presentan un porcentaje de lignina residual en la biomasa de 8 y 11.62% respectivamente, esto es un 71 y 58% de lignina removida del bagazo crudo. Estos resultados fueron analizados utilizando el programa NCSS para minimizar el contenido de lignina residual después del pretratamiento alcalino, utilizando el método de superficie de respuesta y así obtener las mejores condiciones de hidrólisis alcalina.

En la Tabla 6.14 se muestran las variables y sus rangos óptimos para una mayor deslignificación del material lignicelulósico.

**TABLA 6.14. Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en el BC.**

Variable	Condición
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	6% (v/v)
RLS	12:1 (mL/g)
Tiempo	37 horas
Valor predicho	10.04% de lignina remanente
Valor experimental	7.54% de lignina remanente

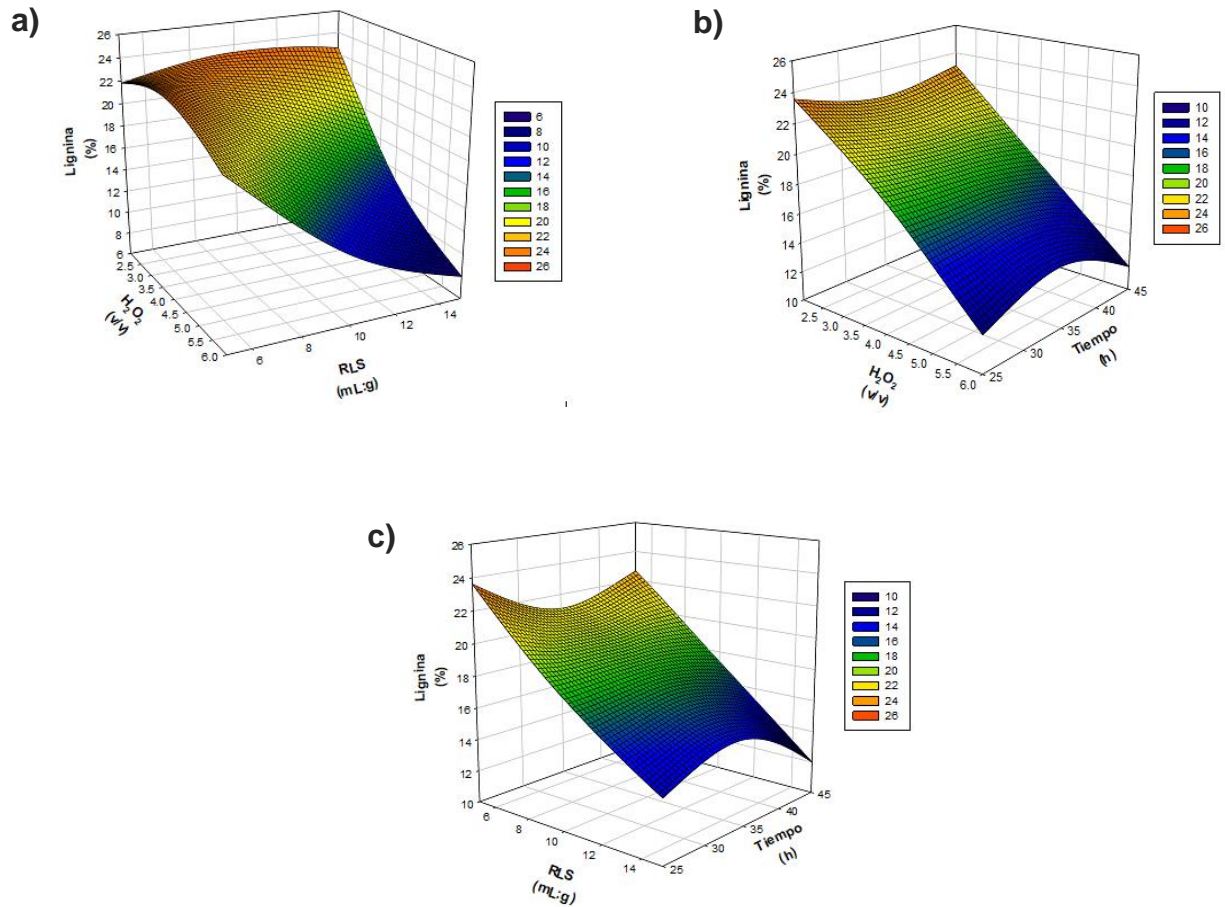
La Ecuación 6.4 representa el polinomio que describe el comportamiento del proceso de deslignificación, el cual presenta un ajuste (coeficiente de determinación, R<sup>2</sup>) del 99%, lo anterior significa que cuanto más cerca esté del límite superior (100%), posee mejor ajuste y reproducibilidad.

$$\text{Lignina (\%)} = 58.0672 + 4.2893 \text{ H}_2\text{O}_2 - 2.0187 \text{ RLS} - 2.8167 \text{ Tiempo} - 0.0545 \text{ H}_2\text{O}_2^2 - 0.1248 \text{ RLS}^2 + 0.0403 \text{ Tiempo}^2 - 0.9769 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS} - 0.0042 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo} + 0.3037 \text{ RLS Tiempo} + 0.0325 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS}^2 + 2.4591 \times 10^{-10} \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo}^2 - 0.0044 \text{ RLS Tiempo}^2$$

**(Ec. 6.4)**

Las condiciones óptimas establecidas en el modelo generaron una remoción de hasta un 73% de lignina en el bagazo crudo, mayor a lo obtenido por Nochebuena, (2012) el cual fue de 55.35% utilizando bagazo de caña pretratado con ácido, reportando como condiciones óptimas 4.7% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una RLS de 17:1 (mL:g) durante 26.7 h. Por lo anterior se observa que utilizando una concentración mayor de peróxido y un tiempo más prolongado de reacción generan mejores condiciones de fraccionamiento de la lignina, así mismo el volumen de operación disminuye de 17:1 a 12:1 mL:g lo que mejora su reproducibilidad a gran escala.

En la Figura 6.9 se muestran las gráficas de superficie de respuesta en donde se observa que la región donde se minimiza la concentración de lignina se encuentra en los rangos óptimos reportados por el análisis del diseño.



**FIGURA 6.9.** Gráficas del porcentaje de lignina residual en el BC después del pretratamiento alcalino del efecto de: a)  $H_2O_2$  vs RLS; b)  $H_2O_2$  vs Tiempo; c) RLS vs Tiempo.

### 6.5.2. Optimización de la hidrólisis alcalina en BAA crudo.

Los resultados obtenidos después de aplicar el diseño de experimentos para minimizar la cantidad de lignina residual en el bagazo crudo de BAA son los que se presentan en la Tabla 6.15.

**TABLA 6.15. Resultados obtenidos de lignina remanente para el pretratamiento alcalino en el BAA.**

Experimento	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (% v/v)	RLS (mL:g)	Tiempo (h)	Lignina remanente (%)	Lignina removida (%)
1	2	5	35	15.97	38.22
2	2	15	35	16.57	35.90
3	6	5	35	13.70	47.00
4	6	15	35	14.17	45.18
5	2	10	25	13.00	49.71
6	2	10	45	11.45	55.71
7	6	10	25	11.42	55.82
8	6	10	45	11.03	57.33
9	4	5	25	13.69	47.04
10	4	5	45	12.63	51.14
11	4	15	25	23.34	9.71
12	4	15	45	21.64	16.29
13	4	10	35	9.83	61.97
14	4	10	35	9.25	64.22
15	4	10	35	9.26	64.18

En la Tabla 6.15 se puede observar que los experimentos a los cuales se le minimizo la mayor cantidad de lignina son el experimento 13, 14 y 15 en donde se removió hasta un 64% de lignina en el material crudo. Posteriormente a los resultados obtenidos se les realizó un análisis de regresión a través del análisis de superficie de respuesta



empleando el programa NCSS, minimizando la variable de respuesta, que en esta etapa es el porcentaje de lignina residual en el BAA crudo.

En la Tabla 6.16 se muestran las condiciones de operación óptimas que se obtuvieron para una mayor deslignificación de la biomasa.

**TABLA 6.16. Condiciones óptimas del pretratamiento alcalino en el BAA.**

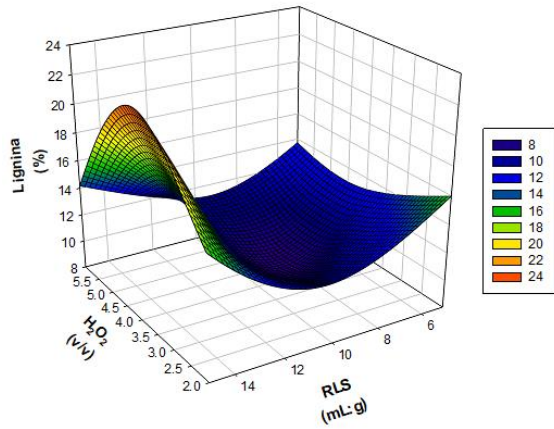
Variable	Condición
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	6% (v/v)
RLS	10:1 (mL/g)
Tiempo	37 horas
Valor predicho	8.76% lignina residual
Valor experimental	10% lignina residual

La Ecuación 6.5 representa el polinomio que describe el comportamiento del proceso de deslignificación, el cual presenta un ajuste (coeficiente de determinación, R<sup>2</sup>) del 99%, lo anterior significa que cuanto más cerca esté del límite superior (100%), posee mejor ajuste y reproducibilidad del proceso.

$$\text{Lignina (\%)} = - 36.3391 - 1.6091 \text{ H}_2\text{O}_2 + 5.1812 \text{ RLS} + 4.3166 \text{ Tiempo} - 0.0552 \text{ H}_2\text{O}_2^2 + 0.2881 \text{ RLS}^2 - 0.0628 \text{ Tiempo}^2 + 0.2623 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS} + 0.0144 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo} - 0.6184 \text{ RLS Tiempo} - 0.0132 \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ RLS}^2 - 2.3077 \times 10^{-10} \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ Tiempo}^2 + 0.0087 \text{ RLS Tiempo}^2$$

**(Ec. 6.5)**

a)



b)

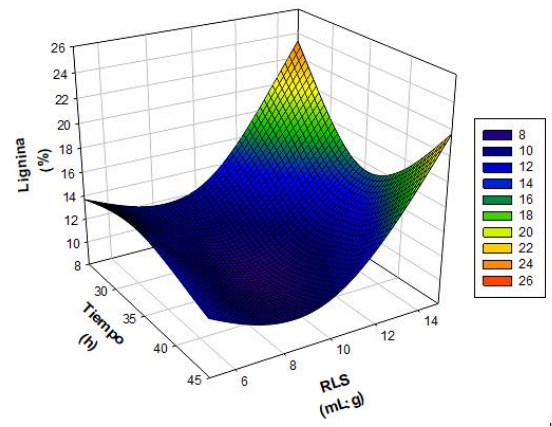
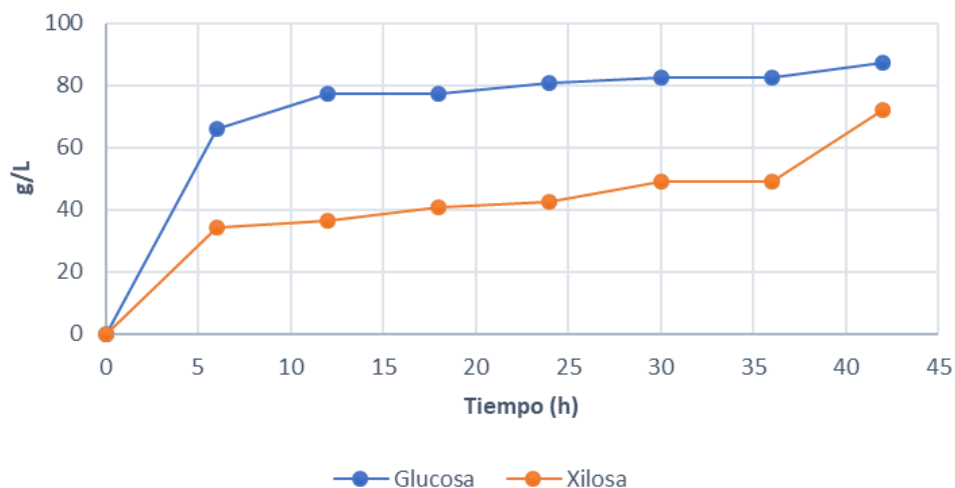


Figura 6.10. Gráficas de porcentaje de lignina residual en BAA después del pretratamiento alcalino del efecto de: a)  $H_2O_2$  vs RLS; b) Tiempo vs RLS.

## 6.6. Hidrólisis enzimática del bagazo pretratado utilizando las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3 de última generación en el proceso No. 2.

### 6.6.1. Hidrólisis enzimática en el BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3.

Los resultados que se obtuvieron del seguimiento de conversión del polisacárido a monómeros se muestran en la Figura 6.10, en donde se tomó muestra cada 6 h hasta 42 h de hidrólisis enzimática.



**FIGURA 6.11. Cinética enzimática en BC pretratado utilizando Cellic CTec3.**

En la Figura 6.10 se observa que a las 12 h de hidrólisis se obtiene una concentración de 77.39 y 36.26 g/L de glucosa y xilosa respectivamente, posteriormente después de 12 h aumenta a 80.76 y 42.38 g/L, por último, a las 42 h se obtiene una concentración final de 87.42 y 72.15 g/L, este último punto generó una conversión de biomasa de 80% de glucanos y 98% de xilanos.

Los resultados obtenidos muestran que a las 12 h se hidroliza aproximadamente el 80% del polímero a glucosa, sin embargo, es hasta las 42 h donde se obtiene la mayor conversión de los xilanos a xilosa (98%).

Los datos obtenidos en comparación a lo reportado por otros autores se muestran en la Tabla 6.17. En donde se muestra que la eliminación de lignina hasta un 73% de la biomasa expuso el polímero de celulosa y hemicelulosa, facilitando el acceso a las enzimas al material pretratado, generando conversiones por arriba del 80% con una concentración final de azúcares fermentables de 159.57 g/L utilizando únicamente la enzima Cellic CTec3 en 42 h, respecto al trabajo reportado por Guiherme *et al.* (2015) con 41.37 y 37.60 g/L de azúcares fermentables en 48 h, utilizando diferentes pretratamientos químicos.

**TABLA 6.17. Concentraciones de azúcares fermentables obtenidos por diferentes complejos enzimáticos.**

Pretratamiento	Enzimas	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	AT (g/L)	Tiempo (h)	Referencia
Alcalino	NS22074 Celulasas NS50010 B-Glucosidase	25.79	15.58	41.37	48	Guiherme <i>et al.</i> (2015)
Peróxido	NS22074 Celulasas NS50010 B-Glucosidase	33.87	3.73	37.60	48	Guiherme <i>et al.</i> (2015)
Ácido y alcalino	Celluclast 1.5 L Celobiosa Novozymes 188	61.08	0	61.08	96	Nochebuena (2012)
<b>Alcalino</b>	<b>Cellic CTec3</b>	<b>87.42</b>	<b>72.15</b>	<b>159.57</b>	<b>42</b>	<b>Presente trabajo</b>

AT: azúcares totales

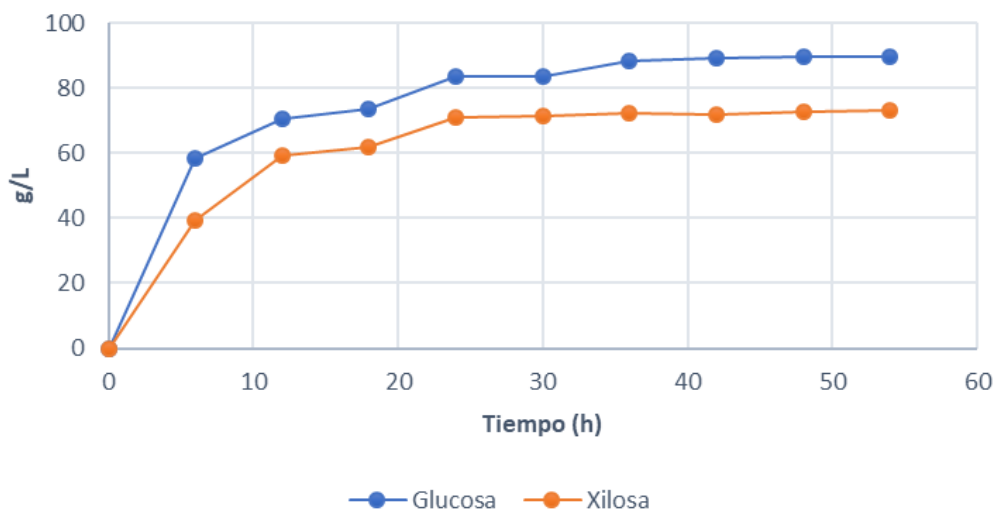
Nochebuena (2012) reporta una concentración final de 61.08 g/L de glucosa utilizando un pretratamiento ácido, alcalino y finalmente un enzimático para la producción de glucosa, mientras que el presente trabajo se obtuvo más del doble de la concentración de azúcares fermentables disminuyendo el tiempo de reacción de 96 a 42 h y utilizando únicamente un pretratamiento alcalino seguido de un enzimático para la producción de azúcares fermentables.

Debido a los datos reportados se concluye que el uso de las mejores condiciones de pretratamiento reportadas en este trabajo para la deslignificación del BC crudo y utilizando la enzima Cellic CTec3 disminuye las etapas de producción de azúcares fermentables a dos pretratamientos (alcalino y enzimático), además del tiempo de

reacción (42 h) haciendo un proceso más económicamente rentable y factible para su escalamiento.

### 6.6.2. Hidrólisis enzimática en el BC pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3 y Cellic HTec3.

Debido a que durante la etapa de hidrólisis enzimática se pretende la mayor conversión de los polisacáridos presentes en sus respectivos monómeros, se llevó a cabo una cinética utilizando dos cocteles enzimáticos (celulasas y xilanas) para la mayor degradación de celulosa y hemicelulosa a glucosa y xilosa respectivamente. Durante la cinética se tomó muestra por duplicado cada 6 horas durante 54 h (Figura 6.11).



**FIGURA 6.12. Cinética enzimática utilizando BC pretratado y las enzimas Cellic CTec3 y Cellic HTec3.**

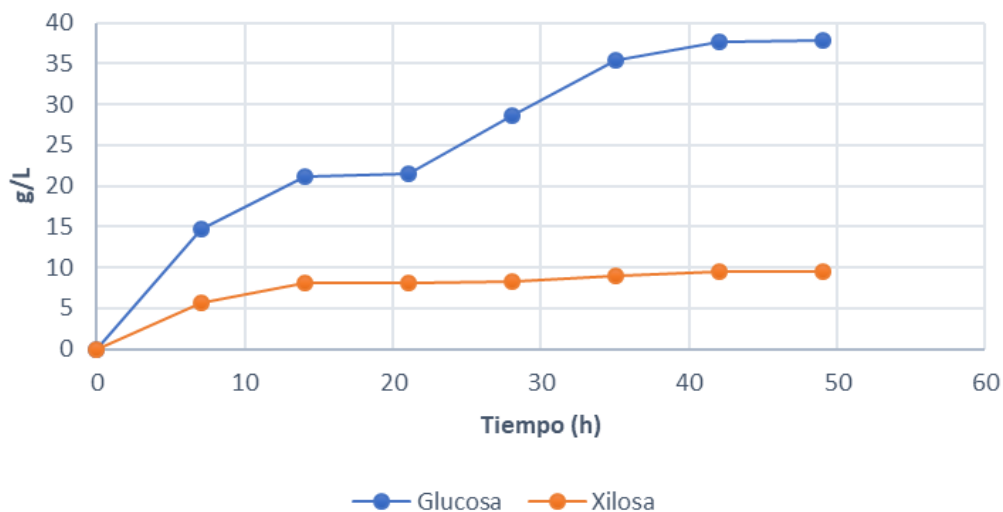
En la Figura 6.11 se muestra que a las 24 h de hidrólisis se generó una concentración de 83.76 y 70.87 g/L de glucosa y xilosa, esto es un 76 y 95% de conversión de glucosa y xilosa.

Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando dos enzimas y sólo Cellic CTec3 muestran que en el caso de utilizar Cellic CTec3 y HTec3 disminuyen el tiempo de conversión del polímero de xilanos a 24 h, sin embargo, se obtienen rendimientos de conversión bajos (<85%) de glucosa, teniendo una concentración final de azúcares fermentables de 154.63 g/L, resultado similar que se produjo utilizando sólo una enzima (Cellic CTec3).

Por lo anterior y debido a que el costo de las enzimas es un factor importante para la factibilidad y viabilidad económica y del escalamiento del proceso se concluye que económicamente es más factible utilizar únicamente el coctel enzimático Cellic CTec3 para la producción de azúcares fermentables.

### 6.6.3. Hidrólisis enzimática en el BAA pretratado utilizando la enzima Cellic CTec3.

Los resultados generados en esta etapa se presentan en la Figura 6.12 en donde se muestra que a las 35 h se produce 35.39 y 8.93 g/L de glucosa y xilosa respectivamente, esto representa un 55 y 17% de conversión de glucanos y xilanos.



**FIGURA 6.13. Cinética enzimática en BAA pretratado utilizando Cellic CTec3.**

Sin embargo, se observa que la conversión de glucanos y xilanos a glucosa y xilosa es baja (<85%), esto puede deberse a que el uso de un sólo pretratamiento alcalino no favoreció la explosión de las fibras de glucanos y xilanos, minimizando el acceso de las enzimas para la hidrólisis de los polímeros. Así mismo, la morfología estructural del bagazo de agave generada durante la cocción de la piña en la producción de mezcal origina un material duro y seco en comparación con el bagazo de caña de azúcar y sorgo dulce. Lo que hace inadecuada la relación líquido-sólido de la solución amortiguadora que se utilizó en este trabajo, ya que la enzima no alcanza la penetración suficiente por medio de la fase líquida utilizada (Ávila-Lara, *et al.*, 2015).

Ávila-Lara, *et al.* (2015) utilizando bagazo de agave pretratado alcanzó una concentración de 13.8 g/L de azúcares totales utilizando Cellic CTec2 y Cellic HTec2, 55 °C, 150 rpm y una concentración de sólidos agregados de 3% en 2 h, mientras que en el presente trabajo se generó un máximo de 44.32 g de azúcares totales a las 35 h. Así mismo Hernández-Salas, *et al.* (2009) hidrolizando bagazo de *Agave atrovirens* pretratado con explosión de vapor, hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina y utilizando Novozyme y Viscozyme L obtuvo 36 g/L de azúcares fermentables tomando como condiciones: 1.33% de carga enzimática, una relación líquido-sólido de 15:1 (mL:g) y 55°C con una duración de 4 h.

## 7. CONCLUSIONES

- La optimización de la etapa ácida en bagazo de caña de azúcar alcanzó una concentración de 29 g/L de xilosa, removiendo cerca del 72% de la fracción de xilanos, en un tiempo de 15 min. Por lo que en esta etapa se disminuyó el requerimiento energético ya que se necesita menor tiempo de aplicación de energía durante el proceso térmico.
- La aplicación de un pretratamiento ácido y un alcalino previo a la hidrólisis enzimática utilizando Cellic CTec3 en bagazo de caña de azúcar permitió alcanzar una conversión de celulosa de hasta el 98% en un periodo menor (42 h) respecto a lo reportado en trabajos previos.
- El uso de dos pretratamientos (ácido y alcalino) previos a la hidrólisis enzimática generaron 167 y 117 g/L de glucosa en bagazo de caña de azúcar y agave respectivamente, en comparación con el proceso No. 2 con sólo una etapa alcalina, en donde se obtuvo 159 y 44 g/L de azúcares totales para caña de azúcar y agave. Esto quiere decir que la celulosa quedó más expuesta al ataque enzimático utilizando el proceso No. 1.
- Los resultados obtenidos utilizando Cellic CTec3 en comparación con lo reportado en trabajos previos utilizando otros complejos enzimáticos comerciales, indican que el uso industrial de esta enzima de última generación es viable para el proceso de conversión de azúcares fermentables.
- La aplicación de un sólo pretratamiento óxido-alcalino en los residuos lignocelulósicos junto con el uso de Cellic CTec3 alcanzaron una conversión del 80 y 55 % de la celulosa en bagazo de caña de azúcar y agave respectivamente en un tiempo de 42 h y 35 h. Obteniendo una concentración de glucosa de 88 y 35 g/L de glucosa.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, R., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vazquez, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Journal of Food Engineering*. 55: 309-318.
- Aguilar-Uscanga, M.G., Delia, M.L. y Strehaiano, P. (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 234: 334-361
- Ahuja, J. (2011). Sugar degradation by acid hydrolysis. Thesis, University Michoacana of San Nicolas from Hidalgo. Department of Chemical Engineering. Morelia, Michoacan. 75.
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., and Dale, B.E., (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121-124,1133-41.
- Alvira P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., Negro M.J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology* 10:4851–4861.
- Ancona-Romero, A. R. (2006). Study of the effect of the substrate type, the nitrogen source and the addition of sulfites on the ethanol production, from autochthonous yeast strains. Master's Thesis. Technological Institute of Veracruz. Veracruz. Mexico
- Área, M.C. (2002). Hydroalcoholic pulp of high yield of sugar cane bagasse. [On line]  
[http://www.riadicyp.org.ar//index.php?option=com\\_remository&Itemid=44&func=select&id=3&orderby=2&page=7](http://www.riadicyp.org.ar//index.php?option=com_remository&Itemid=44&func=select&id=3&orderby=2&page=7). Consult on August 16, 20016
- Arni, S., Zilli, M., and Converti, A. (2007). Solubilization of lignin components of food concern from sugarcane bagasse by alkaline hydrolysis. *Food Science and Technology*. (4):271-277.
- Ávila-Lara, A.I., Camberos-Flores, J.N., Mendoza-Pérez, J.A., Messina-Fernández, S.R., Saldaña-Duran, C.E., Jiménez-Ruiz, E.I., Sánchez-Herrera, L. M., Pérez-Pimienta, J.A. (2015). Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response Surface methodology. *Bioengineering and Biotechnology* . 3:1-10.
- Bayer, E.A., Morag, F., and Lamed, R. (1994). The cellulosome a treasure-trove for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 12 (9): 379-386
- Bayer, E.A., Belaich, P., Shoham, Y. and Lamed, R. (2004). The celulosomes: multienzyme machines for degradations of plant cell Wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 58: 521-554.

- Betancur G.J.V., Pereira N. Jr. (2010). Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13:1-9.
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*.19: 797-841.
- Campos-Pastelin, J. (2008). Establishment of an ethanol production process from cane juice and intermediate honey B with *Saccharomyces cerevisiae* ITV01. Master's Thesis. Technological Institute of Veracruz. Veracruz. México.
- Cao W., Sun C., Liu R., Yin R., Wu X. (2012). Comparison of the effects of five pretreatment methods of enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*. 111:215–221.
- Caparrós, S. (2009). Nonfood integrated fractionation plant for producing cellulosic products and pasta. Doctoral Thesis. University of Huelva. Polytechnic School. Department of Chemical Engineering, Physical Chemistry and Organic Chemistry. 127.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A. and Paz, I.C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. 101:4754-4766.
- Carvaheiro, F., Duarte, L.C., and Girio F.M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatment. *Journal Scientific & Industrial Research*. 67:849-864.
- Carvalho, I.M.J., Deliza, R., Silva, C.A.B., Miranda, R.M. y Maia, M.C.A. (2003). Identifying the adequate process conditions by consumers for pineapple juice using membrane technology. *Journal of Food Technology*. 1: 150-156.
- Castañón-Rodríguez, J. F., Portilla-Arias, J. A., Aguilar-Uscanga, B. R., Aguilar-Uscanga, M. G. (2015). Effects of oxygen and nutrients on xylitol and ethanol production in sugar bagasse hydrolyzates. *Food Science Biotechnology*. 24 (4): 1381-1389.
- Castañón-Rodríguez, J. F., Welti-Chanes, J., Palacios, A.J., Torrestiana-Sánchez, B., Ramírez de León, J.A., Velázquez, G. y Aguilar-Uscanga, M.G. (2015). Influence of high pressure processing and alkaline treatment of sugar cane bagasse hydrolysis. *Journal of Food*. vol.13 (4):613-620.
- Chang V.S., Holtzaple M.T. (2000): Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86:5-37
- Chen, W.-H., Tu, Y.-J. and Shen, H.-K. (2011). Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*. 88: 2726-2734
- Claassen P.A.M., Contreras A.M.L., Sijtsma, L., Weusthuis, R.A., Van Lier J. B., Van Lier, J.B., Van Niel, E.W.J., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A.

(1999), Utilisation of biomass for supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 741-755.

- Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A., El-Halwagi, M. (2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*. 90:189-202.
- Coughlan, M.P. (1992). Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In *Xylan and Xylanases*. J Visser, G Beldman, Kuster-van-Someren, Ma., Voragen, AGJ. Elsevier, Amsterdam. 111-139.
- Coughlan, M.P., Touhy, M.G., Filho, E.X.F., Plus, J., Claeysens, M., Vrsanska, M., and Hughes, M.M. (1993). Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In *Hemicellulose and Hemicellulases*. Coughlan M.P. and Hazlewood G.P. (Eds). Portlan Press, London. 53-84.
- Deschamps F.C., Ramos L.P., Fontana J.D. (1996). Pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced ruminal digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 57-58: 171-182.
- Deswal, D., Khasa, Y.P. and Kuhad, R.C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under Solid State Fermentation. *Bioresource Technology*. 102(10): 6065-6072.
- Escamilla-Treviño, L.L. (2012). Potential of plants from the genus agave as bioenergy crops. *Bioenergy Research*. 5(1): 1-9.
- Fan L. T., Gharpuray, M. M., y Lee, Y. H. (1987). *Cellulose Hydrolysis*. Berlin, Alemania. Springer-Verlag. 3, 1-68.
- Fengel, D. y Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter. Berlin.
- Ferrara, M.A., Bon, E.P.S., y Neto, J.S.A. (2002). Use of steam explosion liquor from sugar cane bagasse for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100, 289-300.
- Galbe, M., y Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 618- 628.
- Garcia-Moya, E., Romero-Manzanares, A. (2011). Highlights for agave productivity. *GCB Bioenergy*. 3(1):4-14.
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *European Journal of Wood and Wood Products*. 57(3): 191-202.
- Gharpuray M.M., Lee Y.H., Fan L.T. (1983): Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 25:157-172.

- Guarneros-Flores. (2017). Optimization of enzymatic hydrolysis from sweet sorghum bagasse at pilot plant level using commercial enzymes. "Master in Sciences in Biochemical Engineering. Technological Institute of Orizaba, Veracruz, Ver.
- Guilherme, A.A., Dantas, P.V.F., Santos, E.S., Fernandes, F.A.N., Macedo, G.R. (2015). Evaluation of composition characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 32: 23-33.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G., Zacch, G. (2006) Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*. 24(12):549–556.
- Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen K.A., Ryan Z.C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microbial Technology*. 30:445-453.
- Hernández-Salas, J.M., Villa-Ramírez, M.S., Veloz-Rendón, J.S., Rivera-Hernández, K.N., González-César, R.A., Plascencia-Espinosa, M.A., Trejo-Estrada, S.R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugar cane and agave bagasse, *Bioresourse Technology*. 100, 1238-1245.
- Hidalgo-Reyes, M., Caballero-Caballero, M., Hernández-Gómez, L.H., Urriolagoitia-Calderón, G. (2015). Chemical and Morphological characterization of *Agave angustifolia* bagasse fibers. *Botanical Sciences*. 93(4): 807-817.
- Hon, D.N.S. y Shiraishi, N. (2001). Wood and Cellulosic Chemistry, second ed. Dekker, New York.
- Itoh, H., (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 103, 273-280.
- Kaur, P., Uppal, S.K., Dhir, C., Kaur, R., Sharma, P. (2015). Comparative study of chemical pretreatments and acid saccharification of bagasse of sugar crops for ethanol production. *Sugar Technology*. 17(4): 412-417.
- Kim, K.H., y Hong, J. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresourse Technology*. 77, 139-144.
- Krishnan, C., Sousa, L.C., Jin, M., Chang, L., Dale, B.E., Balan, V. (2010). Alkali-based AFEX pretreatment for the conversión of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 107: 441-450.
- Kuhad, R.C., Singh, A., and Eriksson, K.E. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 57: 45-125.

- Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M.J., Stroeve, P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48:3713-3729.
- Lafitte-Trouqué S. and Forster C. F. (2002.) The use of ultrasound and gamma irradiation as pre-treatments for the anaerobic digestion of waste activated sludge at mesophilic and thermophilic temperatures.84:113-118.
- Laser M., Schulman D., Allen S.G, Lichwa J., Antal M.J. Jr, Lynd L. R. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*. 81:33-44.
- Li, B.Z., Balan, V., Yuan Y. J., Dale B. E. (2010). Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pre-treatment. *Bioresource Technology* 101:1285–1292.
- Liu, C., and Wyman, C. E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 42, 5409–5416.
- Lloyd, T.A. and Wyman, C. E. (2005). Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 96 (18),1967-1977.
- Loera-Corral, O., (2002). Microbial xylanases and their applications. *BioTechnology*. 7 (2):25-37.
- Martínez-Gutiérrez, G. A., Íñiguez-Covarrubias, G., Ortiz-Hernández, Y. D., López-Cruz, J. Y. and Bautista-Cruz, M.A. (2013). Times of application of bagasse of maguey mezcalero and its effect on compost properties for tomato substrates. *International Journal of Environmental Pollution*. 29: 209-216.
- Marques G. (2010). Valorization of different lignocellulosic crops for the production of paper pulp: Chemical characterization, structural modification of its organic constituents during cooking and bleaching processes and biotechnological applications. Doctoral Thesis in Chemistry University of Seville, Spain, 299.
- Monsalve G., J. F., Medina-De Pérez, V. I., Ruiz-Colorado, A. A. (2006). Ethanol production of banana shell and cassava starch. [On line]. <http://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/830>. Consult on August 25, 2016.
- Mooney, C.A., Mansfield, S.D., Touhy M.G., Saddler J.N. (1998). The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*. 64:113-119.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., Ladisch M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96:673-686.

- Nakamura Y., Daidai M., Kobayashi F. (2004). Ozonolysis mechanism of lignin model compounds and microbial treatment of organic acids produced. *Water Science Technology*. 50:167-172.
- Noche-Buena, (2012). Optimization of the oxidative treatment on the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using response Surface " Master in Sciences in Biochemical Engineering. Technological Institute of Veracruz, Veracruz, Ver.
- Novozymes, (2012). [Online] [http://s3.amazonaws.com/zanran\\_storage/bioenergy.novozymes.com/Content/Pages/2546502386.pdf](http://s3.amazonaws.com/zanran_storage/bioenergy.novozymes.com/Content/Pages/2546502386.pdf). Consult on February 16, 2017.
- Novozymes, (2014). [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com). Consult May 05, 2017.
- Nuñez-García, J. and García-Triñanes. (s.f). Biofuel: bioethanol and biodiesel [Online] [http://www.enciga.org/files/boletins/61/biocombustibles\\_bioetanol\\_y\\_biodiesel.pdf](http://www.enciga.org/files/boletins/61/biocombustibles_bioetanol_y_biodiesel.pdf). Consult on February 16, 2017.
- Partida-Sedas. (2017). Production of ethanol from the juice and bagasse of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genetically improved. Doctor of Food Sciences. Technological Institute of Veracruz, Veracruz, Ver.
- Percival-Zhang, Y.H., Himmel, M.E. y Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24(5): 452-481.
- Pernalet Z., Piña F., Suárez M., Ferrer A., Aiello C. (2008) Fractionation of sugarcane bagasse by ammonia treatment: Effect of bagasse moisture and ammonia charge. *Bioagro*. 20(1): 3-10.
- Pietrobon, V.C., Rosim-Montero, R.T., Pompeu, G. B., Borges, P. E., López, M.L., Amorim, H.V., Cruz, S.H., Viégas, E.K.D. (2011). Enzymatic Hydrolysis of sugar bagasse pretreatment with acid or alkali. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54: 229-233.
- Ramesh, C.K., Rishi, G., Ajay S. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*. 1-10.
- Rashid, M.H., Sissiqui, K.S. (1998). Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Process Biochemical*. 33(2): 109-115.
- Ratnavathi, C.V., Chakravarthy, S.K., Komala, V.V., Chavan, U.D., Patil, J.V., (2011). Sweet sorghum as feedstock for biofuel production: a review. *Sugar Technology*. 13, 399-407.
- Saha B.C., Cotta M.A. (2007). Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microbial Technology*. 41:528–532.

- Saini, J. K., Saini, R., Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Cross Mark*. 5:337-353.
- Sánchez, Ó.J., y Cardona, C.A. (2005). Biotechnological production of alcohol fuel I: obtaining from different raw materials. *Interciencia*. 30(11): 671-678.
- Sánchez-Riaño, A.M., Gutiérrez-Morales, A.I., Muñoz-Hernández, J.A., Rivera-Barrero, C.A. (2010). Production of bioethanol from lignocellulosic agro-industrial products. [Online] <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/58> . Consult on August 16, 2016.
- Sausedo-Luna, J., Castro-Montoya, A.J., Martínez-Pacheco, M.M., Sosa-Aguirre, C.R., Campos-García, J. (2011). Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38:725-732.
- Singh, A. (1999). Engineering enzyme properties. *Indian Journal of Microbiology*. 39 (2): 65-77.
- Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production a review. *Bioresourse Technology*. 83:1-11.
- Sun, J.X., Sun, X.F., Zhao, H., Sun, R.C. (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*. 84: 331-339.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9:162-1651.
- Takahashi, C.M., Lima, K.G.C., Takahashi, D.F. y Alterthum, F. (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16, 829-834.
- Tomás, M. (2010). Bioethanol from wheat straw: integration strategies stages of the process. "Doctoral Thesis. Complutense University of Madrid. School of Biological Sciences, Department of Microbiology III, 135.
- Valverde, G. A., Sarria, L.B., Monteagudo, Y.L. (2007) "Comparative analysis of the physico-chemical characteristics of the rice husks". *Scientia et Technica* Año XIII, No 37, December, 2007. Technological University of Pereira. ISSN 0122-1701
- Vargas J., Ruíz M., Rodríguez R., Barrientos L. García P., López F. (2011) Fermentable sugars from *Lupinus rotundiflorus* biomass by concentrated hydrochloric acid hydrolysis. *Bioresourse Technology Journal Elsevier*. 6(1). 344-355.

- Vieira, M.C., Heinze, T., Antonio-Cruz, R. and Mendoza-Martinez, A. M. (2002). Cellulose derivatives from cellulosic material isolated from *Agave lechuguilla* and *A. fourcroydes*. *Cellulose*. 9, 203-212.
- Wyman, C.E. (1994), Ethanol from lignocellulosic biomass: technology economics, and opportunities. *Bioresource Technology*. 50, 3-15.
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J.A., Cushman, J.C., Tian, E., Lin, H. (2015). Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*. 76: 43-53.
- Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z. y Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*. 100, 903–908.