

**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS**

**DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Influencia del bagazo de agave pretratado con líquidos iónicos en la  
digestibilidad enzimática y fermentación en etanol**

Tesis que presenta

**José Antonio Pérez Pimienta**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de Tesis: **Dra. María Teresa Ponce Noyola**

**México, D.F.**

**Abril de 2015**

## Contenido

Créditos.....	iv
Comité tutorial.....	v
Dedicatorias.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas.....	ix
Notación.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2. Biomasa lignocelulósica .....	2
1.2.1. Composición .....	3
1.2.2. Bagazo de agave.....	4
1.2.2.1. Oxalato de calcio en bagazo de agave .....	9
1.3. Pretratamientos en biomasa lignocelulósica .....	9
1.3.1. Con líquidos iónicos.....	11
1.3.2. Con ácidos.....	13
1.3.3. Con álcalis .....	15
1.3.4. Con peróxido de hidrógeno alcalino .....	15
1.4. Hidrólisis.....	16
1.5. Fermentación alcohólica.....	18
2. JUSTIFICACIÓN .....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
3.1. Hipótesis general .....	20

4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos particulares .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. Diseño experimental .....	22
5.2. Materiales y preparación .....	22
5.3. Métodos analíticos y procedimientos .....	23
5.3.1. Extracción de oxalato de calcio.....	23
5.4. Procesos de pretratamiento de biomasa .....	23
5.4.1. Con el líquido iónico (LI) [Bmim]Cl en viales .....	23
5.4.2. Con líquidos iónicos en reactores tipo globo .....	24
5.4.3. Con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA).....	24
5.4.4. Con hidrólisis ácida diluida (HA).....	25
5.4.5. Con hidrólisis alcalina (AL) .....	26
5.5. Caracterización química .....	26
5.5.1. Contenido de humedad .....	26
5.5.2. Contenido de celulosa y hemicelulosa.....	27
5.5.3. Contenido de lignina insoluble y soluble en ácido .....	27
5.5.4. Contenido de cenizas .....	28
5.5.5. Medición de cristalinidad.....	28
5.5.6. Espectroscopía ATR-FTIR.....	29
5.5.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	30
5.5.8. Sacarificación enzimática.....	30
5.5.9. Determinación de azúcares reductores .....	32
5.5.10. Glucosa y xilosa .....	32
5.5.11. Determinación de productos de degradación en la hidrólisis ácida.....	32
5.5.12. Fermentación alcohólica .....	33
5.5.13. Determinación de etanol .....	33
5.5.14. Análisis estadístico .....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
6.1. Composición del bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) .....	34

6.2. Análisis composicional de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) pretratados con (LI) [Bmim]Cl y peróxido de hidrógeno alcalino (PHA).....	35
6.3. Análisis composicional de bagazo de agave (BAG) pretratado con LI [Emim]OAc, hidrólisis ácida diluida e hidrólisis alcalina. ....	39
6.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier .....	43
6.5. Difracción de rayos X.....	49
6.6. Microscopía electrónica de barrido.....	52
6.7. Sacarificación enzimática de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) sin tratar y pretratado .....	55
6.8. Fermentación alcohólica.....	65
7. CONCLUSIONES .....	68
8. REFERENCIAS.....	69
9. ANEXOS.....	73
9.1. Anexo 1 .....	73
9.2. Anexo 2. ....	74
9.3. Anexo 3. ....	75
9.4. Anexo 4. ....	76

## CRÉDITOS

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (**CINVESTAV-IPN**), en el laboratorio de **Genética Microbiana y Fermentaciones** (Laboratorio 17). La dirección de tesis estuvo a cargo de la **Dra. María Teresa Ponce Noyola**.

El desarrollo de esta tesis de maestría tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) a través de la beca **No. 339309**, y el proyecto **CONACYT – 104333**.

## COMITÉ TUTORIAL



### **Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola**

Investigadora CINVESTAV 3C

Investigadora Nacional Nivel II

Responsable del laboratorio de Genética Microbiana

Líneas de investigación: Bioprocesos y bioproductos

Proyectos de investigación: Producción de enzimas nativas y recombinantes para uso industrial. Estudios de regulación de la expresión de glucanasas. Obtención de azúcares fermentables a partir de residuos agrícolas.



### **Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**

Investigador CINVESTAV 3D

Investigador Nacional Nivel III

Responsable del laboratorio de Biotecnología Ambiental

Líneas de investigación: Biotecnología ambiental.

Proyectos de investigación: Bioenergía y residuos sólidos. Tratamiento biológico de efluentes (industriales y tóxicos) y restauración de sitios contaminados.



### **Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia**

Investigadora CINVESTAV 3C

Investigador Nacional Nivel II

Líneas de investigación: Bioprocesos y bioproductos

Proyectos de investigación: Estrés y metabolismo secundario. Producción de fitofármacos en biorreactores. Propagación y caracterización de *jatropa* (biocombustibles).

**CINVESTAV.** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A Madero CP. 07360. México, D.F. México.

# DEDICATORIAS

## **A Dios**

Quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

## **A mi padres, José Antonio† y Consuelo**

Quienes por ellos soy lo que soy. Por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

## **A mis hermanas, Diana y Mayra**

Por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar y caminar hacia el futuro.

## **A mi esposa, Mónica Guadalupe**

Por todo el amor y apoyo, por estar siempre a mi lado, quién ha sido siempre mi motivación, y felicidad.

## **A mi hija, Mirela**

Por ser mi inspiración para seguir avanzando y superarme cada día de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa Ponce Noyola, por todo su apoyo, dirección, paciencia y como guía a lo largo de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo, por la ayuda en estadística y en la escritura de textos científicos.

A la Dra. Ana Ramos Valdivia, por su amable disposición y asesoría para involucrarme más profundamente en temas biológicos con gran efecto en mí.

A la M. en C. Odilia Pérez Ávalos por facilitarme el material y equipo necesario en la realización del trabajo experimental.

A la técnico Verónica Soto Bellosa por su colaboración en la realización de análisis dentro del laboratorio.

Al Dr. José Chávez Carvayar, por su disposición y asesoría en la utilización de equipos de difracción de rayos X y espectrómetros FT-IR.

Al Dr. Blake Simmons, por sus consejos, y asesoría en el pretratamiento LI.

A la Dra. Seema Singh, por sus enseñanzas en cromatografía de líquidos.

Al Dr. Carlos Escamilla por su ayuda en el manejo de programas estadísticos, aconsejarme en varios temas y su valiosa amistad.

Al C. Dr. Francisco Javier Ríos por su amistad, consejo tanto en lo laboral como personal y una gran motivación en el laboratorio.

A la C. Dra. Lina Castelblanco por los buenos momentos compartidos.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Lety, Enrique, Pablo y Dany, por la convivencia dentro y fuera del laboratorio.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	4
<b>Fig. 2.</b> Distribución de los cultivos de agave predominantes en México .....	8
<b>Fig. 3.</b> Efecto del pretratamiento en la biomasa celulósica.....	10
<b>Fig. 4.</b> Mecanismo de acción de los líquidos iónicos sobre las cadenas de celulosa durante el pretratamiento de biomasa celulósica .....	13
<b>Fig. 5.</b> Mecanismo de acción de las celulasas .....	17
<b>Fig. 6.</b> Descripción del proceso de hidrólisis ácida.....	26
<b>Fig. 7.</b> Deslignificación de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) pretratado con líquidos iónicos (LI) y peróxido de hidrógeno alcalino calculado sobre los materiales sin tratar (controles) .....	38
<b>Fig. 8.</b> Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de bagazo de agave (A) y bagazo de agave extraído (B) de muestras sin tratar y pretratadas con peróxido de hidrógeno y líquido iónico [Bmim]Cl. Bagazo de agave sin tratar y pretratado con líquido iónico [Emim]OAc (C).....	45
<b>Fig. 9.</b> Difractogramas de rayos X para: (A) bagazo de agave y (B) bagazo de agave extraído.....	50
<b>Fig. 10.</b> Efecto del pretratamiento con el LI [Bmim][Cl] y peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) en bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) sobre el porcentaje de cambio relativo de la cristalinidad (CRC).....	52
<b>Fig. 11.</b> Micrografías electrónicas de barridos de bagazo de agave (A) y bagazo de agave extraído (B) sin tratar.....	54
<b>Fig. 12.</b> Sacarificación enzimática de bagazo de agave (A) y bagazo de agave extraído (B) de muestras sin tratar y pretratadas usando una carga enzimática constante.....	56
<b>Fig. 13.</b> Producción de azúcares a las 72 h con biomasa sin tratar y pretratada [bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX)] .....	57
<b>Fig. 14.</b> Conversión a glucosa (A) y xilosa (B) de la sacarificación enzimática de bagazo de agave sin tratar y pretratado con [Emim]OAc usando una carga enzimática constante.....	59
<b>Fig. 15.</b> Producción de azúcares reductores en bagazo de agave sin tratar y pretratado con NaOH utilizando una carga de sólidos del 3 y 6%.....	61
<b>Fig. 16.</b> Producción de azúcares reductores en bagazo de agave pretratado con NaOH utilizando una carga de sólidos del 9, 12 y 15 %.....	62
<b>Fig. 17.</b> Azúcares reductores en bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y líquidos iónicos (LI-[Emim]OAc).....	63
<b>Fig. 18.</b> Producción de glucosa y xilosa a 72 h de sacarificación de bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y LI-[Emim]OAc.....	64
<b>Fig. 19.</b> Producción de etanol de los sacarificados de bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y líquido iónico ([Emim]OAc).....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Análisis composicional de algunos residuos madereros, agroindustriales y pastos de crecimiento acelerado .....	5
<b>Tabla 2.</b> Efecto de varios pretratamientos en la composición química y la estructura físico/química de la biomasa lignocelulósica .....	11
<b>Tabla 3.</b> Condiciones experimentales del pretratamiento PHA.....	25
<b>Tabla 4.</b> Muestras de bagazo de agave pretratadas empleadas en la sacarificación enzimática.....	31
<b>Tabla 5.</b> Análisis composicional de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) sin tratar.....	34
<b>Tabla 6.</b> Diseño experimental para los pretratamientos: líquidos iónicos (LI) hidrólisis ácida diluida (HA) e hidrólisis alcalina (AL) en BAG y BEX .....	35
<b>Tabla 7.</b> Análisis composicional de bagazo de agave y bagazo de agave pretratado con el líquido iónico (LI) [Bmim]Cl y con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA).....	37
<b>Tabla 8.</b> Diseño experimental para los pretratamientos en bagazo de agave con el líquido iónico (LI) [Emim]OAc, hidrólisis ácida diluida (HA) e hidrólisis alcalina (AL).....	39
<b>Tabla 9.</b> Análisis composicional de bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida (HA) y el líquido iónico [Emim]OAc.....	41
<b>Tabla 10.</b> Cambios relativos a nivel molecular en bagazo de agave (BAG) después del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino y los líquidos iónicos [Bmim]Cl y [Emim]OAc .....	46
<b>Tabla 11.</b> Cambios relativos a nivel molecular del bagazo de agave extraído (BEX) después del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino y el líquido iónico [Bmim]Cl .....	47
<b>Tabla 12.</b> Rendimientos de producción de etanol a partir de los sacarificados de bagazo de agave (BAG) pretratado con con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y líquidos iónicos (LI-[Emim]OAc) .....	66

## NOTACIÓN

[Bmim]Cl	Cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolio
[Emim]OAc	Acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio
CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Oxalato de calcio
AL	Hidrólisis alcalina
ATR-FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
BAE	Bagazo de agave extraído
BAG	Bagazo de agave
CRC	Cambio relativo de la cristalinidad
DRX	Difracción de rayos X
HA	Hidrólisis ácida diluida
HMF	Hidroximetilfurfural
ICr	Índice de cristalinidad
LI	Líquido iónico
MAC	Metabolismo ácido de las crasuláceas
MEB	Microscopia electrónica de barrido
PHA	Peróxido de hidrógeno alcalino
R <sub>E/G</sub>	Rendimiento de etanol a glucosa
R <sub>E/C</sub>	Rendimiento de etanol a celulosa

## RESUMEN

El pretratamiento de bagazo de agave (BAG) con líquidos iónicos se evaluó para incrementar la producción de azúcares, y su fermentación en etanol. El BAG además fue tratado con ácido clorhídrico para la extracción de oxalato de calcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ), este material fue llamado BEX. Posteriormente, el BAG y el BEX fueron pretratados con el líquido iónico (LI) [Bmim]Cl (cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolio) a 120 °C y 160 °C, además de peróxido de hidrógeno alcalino (PHA). La presencia de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  provee de una recalcitrancia aumentada al BAG pretratado con LI [Bmim]Cl obteniéndose por lo tanto una menor deslignificación, 12.2 % vs. 20.2 % cuando se compara con BEX. El pretratamiento con PHA reaccionó negativamente a los microcristales libres de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  presentes en el BEX, ésto debido a su incompatibilidad con oxidantes fuertes lo cual no ocurrió con el BAG obteniéndose como consecuencia una menor producción de azúcares. Se evaluó otro LI, [Emim]OAc (acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio) pero sólo sobre BAG, obteniéndose 36.3 % de deslignificación. La cristalinidad del BAG se redujo con el PHA y LI [Bmim]Cl, observándose el mayor cambio (56%) con LI [Bmim]Cl-120 °C cuando se compara con el BAG sin tratar. La producción de azúcares más elevada se obtuvo con BAG pretratado con [Emim]OAc-120 °C alcanzando conversiones de 94.7 % de celulosa en glucosa y 87.4 % de hemicelulosa en xilosa (correspondientes a 5.26 mg glucosa/mL y 2.09 mg xilosa/mL). Mientras que el valor más elevado de producción de azúcares reductores para el BEX pretratado fue de 7.7 mg/mL con [Bmim]Cl-160 °C. Por lo tanto, a partir del BAG se obtuvo una mayor producción de azúcares lo cual representa una ventaja en términos de costos totales de proceso. La fermentación empleando *Saccharomyces cerevisiae* se realizó con los sacarificados obtenidos de BAG pretratado, obteniéndose las mayores concentraciones de etanol con [Emim]OAc-120 °C y [Emim]OAc-160 °C siendo éstos de 7.4 y 6.6 mg/mL, respectivamente. Al comparar el pretratamiento del BAG con LI con algunos pretratamientos como la hidrólisis ácida diluida (HA) e hidrólisis alcalina (AL), el pretratamiento con [Emim]OAc del material permitió una eficiente producción de azúcares y por lo tanto una mejor producción de etanol.

## ABSTRACT

Agave bagasse (AGB) was pretreated with ionic liquid to increase sugars production to be fermented to ethanol. AGB was also treated with hydrochloric acid for removing calcium oxalate ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ), this material was named EXB. Subsequently, AGB and EXB were pretreated with the ionic liquid (IL) [Bmim]Cl (1-butyl-3-methylimidazolium chloride) at 120 °C and 160 °C, besides to an alkaline hydrogen peroxide (PHA) pretreatment. The presence of  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  provided an increased recalcitrance to IL-[Bmim]Cl pretreated AGB obtaining a lower delignification of 12.2 % vs. 20.2 % when compared to BEX. PHA pretreatment reacted negatively to free  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  microcrystals present in BEX, and this is due to an incompatibility with strong oxidants, which did not occur with AGB. Another IL as [Emim]OAc (1-ethyl-3-methylimidazolium acetate) but only in AGB was assessed. In this case a higher delignification value up to 36.3 % was obtained. AGB crystallinity decreased with PHA and [Bmim]Cl pretreatments which the most significant change occurred with [Bmim]Cl-120 °C up to 56 % when compared to untreated AGB. The highest sugars production occurred in [Emim]OAc pretreated AGB at 120 °C obtaining conversions of cellulose to glucose of 94.7 % and from hemicellulose to glucose of 87.4 % (corresponding to 5.26 mg glucose/mL and 2.09 mg xylose/mL). In contrast, the highest value of sugar production in pretreated BEX was 7.7 mg/mL using [Bmim]Cl-160 °C. Therefore, the highest values of sugar production were obtained from the AGB treated using a lower temperature which means an advantage in terms of overall process costs. Fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* was performed with the saccharified of pretreated AGB, achieving the highest concentrations of ethanol from [Emim]OAc-120 °C and [Emim]OAc-160 °C with 7.4 g/L and 6.6 g/L, respectively. When comparing IL pretreatment with some consolidated pretreatment process such as dilute acid hydrolysis (DA) and alkaline hydrolysis (AH), a pretreatment process in AGB using [Emim]OAc proved to be efficient in obtaining high sugar production and therefore a better ethanol concentration.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

Los recursos de combustibles fósiles han sido durante bastante tiempo la fuente principal de energía para abastecer las necesidades del mundo. Estas necesidades han seguido aumentando, pero las reservas de petróleo son limitadas y se espera un gran declive en la producción de petróleo crudo en el futuro cercano (Sun y Cheng et al., 2002). Además, su uso causó un gran impacto ambiental en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Estas razones han despertado el interés en la investigación de fuentes de energías alternativas y renovables. El bioetanol ha atraído la atención durante muchos años y la producción de etanol a partir de sacarosa y almidón son en la actualidad procesos establecidos. La mayor parte de la producción de bioetanol se contabiliza a Estados Unidos y Brasil a partir de maíz y caña de azúcar, respectivamente (Quintero et al., 2013). El etanol tiene tres usos principales: producción de compuestos químicos, bebidas alcohólicas y como combustible para transporte. El etanol grado industrial es destinado principalmente para el mercado de productos químicos y usos médicos. El etanol grado alimenticio (etanol desnaturalizado) es destilado para el mercado nacional de alimentos, bebidas, cosméticos y como producto intermedio en la industria en general. Por último, el etanol grado combustible (bioetanol, o etanol desnaturalizado) es destilado para el mercado energético como combustible líquido para transporte. Existen una variedad de intervalos de mezclas para el etanol como combustible, incluyendo E5 (gasolina que contiene 5 % etanol), E10 (10 %), E85 (85 %), y E100 (100 %) (Demirbaş 2005). A nivel mundial los países pioneros en la producción de biocombustibles son Estados Unidos y Brasil. Estos países están generando millones de litros de bioetanol a partir de maíz y caña de azúcar, cultivos destinados para la alimentación humana, lo que ha generado gran controversia social, económica y política; así como disminución en los recursos alimenticios para la sociedad y por consecuencia aumento en los precios de los alimentos.

Los biocombustibles de segunda generación son los que se pueden obtener a partir de fuentes no comestibles, como por ejemplo desechos agrícolas o plantas con pocos requerimientos de cultivo que se puedan sembrar en tierras poco fértiles y que necesiten poca energía para la conversión. Éstas plantas presentan gran potencial, especialmente porque tienen mayores beneficios ambientales que los obtenidos del petróleo o de los biocombustibles de primera generación obtenidos de alimentos (Castro-Martínez et al., 2009).

## **1.2. Biomasa lignocelulósica**

Bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico. Asimismo, la biomasa lignocelulósica, es relativamente económica y es el recurso renovable más abundante en la tierra (Radillo et al., 2010). La biomasa tiene una producción mundial total aproximada de  $1 \times 10^{16}$  ton y puede ser empleada en la producción de biocombustibles y otros productos de interés tales como: proteínas, enzimas, biopolímeros, ácidos orgánicos, furfural y sus derivados, etc. (Zavrel et al., 2009). Una ventaja importante es que a diferencia de los sustratos ricos en almidón, la biomasa no compite con la cadena alimenticia humana y su costo de producción es menor. El dióxido de carbono emitido durante la producción y el uso del etanol se puede convertir de nuevo a biomasa en el cultivo de las cosechas y la utilización de sus desechos o residuos agroindustriales (materiales celulósicos); puede ser considerada como un recurso infinito, por lo que va proporcionar nueva materia prima para la producción (Wyman, 1996; Zakrzewska et al., 2011).

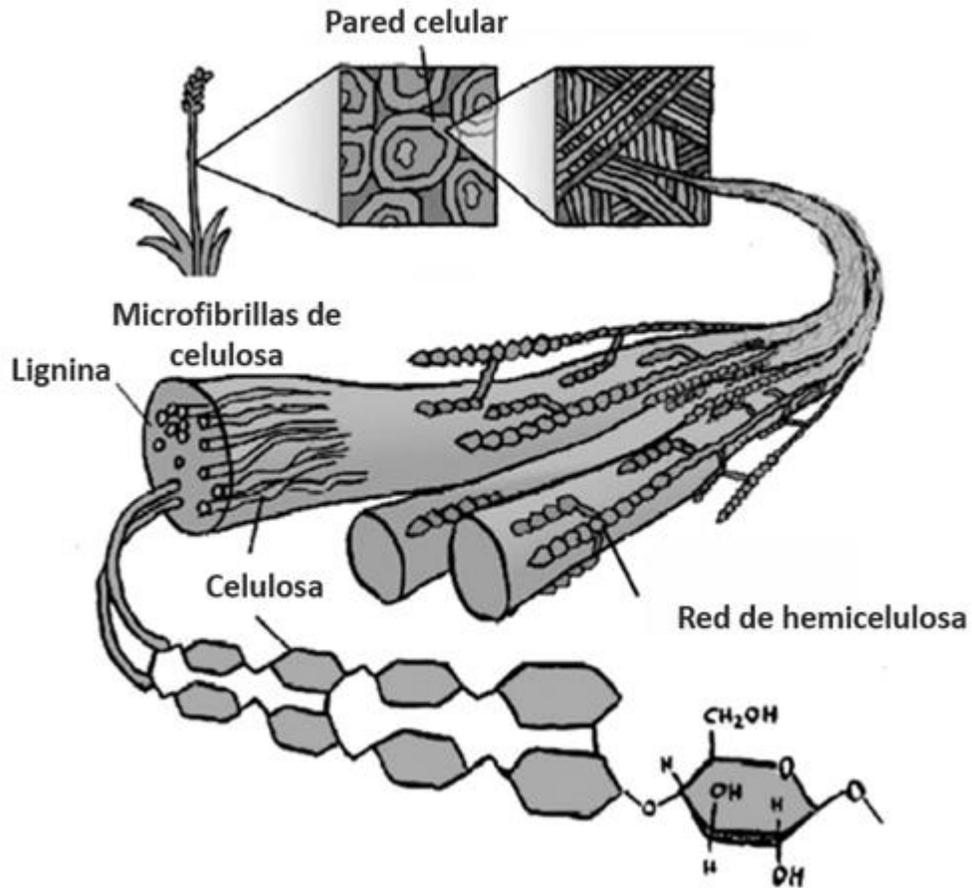
De acuerdo con Ballesteros (2001), la biomasa se puede clasificar en:

1. Biomasa natural producida en los ecosistemas naturales. Aunque es una de las principales fuentes energéticas en los países en vías de desarrollo, no es la más adecuada para un aprovechamiento energético masivo, ya que podría originar una rápida degradación de los ecosistemas.

2. Biomasa residual generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Los residuos agrícolas proceden de los cultivos leñosos y herbáceos, destacando los producidos en los cultivos de cereal. Los de origen forestal proceden de los tratamientos silvícolas, de mejora y mantenimiento de los montes y masas forestales. También se pueden considerar incluidos en este grupo los residuos de la industria papelera y la fracción orgánica de los residuos domésticos e industriales, los cuales no sólo no tienen valor económico en el contexto en que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales en su eliminación.
3. Cultivos energéticos son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios. Se diferencian dos tipos: los orientados a la producción de materiales leñosos con especies de crecimiento rápido como el eucalipto, y los orientados a la producción de especies vegetales anuales, como por ejemplo, el “switchgrass” o pasto varilla.

### **1.2.1. Composición**

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, sin embargo también se encuentran presentes aunque en menor cantidad pectinas, extractivos y cenizas. En la Fig. 1 se muestra la estructura de biomasa lignocelulósica, donde es posible observar las microfibrillas compuestas por cadenas de hemicelulosa y lignina, además de las microfibrillas de celulosa. Los porcentajes típicos en peso seco son 35-50 % de celulosa, 20-35 % hemicelulosa, y 5-10 % lignina. Estos porcentajes pueden variar entre especies, en las diferentes partes de la misma planta y también pueden verse influenciados por la geografía o factores ambientales (Tabla 1). Todos estos componentes se unen en una matriz compleja que tienen como resultado su estructura final con una proporción característica para cada especie que varía dependiendo de las condiciones del medio ambiente.



**Fig. 1.** Estructura de la biomasa lignocelulósica (de Wild et al., 2011).

### 1.2.2. Bagazo de agave

Las materias primas lignocelulósicas, tales como las plantas de agave que crecen en tierras áridas y semiáridas podrían ser una respuesta sustentable a la creciente demanda de combustibles renovables que no entren en conflicto con la producción de alimentos. Tales plantas utilizan el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés) por lo cual tienen bajos requerimientos de agua y son productivas en regiones semiáridas. Debido a que asimilan carbono durante la noche de ese modo disminuyen el gradiente difusivo de agua fuera de las hojas y mejoran la eficiencia del uso de agua (Nobel y Berry 1985).

**Tabla 1.** Análisis composicional de algunos residuos madereros, agroindustriales y pastos de crecimiento acelerado

<b>Material</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
<b>Bagazo de agave</b>	46	20	19
<b>Bagazo de caña</b>	46	29	23
<b>Madera de Pino</b>	46	9	29
<b>Madera de Álamo</b>	50	9	18
<b>Pasto Bermuda</b>	25	36	6
<b>Pasto varilla</b>	45	31	12
<b>Rastrojo de maíz</b>	35	22	20
<b>Rastrojo de trigo</b>	38	21	23

(Mosier et al., 2005; Jørgensen et al., 2007; Kumar et al., 2009a; Li et al., 2011; Pérez-Pimienta et al., 2013)

Además, entre más grande es la variación diurna de la temperatura, mayor es la ventaja en la eficiencia del uso de agua de la CAM. Debido a este uso eficiente de los recursos, las plantas CAM se han introducido recientemente como cultivos bioenergéticos potenciales.

Las plantas CAM requerirán menor energía para su conversión a combustibles debido a su bajo contenido de lignina y altas reservas de carbohidratos solubles y por lo tanto, puede resultar en una materia prima más accesible a las sacarificación enzimáticas que materiales con un alto contenido de lignina (Smith, 2008; Borland et al., 2009). El género *Agave* está compuesto exclusivamente de plantas CAM e incluyen especies que se cultivan comercialmente. Es importante destacar que prosperan en condiciones que son inapropiadas para los principales cultivos alimenticios y pastura forrajera.

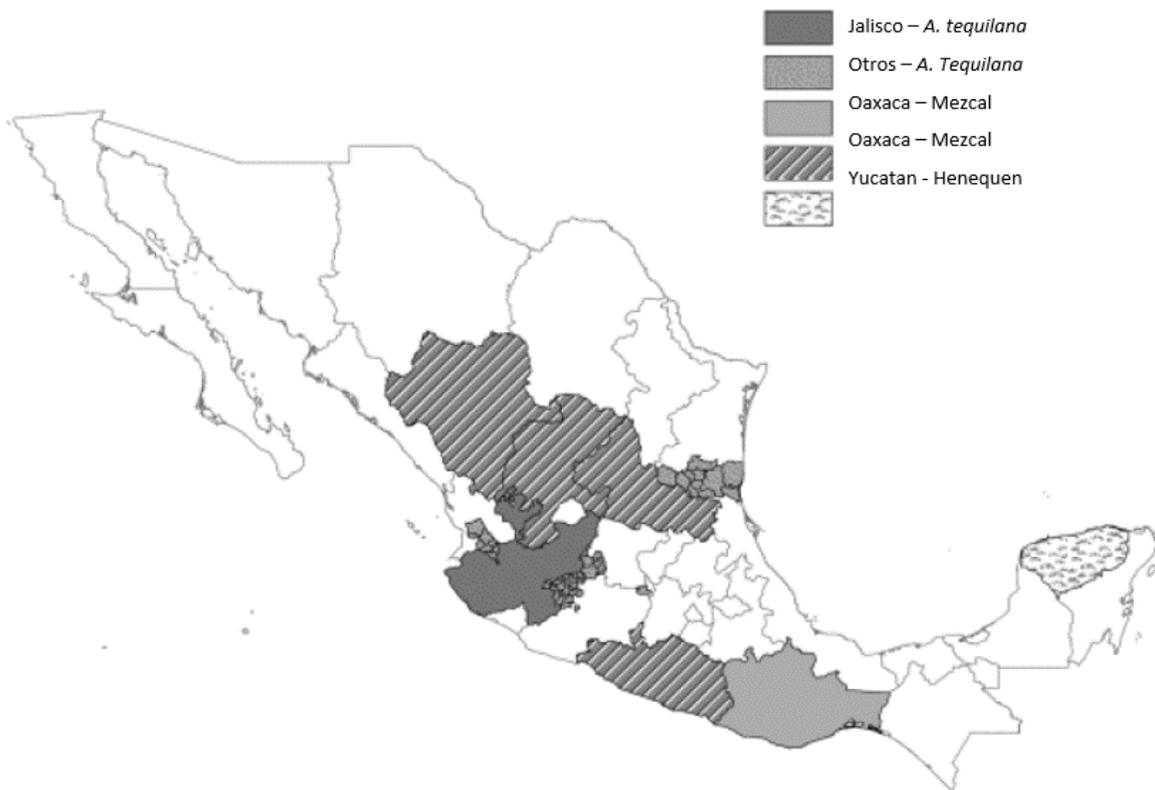
La distribución natural del género *Agave* se encuentra limitado al continente americano, con la mayor diversidad de especies en México, aunque muchas especies se han distribuido en todas las regiones tropicales y del mediterráneo para uso agrícola, y hortícola. Los usos comerciales más difundidos de las especies del agave son para la obtención de fibras y bebidas, derivadas generalmente de las hojas y del tallo, respectivamente. Entre las que se incluyen: Haití hemp (*A. foetida*), Henequén (*A. fourcroydes*), Tampico (*A. lechuguilla*), Maguey (*A. cantala*), Pita (*A. americana*), Salvador hemp (*A. letonae*) y Tequila (*A. tequilana*). Con respecto al cambio climático futuro, las especies de agave, pueden tener una ventaja sobre otros cultivos debido a que la fisiología CAM se adapta a las temperaturas extremas y a la sequía. Curiosamente, las áreas en el mundo que se han identificado como más adecuadas para plantaciones de agave como materia prima (México, Australia, y África) también son zonas donde la variación interanual de la temperatura es relativamente baja (Sun et al., 2010).

*Agave tequilana* Weber var. *azul* es una especie CAM económicamente importante cultivada en México y es la única de las especies del agave que es apropiada para la producción de la bebida alcohólica Tequila, debido a la alta concentración de inulina presente en la planta. El *Agave tequilana* Weber var *azul* se cultiva actualmente sólo en zonas muy restringidas establecidas en territorios protegidos por la denominación de origen del tequila (Fig. 2). La inulina es un polímero lineal de fructosa que se encuentra en la “cabeza” del agave en grandes cantidades. Durante la cocción de la “cabeza”, ocurre la hidrólisis de este polímero a fructosa, la cual se utiliza en la fermentación alcohólica con levaduras y su posterior destilación en tequila. Actualmente, dichas zonas incluyen municipios de los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Tamaulipas y Nayarit. El estado de Nayarit cuenta con una superficie con condiciones óptimas para agave de 20,493 ha y cerca de 3.9 millones de plantas, los cuales deben reunir características favorables para el desarrollo de la planta y cuyos productos presenten buena calidad para la industria de fabricación del tequila que constituyen el 3.6 % de la superficie potencial nacional (Ruiz-Corral, 2007).

Es importante señalar, que aunque la denominación de origen impide producir tequila fuera de esta región en los estados antes mencionados, en la actualidad se encuentra cultivado *A. tequilana* en otros estados, tales como Morelos, Sinaloa, Baja California, por mencionar algunos, además de otros países como Estados Unidos, para la producción de diversos productos como jarabe o miel de agave, textiles, aguamiel, y alcohol etílico.

Asimismo, la industria del tequila provee un modelo para la producción de biocombustibles debido a que las plantaciones de agave y fermentación inicial en una destilería son similares a lo que sería necesario para la producción de etanol como combustible.

Basados sólo en el área de tierra abandonada previamente dedicada al cultivo de agave para fibras (Davis et al., 2011), hay una oportunidad de restablecer la agricultura del agave en  $1.87 \times 10^5$  ha en México. La conversión de plantaciones abandonadas puede ser revitalizada empleando cultivos de agave lo cual resultaría en un cambio indirecto mínimo de uso de suelo a causa de la baja productividad que ocurre en esas regiones cuando se compara con otras especies cultivables como el arroz o el trigo. Oportunidades reales dentro y fuera de éstas tierras abandonadas dependen de la política local, economía, y el cambio climático. En total, las regiones semiáridas que podrían apoyar la agricultura del agave representan el 18 % de la superficie de tierra global (Hoekstra y Shachak, 1999). Tierras que son marginales, abandonadas o de baja productividad representan una de las oportunidades más apropiadas para la materia prima celulósica debido a que ésto minimizará el cambio de uso de suelo (Somerville et al., 2010).



**Fig. 2.** Distribución de los cultivos de agave predominantes en México (Davis et al., 2011).

El bagazo de agave (BAG) es una fibra residual obtenida del proceso de producción de tequila (asimismo es el subproducto de otras bebidas alcohólicas como el mezcal, bacanora, sotol y pulque) y representa el 40 % del agave procesado. La generación anual de BAG en México es de  $1.05 \times 10^8$  Kg (Davis et al., 2011). En la actualidad estos residuos son principalmente subutilizados y crean un problema de contaminación grave ya que sólo una pequeña fracción del BAG generado se utiliza para el compostaje, remediación de suelos e incineración controlada. Por lo tanto, el BAG es adecuado para la producción de etanol y otros compuestos químicos de importancia biotecnológica dándole un valor agregado al mismo.

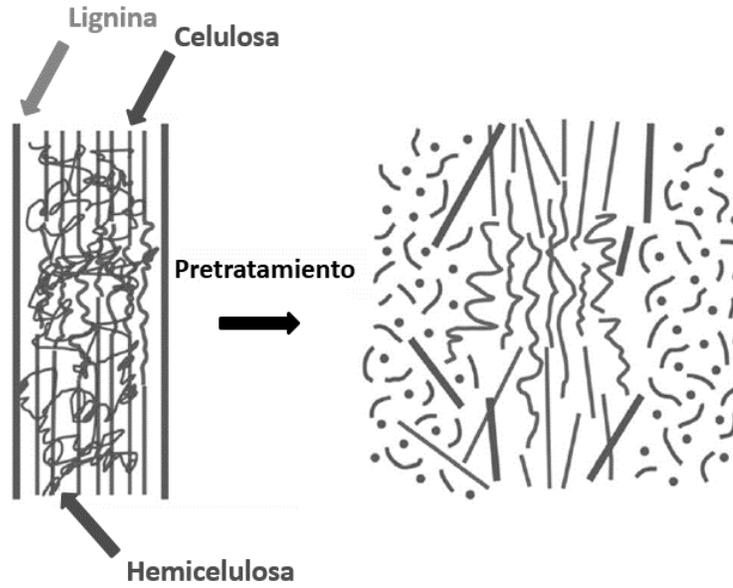
### **1.2.2.1. Oxalato de calcio en bagazo de agave**

En plantas, la presencia de oxalato de calcio es común. Miembros de más de 215 familias de plantas acumulan cristales dentro de sus tejidos. Se ha reportado que el bagazo de agave presenta concentraciones de oxalato de calcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ) más altas que la mayoría de las fuentes de materia prima actualmente utilizada para producción de biocombustibles tales como, pastos (pasto varilla o “switchgrass”), residuos agrícolas (bagazo de caña) o residuos forestales (Nobel, 1983; Nobel y Berry, 1985; Monje y Baran, 2010). Algunas plantas producen oxalato como parte de su metabolismo, las cuales incluyen a la mayoría de las plantas utilizadas para cosechas industriales, alcanzando una acumulación de oxalato en un intervalo del 3-80 % (p/p) de su peso seco. Se puede encontrar hasta 90 % del oxalato de una planta como oxalato de calcio (Nakata, 2003). Las funciones del oxalato de calcio en plantas incluyen la regulación del calcio, protección de la planta contra agentes externos, detoxificación (por ejemplo, metales pesados o ácido oxálico), equilibrio iónico y rigidez de la planta (Franceschi y Nakata, 2005). Otra propiedad interesante del oxalato de calcio es su reacción exotérmica o incompatibilidad con oxidantes fuertes tales como el peróxido de hidrógeno o el ozono los cuales son solventes empleados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Franceschi y Nakata, 2005; Banerjee et al., 2011; Travaini et al., 2013). Un tema importante que debe ser resuelto para aplicaciones en una biorefinería, es el efecto que podría tener (positivo o negativo) los altos niveles de oxalato de calcio en bagazo de agave, en el rendimiento de un proceso de pretratamiento, debido a escasa información disponible en la literatura sobre este tema.

### **1.3. Pretratamientos en biomasa lignocelulósica**

La biomasa nativa ha limitado la accesibilidad a las enzimas o a microorganismos debido a sus características estructurales, por lo tanto, un pretratamiento es un requisito esencial para hacer accesible a la biomasa al romper la barrera de lignina, removiendo la hemicelulosa, o alterar la estructura cristalina de la celulosa como se esquematiza en la Fig. 3 (Zhu et al., 2008).

Un pretratamiento efectivo debe cumplir con los siguientes requisitos: (1) mejorar la formación de azúcares o la facilidad de formar posteriormente azúcares mediante hidrólisis, (2) evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, (3) evitar la formación de subproductos que son inhibidores a los procesos posteriores de hidrólisis o fermentación, y (4) ser rentable (Kumar et al., 2009a).



**Fig. 3.** Efecto del pretratamiento en la biomasa celulósica (Mosier et al., 2005).

Varias tecnologías de pretratamiento que utilizan métodos físicos o químicos se emplean actualmente para vencer la recalcitrancia de la lignocelulosa, incrementar la eficiencia enzimática y mejorar los rendimientos de azúcares monoméricos con diferentes efectos en la biomasa lignocelulósica (Tabla 2).

Los pretratamientos fisicoquímicos incluyen la trituración (reducción mecánica del tamaño de partícula de la biomasa), la explosión de vapor, y autohidrólisis. Por otro lado, los procesos químicos se basan en la hidrólisis de la celulosa con ácidos o bases o de disolventes de celulosa en condiciones específicas de temperatura y presión como el  $H_2O_2$  alcalino, ozono, organosolventes (utilizando ácidos de Lewis,  $FeCl_3$ ,  $(Al)_2SO_4$  en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol, o etileno (Mosier et al., 2005; Taherzadeh y Karimi, 2008; Yang y Wyman, 2008).

Recientemente, ciertos líquidos iónicos han demostrado un gran potencial como solventes para la disolución de la biomasa lignocelulósica con una fácil recuperación de la celulosa con la adición de un antisolvente (Dadi et al., 2006; Singh et al., 2009). Así mismo, algunos de estos líquidos iónicos tienen atributos positivos tales como baja volatilidad, inflamabilidad, y alta estabilidad térmica, lo cual vuelve potencialmente benigno al pretratamiento con líquidos iónicos cuando se compara a los pretratamientos que emplean ácidos, bases o solventes orgánicos (Sun et al., 2009).

**Tabla 2.** Efecto de varios pretratamientos en la composición química y la estructura físico/química de la biomasa lignocelulósica (++: Efecto mayor, +: Efecto menor).

	Incrementa el área de superficie accesible	Descristaliza la celulosa	Remueve hemicelulosa	Remueve lignina	Altera la estructura de la lignina
Ácido diluido	++		++		++
Auto hidrólisis	++		++		+
Expansión de fibras con amoniaco	++	++	+	++	++
Explosión de vapor	++		++		+
Hidróxido de calcio	++		+	++	++
Líquido iónico	++	++	+	++	+

(Mosier et al., 2005).

### 1.3.1. Con líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (LI) son sales orgánicas que tienen un punto de fusión por debajo de los 100 °C. Los LI son denominados “solventes verdes” debido a su alta estabilidad térmica, no inflamables y su baja volatilidad en condiciones normales. Debido a sus excelentes propiedades físicas, tienen la habilidad de disolver tanto

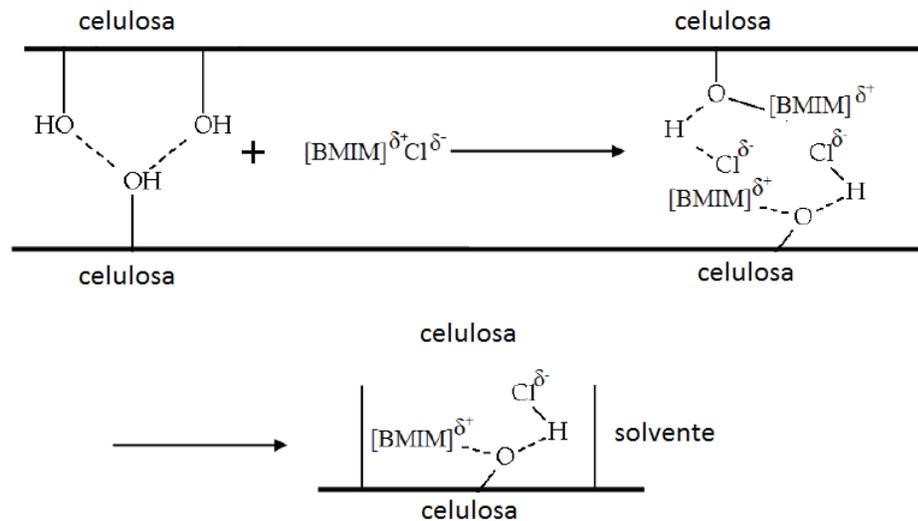
compuestos orgánicos polares y no polares e inorgánicos, como compuestos poliméricos (Singh et al., 2009,).

Se ha comprobado en diversos estudios que los LI tienen propiedades para disolver celulosa y que después de la disolución, la celulosa puede ser recuperada por adición de compuestos anti-solventes como agua o acetona (Sun et al., 2009; Tan et al., 2011). En la Fig. 4 se muestra como es el mecanismo de acción de los LI sobre la celulosa, donde se ataca directamente a los puentes de hidrógeno formado entre las cadenas de celulosa, el catión se une directamente al oxígeno y el anión se une iónicamente con el hidrógeno, disminuyendo fuertemente la unión del puente de hidrógeno que existía entre las cadenas de celulosa. El LI se mantiene ligado a la cadena de celulosa como un solvente, destruyendo así la estructura cristalina que mantenían las cadenas de celulosa.

Recientemente, varios estudios han encontrado que los líquidos iónicos conteniendo aniones cloruro, formiato, acetato o alquilofosfanato pueden disolver a la celulosa mediante la formación de fuertes enlaces de hidrógeno con una fácil recuperación de la celulosa con la adición de un anti-solvente (normalmente agua, etanol o acetona) y atributos deseables de solvente como baja volatilidad, inflamabilidad y estabilidad térmica (Singh et al., 2009; Li et al., 2011). El pretratamiento de la lignocelulosa que utiliza LI como disolventes de celulosa, ofrece varias características atractivas en comparación con los métodos convencionales.

Los líquidos iónicos a temperatura ambiente son sales orgánicas que se encuentran en un estado líquido a temperatura ambiente y son estables hasta temperaturas de aproximadamente 300 °C (Dadi et al., 2006; Li et al., 2010). Asimismo, los LI pueden ser reutilizados después del pretratamiento para tratar nuevamente a la biomasa lignocelulósica mejorando el rendimiento de la hidrólisis enzimática obteniendo una eficaz recuperación de azúcares fermentables como la glucosa y la xilosa (Swatloski et al., 2002; Nguyen et al., 2010). Con el fin de que los LI puedan considerarse en un pretratamiento para biomasa efectivos y viables comercialmente, tres condiciones principales deben cumplirse: (1) la solubilización de la biomasa lignocelulósica (hasta 30 % en peso); (2) la recuperación del disolvente y su reciclaje, y (3) la mínima

generación de subproductos de inhibición que podrían volver inactivas a las enzimas celulíticas y a los microorganismos fermentativos (Arora et al., 2010).



**Fig. 4.** Mecanismo de acción de los líquidos iónicos sobre las cadenas de celulosa durante el pretratamiento de biomasa celulósica (Feng y Cheng 2008).

Recientemente se ha demostrado que el acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio ([Emim]OAc) puede ser usado para pretratar efectivamente al pasto de crecimiento acelerado, o pasto varilla (switchgrass), removiendo una cantidad significativa de lignina de la biomasa celulósica y generar un producto que pueda ser digerido eficientemente por las enzimas (Singh et al., 2009; Li et al., 2010).

Otros informes recientes han mostrado una completa disolución y una delignificación parcial de bagazo de caña, rastrojo de maíz, paja de trigo, maderas suaves y duras, en varios LI en condiciones de proceso diferentes (Zhu et al., 2008; Li et al., 2011; Sun et al., 2009; Li et al., 2011).

### 1.3.2. Con ácidos

El pretratamiento con ácidos en materiales lignocelulósicos es uno de los métodos de pretratamiento más investigados y mejor documentados. Una amplia variedad de biomasa ha sido tratada con ácidos, tales como el sulfúrico, nítrico, clorhídrico y

fosfórico, siendo el sulfúrico el más común. El enfoque más utilizado denominado hidrólisis ácida diluida ha sido ampliamente estudiado y se considera como uno de los métodos de hidrólisis con mejor potencial para su aplicación a gran escala.

Emplea ácido diluido (0.3-2 %) y temperaturas altas (120-220 °C), con tiempos variables de tratamiento (desde minutos hasta una hora). Se puede usar como pretratamiento porque remueve principalmente la hemicelulosa, produciendo azúcares monoméricos en un grado elevado. La remoción completa de la hemicelulosa de los sólidos también es posible para incrementar la accesibilidad de la celulosa a las enzimas, o como un método para sacarificación directa. Este último se lleva a cabo a altas temperaturas, debido a que la hidrólisis de la celulosa es favorecida (Torget et al., 1991).

En la hidrólisis ácida la lignina no es removida significativamente. Aunque una parte de ella es solubilizada, pero se recondensa formando un polímero alterado de lignina. Aun así, la desorganización y redistribución de la lignina debilita a la matriz carbohidratos-lignina, incrementando el área de superficie accesible de la celulosa. Los efectos en la cristalinidad de la celulosa son variables, ésto es debido, a que por un lado, los tratamientos químicos remueven a la lignina amorfa y a los componentes de la hemicelulosa, incrementando la cristalinidad de la celulosa.

Por otra parte, los ácidos liberan a la estructura cristalina altamente compacta por medio del hinchamiento, y por lo tanto disminuyendo a la cristalinidad.

Asimismo, los cambios en la cristalinidad de la biomasa es dependiente sobre cuál de los dos efectos es predominante (Yang y Wyman, 2004). En términos generales, el pretratamiento con hidrólisis ácida diluida puede ser llevado a cabo ya sea en tiempos de retención cortos (por ejemplo, 5 min) a temperaturas elevadas (por ejemplo, 120 °C) o en tiempos de retención relativamente largos (por ejemplo, 30-90 min) a temperaturas bajas (por ejemplo, 120 °C) (Taherzadeh y Karimi, 2008).

Sin embargo, la mayor desventaja del pretratamiento con ácidos diluidos es la formación de inhibidores de crecimiento microbiano como el ácido acético o el furfural que se presentan cuando los azúcares producidos por el pretratamiento se degradan en estos subproductos (Mosier et al., 2005).

### **1.3.3. Con álcalis**

Los materiales lignocelulósicos también pueden ser tratados con soluciones alcalinas, tales como hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) o amoníaco (NH<sub>4</sub>OH) (da Costa et al., 2009). El mecanismo del tratamiento alcalino es la saponificación de los enlaces intermoleculares esteres entrelazados de la hemicelulosa y la lignina. El efecto de tales soluciones alcalinas depende del contenido de lignina de la biomasa resultando en una remoción de lignina, interrupción de los enlaces estructurales conduciéndolas a un incremento en la porosidad causando un hinchamiento en la biomasa, reducción de la cristalinidad de la celulosa y una disminución en el grado de polimerización de los carbohidratos (Xu et al., 2010).

El pretratamiento alcalino es llevado a cabo a temperaturas relativamente bajas pero los tiempos de retención suelen incrementarse en comparación con otras tecnologías de pretratamientos como el ácido.

El pretratamiento alcalino causa una menor degradación de azúcares y muchas de las sales causticas pueden ser recuperadas y/o regeneradas, sin embargo algo del álcali es convertida a sales irre recuperables o incorporadas como sales a la biomasa por las reacciones de pretratamiento (Kumar et al., 2009a).

### **1.3.4. Con peróxido de hidrógeno alcalino**

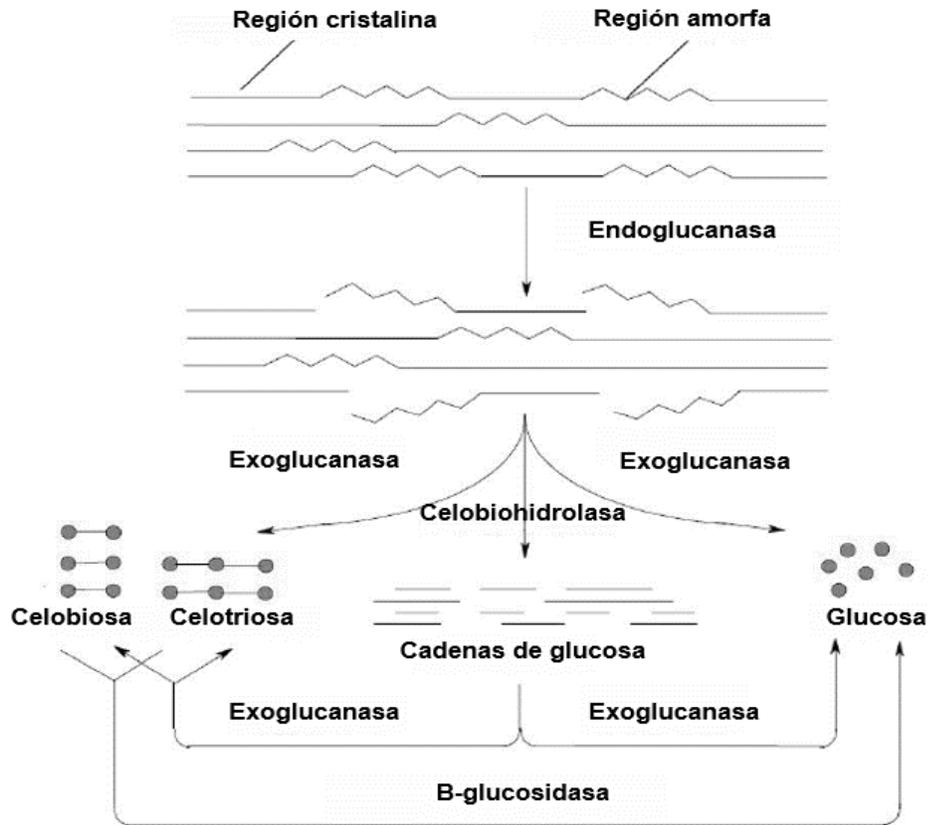
El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino, también conocido como deslignificación oxidativa, remueve lignina bajo condiciones alcalinas en la presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El peróxido de hidrógeno es disociado de su especie altamente reactiva al oxígeno: superóxidos y radicales hidroxilo, los cuales exhiben una acción oxidativa que promueve la despolimerización de la lignina al atacar a las cadenas laterales de la lignina y fragmentando a la macroestructura de la lignina en un número de componentes de bajo peso molecular (Selig et al., 2009).

#### 1.4. Hidrólisis

La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada mediante enzimas conocidas como celulasas que poseen una alta especificidad. Bacterias y hongos son capaces de producir celulasas. Estos microorganismos pueden actuar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Algunos ejemplos son las bacterias de los géneros *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces*. Sin embargo las celulasas comerciales están centradas en hongos como *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (Sun y Cheng, 2002). Los productos de la hidrólisis son en su mayoría azúcares reductores que pueden ser fermentadas por levaduras o bacterias a etanol.

Las condiciones de la hidrólisis enzimática son suaves (pH 4- 8 y temperatura entre 45-50 °C) (Ballesteros et al., 2008) y no posee el problema de la corrosión. Al menos tres grupos de celulasas están involucradas en el proceso de hidrólisis y su acción se presenta en la Fig. 5:

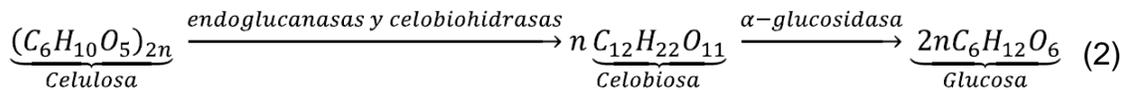
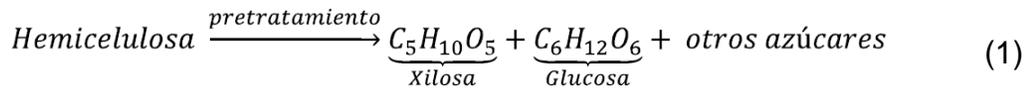
- (1) Endoglucanasas: éstas atacan las regiones internas de baja cristalinidad en las fibras de celulosa, creando cadenas libres.
- (2) Exoglucanasas o celobiohidrasas: degradan las moléculas por la eliminación de unidades de celobiosa desde los extremos de las cadenas.
- (3)  $\beta$ -glucosidasas: hidrolizan celobiosa para producir glucosa.



**Fig. 5.** Mecanismo de acción de las celulasas (Nidetzky y Steiner 1993).

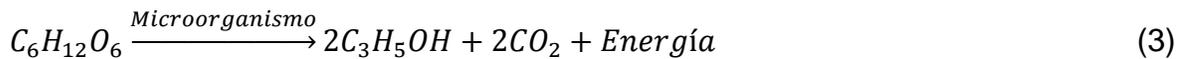
Además de estos tres grupos principales de celulasas, existen otras enzimas que atacan la hemicelulosa como las glucoronidasas, acetilsterasas, xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, galactomanasas y glucomanasas.

El proceso se puede presentar en las siguientes ecuaciones:



### 1.5. Fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso generador de energía en el cual componentes orgánicos actúan como ambos aceptores y donadores de electrones, esto es, un proceso anaeróbico donde la energía es producida sin la participación de oxígeno u otros aceptores de electrones (Stanbury, 2009). La fermentación alcohólica, es aquella donde un microorganismos en ausencia de oxígeno transforma la glucosa en etanol y CO<sub>2</sub>, obteniendo energía para llevar a cabo el metabolismo. La ecuación 3 representa la estequiometria de la fermentación alcohólica.



Varias bacterias, levaduras y hongos se han empleado en la producción de etanol (Dien et al., 1998; Skoog y Hahn-Hägerdal, 1988). El microorganismo más comúnmente empleado para la producción de etanol es *Saccharomyces cerevisiae* el cual puede producir etanol para dar una concentración tan alta como el 18 % del licor de fermentación, además ha sido probado ser bastante robusto y menos sensible a los inhibidores (Lin y Tanaka, 2006).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La lignocelulosa representa una fuente importante y sustentable de biomasa para su transformación en biocombustibles y productos de base biológica. Ciertos líquidos iónicos (LI) han sido reconocidos como solventes eficientes para el pretratamiento de la biomasa lignocelulosica. La celulosa presente en la pared celular secundaria puede ser precipitada con un antisolvente, tales como agua o etanol, y ser hidrolizada a glucosa empleando celulasas. El bagazo de Agave (BAG) genera una elevada cantidad de residuo, el cual es principalmente subutilizado y plantea un problema de contaminación grave. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone que el BAG es adecuado para la producción de etanol y otros compuestos químicos de importancia biotecnológica al tener un contenido relativamente bajo de lignina y altas reservas de carbohidratos.

### **3. HIPÓTESIS**

#### **3.1. Hipótesis general**

El pretratamiento del bagazo de agave con líquidos iónicos, resultará en su alta deslignificación incrementando la producción de azúcares y una mayor producción de etanol.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el pretratamiento con líquidos iónicos en bagazo de agave para incrementar la producción de azúcares, y la capacidad de su fermentación en etanol.

### **4.2. Objetivos particulares**

OP1: Determinar los cambios químicos a nivel molecular del bagazo de agave antes y después del pretratamiento con líquidos iónicos, mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

OP2: Evaluar la cristalinidad de las muestras sin tratar y pretratadas con líquidos iónicos mediante difracción de rayos X (DRX).

OP3: Determinar el efecto del oxalato de calcio sobre el rendimiento del pretratamiento con líquidos iónicos y con peróxido de hidrógeno alcalino.

OP4: Comparar sistemas enzimáticos para la producción de azúcares empleando bagazo de agave sin tratar y pretratados con líquidos iónicos, usando diferentes fuentes de enzimas.

OP5: Evaluar la capacidad del sacarificado del material pretratado con líquidos iónicos, como sustrato para su fermentación en etanol.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial de  $2^4$  con tres replicas más controles para determinar el efecto del oxalato de calcio en la producción de azúcares durante la hidrólisis enzimática. Se evaluaron cuatro condiciones de pretratamiento denominadas: peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) usando dos concentraciones (PHA-A = 0.125 g  $H_2O_2$ /g biomasa y PHA-B = 0.5 g  $H_2O_2$ /g biomasa) y líquidos iónicos (LI [Bmim]Cl) usando dos temperaturas (LI-120 °C y LI-160 °C). Además, se emplearon dos materiales distintos con diferentes concentraciones de oxalato de calcio en las muestras de bagazo de agave. Por un lado, se denominó BAG (bagazo de agave sin ninguna manipulación con un elevado contenido natural de oxalato de calcio) y BEX (bagazo de agave que fue sometido a un proceso de extracción para remover al oxalato de calcio). Se usaron como controles a BAG y BEX sin tratar. Las variables de respuesta evaluadas fueron: delignificación, cristalinidad y producción de azúcares.

A continuación, se realizó un diseño factorial de  $2^3$  con tres replicas más controles para determinar la capacidad de tres pretratamientos en incrementar la producción de azúcares usando al BAG, y la capacidad de los sacarificados en fermentarse en etanol. Se evaluaron tres condiciones de pretratamiento denominadas: hidrólisis alcalina (AL) usando dos concentraciones (1 y 2%), hidrólisis ácida diluida (HA) usando dos concentraciones (1 y 2%) y líquidos iónicos (LI-[Emim]OAc) usando dos temperaturas (LI-120 °C y LI-160 °C). Se usaron como controles a BAG y BEX sin tratar. Las variables de respuesta evaluadas fueron: producción de azúcares y rendimiento de celulosa a etanol ( $R_{E/C}$ ).

### 5.2. Materiales y preparación

El bagazo de agave *tequilana Weber* variedad azul, fue donado por Destilería Rubio, (Tequila, Jalisco, México). Se lavó con abundante agua destilada, secado hasta una humedad menor al 10 %.

Finalmente se redujo su tamaño de partícula con una malla 40 en un molino de cuchillas (Thomas-Wiley Mini, Modelo 3383-L10 Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA). Las muestras se almacenaron a 4 °C para su uso en todos los experimentos.

Para la hidrólisis enzimática se emplearon celulasas de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L) y  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novozyme 188) que fueron adquiridas de Novozymes (Davis, CA).

Los líquidos iónicos, cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolio ([Bmim]Cl), acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio ([Emim]OAc), ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), extracto de levadura, peptona, glucosa, xilosa, peróxido de hidrógeno, ácido cítrico e hidróxido de sodio fueron adquiridos de Sigma–Aldrich. La catalasa fue adquirida de Merck.

### **5.3. Métodos analíticos y procedimientos**

#### **5.3.1. Extracción de oxalato de calcio**

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocó 1 g de BAG y se adicionaron 50 mL de HCl 2 N, la mezcla se incubó a 80 °C durante 30 min en un baño con agitación. Los extractos se diluyeron con 50 mL de agua desionizada y se transfirieron a tubos apropiados para su centrifugación a 4200 rpm por 10 min (Al-Wahsh et al., 2012).

Los sobrenadantes se filtraron a través de papel filtro Whatman #1, y la biomasa recuperada se secó al vacío a 45 °C durante 48 h antes del análisis composicional. A esta muestra se le denominó bagazo extraído (BEX) la cual se empleó en los pretratamientos junto con BAG.

### **5.4. Procesos de pretratamiento de biomasa**

#### **5.4.1. Con el líquido iónico (LI) [Bmim]Cl en viales**

En un vial de 25 mL para autoclave, se mezcló 300 mg de biomasa molida con 9.7 g de [Bmim]Cl. Los viales y su contenido se calentaron a 120 °C y 160 °C durante 3 h en un horno (Binder KBF 115, Binder GmbH, Tuttlingen, Alemania) (Li et al., 2011).

Después de 3 h de incubación, 20 mL de agua desionizada se añadieron lentamente hacia la suspensión biomasa/[Bmim]Cl para recuperar la celulosa disuelta. Inmediatamente se formó un precipitado, y la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 min. El sobrenadante conteniendo al LI fue removido, y el precipitado se lavó cinco veces con agua desionizada el fin de asegurar que el exceso de LI se había removido y que un sobrenadante incoloro se obtuvo para asegurar un lavado completo de biomasa regenerada. El producto recuperado se secó al vacío a 45 °C durante 48 h antes del análisis composicional. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **5.4.2. Con líquidos iónicos en reactores tipo globo**

Una suspensión con una carga de 10 % (p/p) se preparó combinando 1g de biomasa molida con 9 g de [Emim]OAc en un matraz tipo globo (Syrris). El reactor y su contenido se calentaron empleando un baño con aceite de inmersión (Heidolph) a 120 y 160 °C durante 3 h con una agitación constante de 15 rpm. Después de 3 h de incubación, se añadieron lentamente 20 mL de agua desionizada hacia la suspensión biomasa/[Emim]OAc para recuperar la celulosa disuelta. Inmediatamente se formó un precipitado, y la muestra se centrifugo a 10,000g durante 25 min. El sobrenadante conteniendo al LI fue removido, y el precipitado se lavó cinco veces con agua con el fin de asegurar que el exceso de LI se había removido y que un sobrenadante incoloro se obtuvo para asegurar un lavado completo de biomasa regenerada. El producto recuperado se secó al vacío a 45 °C durante 48 h antes del análisis composicional. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **5.4.3. Con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA)**

Una dilución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de una solución comercial al 30 %, (Sigma Aldrich Grado Reactivo ACS) fue ajustado a pH 11.5 (± 0.2) con NaOH 5 M y se mezcló con la biomasa. Una cantidad fija de biomasa (1 g) se añadió a una cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más NaOH 5M para cada tratamiento y una cantidad variable de agua para dar la carga final de biomasa deseada (Tabla 3).

Se emplearon dos concentraciones diferentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> denominados PHA-A en 0.125 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa y PHA-B en 0.5 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa utilizando una carga de biomasa del 10 % p/v (Banerjee et al., 2011).

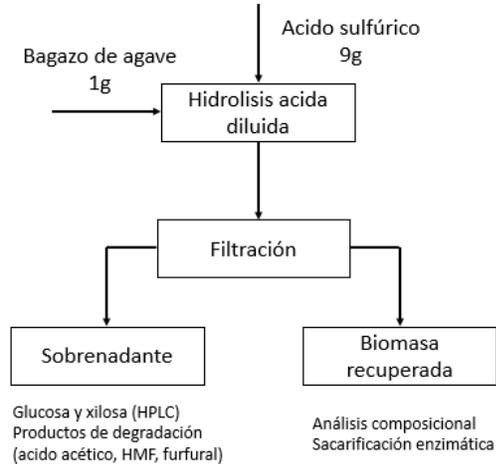
Todos los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL a 23 °C con una agitación de 90 rpm durante 48 h. Después del pretratamiento PHA, las suspensiones fueron neutralizadas a pH 7 con HCl concentrado, y tratado con catalasa durante 15 min para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual, calentado a 90 °C durante 15 min para inactivar la catalasa, y secado en un horno de vacío para su análisis composicional.

**Tabla 3.** Condiciones experimentales del pretratamiento PHA.

Sustrato (g)	Carga nominal de biomasa (%)	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Nominal g [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] /g biomasa	NaOH 5 M (mL)	Agua (mL)	Volumen final (mL)	NaOH Final (M)
1	10	0.42	0.125	0.5	9.1	10.0	0.25
1	10	1.66	0.5	2.0	6.3	10.0	1.0

#### 5.4.4. Con hidrólisis ácida diluida (HA)

La biomasa molida se pretrató empleando una carga de sólidos del 10 % (p/p) y 1 y 2 % (p/p) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 130 °C y 20 psi (autoclave, Yamato SM510) durante 30 min. Después de la HA, el hidrolizado se separó por centrifugación. El sobrenadante se le ajustó a pH 7 con NaOH para su análisis de azúcares y productos de degradación por HPLC. El BAG recuperado se lavó con agua destilada antes de la hidrólisis enzimática (Fig. 6). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



**Fig. 6.** Descripción del proceso de hidrólisis ácida.

#### 5.4.5. Con hidrólisis alcalina (AL)

Empleando una carga de sólidos del 10 % (p/p) se pretrató biomasa molida a 121 °C en una autoclave (Yamato SM510), dos concentraciones de NaOH (1 y 2 %) durante 30 min (Xu et al., 2010). La biomasa pretratada se recuperó por filtración y se lavó con agua destilada para remover el exceso de álcali y subproductos que podrían inhibir a las enzimas en la hidrólisis subsecuente. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

### 5.5. Caracterización química

#### 5.5.1. Contenido de humedad

La humedad de las muestras de biomasa se determinó colocando 0.5 g del material en charolas de aluminio a peso constante en un horno a 105 °C durante 10 min. Posteriormente se pesó el material hasta 0.1mg de exactitud y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Humedad (\%) = 100 - \left( \frac{(\text{Peso muestra seca} + \text{charola} - \text{Peso de charola})}{\text{Peso de muestra inicial}} * 100 \right) \quad (4)$$

Además, se puede calcular el peso seco de la biomasa, mediante la siguiente ecuación:

$$Peso\ seco\ (\%) = \left( \frac{(Peso\ muestra\ seca + charola - Peso\ de\ charola)}{Peso\ de\ muestra\ inicial} \right) * 100 \quad (5)$$

### 5.5.2. Contenido de celulosa y hemicelulosa

Se determinó el contenido de celulosa y hemicelulosa de las muestras de biomasa (BAG y BEX) antes y después de todos los pretratamientos con una hidrólisis ácida en dos pasos de acuerdo al procedimiento analítico del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, USA) (Sluiter et al., 2008a, b).

Se utilizaron muestras de biomasa para hidrolizarlas con ácido sulfúrico al 72 % a 30 °C durante 1 h (300 mg de muestra y 3 ml de ácido sulfúrico). El ácido se diluyó a una concentración final de 3 % (suma de 79 ml de agua), y la mezcla se calentó a 121 °C durante 1 h. Posteriormente, al dejar enfriar durante 30 min se filtró a través de filtros de microfibras de vidrio, separando la fracción sólida y líquida. De esta última se tomaron 5 mL para medir la concentración de glucosa y xilosa.

El cambio relativo en porcentaje de cada componente estructural (celulosa, hemicelulosa o lignina) de cada pretratamiento se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Cambio\ relativo\ (\%) = \frac{CI - CF}{CF} * 100 \quad (6)$$

Donde:

CI = Componente estructural al inicio (celulosa ó hemicelulosa)

CF = Componente estructural al final (celulosa ó hemicelulosa)

### 5.5.3. Contenido de lignina insoluble y soluble en ácido

El sólido restante después de la hidrólisis de dos pasos obtenida de la sección 5.4.2. se secó durante la noche hasta peso constante y se colocó en un horno a 550 °C durante 4 h para determinar el contenido de cenizas las cuales son diferentes del contenido de cenizas total. El contenido de lignina insoluble en ácido (LIA) se corrigió después con el contenido de cenizas y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$LIA\ (\%) = \frac{(Peso_{crisol+muestra\ seca} - Peso_{crisol}) - (Peso_{crisol+ceniza} - Peso_{crisol})}{Peso_{muestra\ seca}} * 100 \quad (7)$$

El contenido de lignina soluble en ácido (LSA) se determinó utilizando la fracción líquida obtenida en la sección 5.4.2., midiendo su absorbancia a 280 nm y se calculó utilizando un coeficiente de extinción promedio ( $\epsilon$ ) de  $17.75 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para las muestras (Fukushima and Hatfield, 2004) mediante la siguiente ecuación.

$$LSA (\%) = \frac{UV_{abs} * Volumen_{filtrado} * Dilucion}{\epsilon * Peso_{seco} muestra} * 100 \quad (8)$$

Donde:

$UV_{abs}$  = promedio de la absorbancia para la muestra a 280nm

Volumen licor hidrólisis = volumen del filtrado, 58 mL

Asimismo, el grado de deslignificación de cada pretratamiento se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Deslignificación (\%) = \frac{LI-LR}{LI} * 100 \quad (9)$$

Donde:

LI = Lignina inicial (suma del contenido de lignina insoluble y soluble en ácido)

LR = Lignina removida durante el pretratamiento

#### 5.5.4. Contenido de cenizas

El contenido de cenizas de las muestras se calculó calcinando, en una mufla a 550 °C, 0.5 g de biomasa en peso seco en crisoles de cerámica secos y previamente puestos a pesos constante. Se calculó el contenido de cenizas mediante la siguiente ecuación:

$$Cenizas (\%) = \left( \frac{(Peso_{crisol+cenizas} - Peso_{crisol})}{Peso_{seco} de muestra} * 100 \right) \quad (10)$$

#### 5.5.5. Medición de cristalinidad

Patrones de difracción de rayos X (DRX) de polvos de las muestras de BAG y BEX antes y después del pretratamiento se obtuvieron con un difractómetro Bruker AXS D8 Advanced equipado con un detector LYNXEYE XE y operado a 30 kV y 30 mA usando radiación Cu- $K\alpha$ .

Muestras de las tres réplicas se mezclaron para el análisis de DRX. Las muestras se empastillaron con una prensa hidráulica Crush IR – digital y se pegaron en un portaobjetos para microscopio. Los patrones fueron recogidos en el intervalo de  $2\theta$  de 5 a  $65^\circ$ , el incremento fue de  $0.0167^\circ$ , la velocidad de giro de 15 rpm y el tiempo de exposición fue 35 min. El índice de cristalinidad (ICr) de la biomasa se determinó a partir de los datos de DRX y calculado con el paquete computacional HighScore Plus. Para realizar una comparación apropiada entre los ICr de la biomasa sin tratar y pretratada, se empleó la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de cambio relativo de la cristalinidad (CRC) donde los números positivos indican reducción:

$$CRC (\%) = \frac{CBS - CPR}{CBS} * 100 \quad (11)$$

Donde:

CBS = Cristalinidad de la biomasa sin tratar

CPR = Cristalinidad de la biomasa pretratada

#### **5.5.6. Espectroscopía ATR-FTIR**

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con un sistema de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) se llevó a cabo mediante un sistema Bruker Optics Vertex con una función de diamantes de germanio con reflexión simple de cristal total atenuada. Las muestras de BAG y BEX antes y después del pretratamiento fueron presionadas uniformemente contra la superficie del diamante utilizando un yunque cargado con resorte. Espectros de las muestras se obtuvieron en triplicado utilizando un promedio de 128 exploraciones en el intervalo entre  $500 \text{ cm}^{-1}$  y  $2000 \text{ cm}^{-1}$  con una resolución espectral de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Aire, agua y solución de líquido iónico se utilizó como fondo para las muestras de biomasa sin tratar y pretratadas, respectivamente.

Una corrección de línea base se realizó utilizando el método de corrección elástica siguiendo el mínimo del espectro (Singh et al., 2009).

Además, se evaluó el cambio relativo en el bagazo de agave en función de los pretratamientos, mediante la siguiente ecuación donde los números positivos indican reducción:

$$\text{Cambio relativo (\%)} = \frac{ISS - CISP}{ISS} * 100 \quad (12)$$

Donde:

ISS = Intensidad de los sólidos sin tratar

ISP = Intensidad de los sólidos pretratados

### **5.5.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las morfologías del bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído sin tratar se analizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (MEB) con un equipo JEOL JSM-7600F. Antes de la adquisición de imágenes, la muestras se montaron en cinta adhesiva de dos caras para después colocarse en bases de latón para muestras y se recubrieron con aproximadamente 20 nm de oro utilizando un sistema de vaporización catódica. Para evitar cambios en la estática del material, las muestras se almacenaron en un desecador hasta su análisis. Las imágenes representativas se adquirieron con un voltaje de aceleración de 7.5 kV and 10 KV para BAG y BEX, respectivamente.

### **5.5.8. Sacarificación enzimática**

Se empleó amortiguador de citrato 50 mM (pH 4.8) a 55 °C, 150 rpm durante 72 h para llevar a cabo la sacarificación enzimática por lotes. La carga de enzima se normalizo al contenido de celulosa de las muestras de biomasa para entender el impacto de los pretratamientos (LI [Bmim]Cl y PHA) empleando 5 g celulosa/L, mientras que el BAG pretratado con AL, HA y LI [Emim]OAc utilizaron 20 g celulosa/L. La Tabla 4 presenta los experimentos independientes utilizando las muestras pretratadas y las enzimas Celluclast 1.5L y Novozyme 188 a 30 FPU/g celulosa y 60 CBU/g celulosa, respectivamente.

**Tabla 4.** Muestra de bagazo de agave pretratadas empleadas en la sacarificación enzimática.

<b>Biomasa</b>	<b>Pretratamiento</b>
Bagazo de agave (BAG) y bagazo extraído (BEX)	Peróxido de hidrógeno alcalino (PHA-A y PHA-B) y con el líquido iónico [Bmim]Cl (120 °C y 160 °C).
Bagazo de agave (BAG)	Líquido iónico [Emim]OAc a 120 °C y 160 °C.
Bagazo de agave (BAG)	Hidrólisis alcalina con carga de sólidos del 3, 6, 9, 12 y 15 %.
Bagazo de agave (BAG)	Hidrólisis alcalina (1 y 2 %), hidrólisis ácida (1 y 2 %) y con el líquido iónico [Emim]OAc (120 °C y 160 °C)

Asimismo, se realizaron sacarificaciones enzimáticas por lotes de muestras sin tratar y pretratadas con el líquido iónico [Emim]OAc de BAG a 55 °C, 150 rpm en 50mM amortiguador citrato (pH de 4.8). Se normalizó de igual manera al contenido de celulosa de las muestras de biomasa para entender el impacto de los pretratamientos al contenido de celulosa total. Los controles de BAG sin tratar en todos los casos se llevaron a cabo simultáneamente con las muestras pretratadas. Las reacciones de sacarificación se siguieron al tomar una muestra de 100 µL del sobrenadante a 0, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48 y 72 h. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min. Se determinó selectivamente azúcares reductores por el ensayo DNS, además de glucosa y xilosa por HPLC.

El porcentaje de conversión de la porción de celulosa y hemicelulosa se calcularon como sigue,

$$\text{Conversión de celulosa (\%)} = \frac{\text{Conc glucosa (g/mL)} \times \text{vol reacción (mL)}}{\text{biomasa (g)} \times \% \text{ peso de celulosa en biomasa}}$$

$$x \frac{162 (PM \text{ unidad celulosa})}{180 (PM \text{ unidad de glucosa})} x 100 \quad (13)$$

*Conversión de hemicelulosa (%)*

$$= \frac{\text{Conc xilosa } (g/mL) x \text{ vol reacción (mL)}}{\text{biomasa (g)} x \% \text{ peso de hemicelulosa en biomasa}} x \frac{132 (PM \text{ unidad hemicelulosa})}{150 (PM \text{ unidad de xilosa})} x 100 \quad (14)$$

basados en la diferencia del peso molecular entre la celulosa y hemicelulosa del bagazo de agave, respectivamente.

### **5.5.9. Determinación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores liberados se midieron mediante el ensayo DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico). Soluciones acuosas de glucosa (0-10 g/L) se utilizaron como estándares (Miller, 1959). Se diluyó la muestra 1:10, posteriormente se tomaron 50 µL adicionando 450 µL de agua destilada y 1.5 mL de DNS, la mezcla se calentó durante 5 minutos en baño María, se enfrió en un baño de agua. Se adicionaron 3 mL de agua destilada y se leyó a 550 nm de absorbancia.

### **5.5.10. Glucosa y xilosa**

Las concentraciones de glucosa y xilosa en la fracción soluble se determinó empleando un sistema de HPLC con una columna Agilent Hi-Plex H y un detector de índice de difracción utilizando como fase móvil 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y un flujo de 0.5 mL/min con un volumen de inyección de 20 µL. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min, y soluciones de glucosa y xilosa (0-5 g/L) se utilizaron como estándares. Todos los ensayos se realizaron en triplicado.

### **5.5.11. Determinación de productos de degradación en la hidrólisis ácida**

Las concentraciones de los productos de degradación producidos durante el pretratamiento HA se determinaron empleando un sistema de HPLC con una columna Agilent Hi-Plex H y un detector de índice de difracción utilizando como fase móvil 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y un flujo de 0.5 mL/min con un volumen de inyección de 20 µL.

Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min, se ajustó el pH a 6 y soluciones de ácido acético, HMF y furfural (0-2 g/L) se utilizaron como estándares.

#### **5.5.12. Fermentación alcohólica**

La fermentación de los hidrolizados enzimáticos se realizó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CDBB-L-331). El inóculo se preparó al transferir una asada de una placa de cultivo en 50 mL de medio YPD al 2 %. Las células se crecieron a 37 °C hasta que se midieron 10 unidades ópticas a 600 nm contra una curva de peso seco. La biomasa se separó por centrifugación, se lavó una vez, y se suspendió en 2 mL de agua estéril. Esta suspensión se utilizó para inocular los hidrolizados con 0.4 g biomasa/mL sin cambios significativos en el volumen del cultivo (Caspeta et al., 2014). Las fermentaciones se llevaron a cabo a 37 °C con la adición de nutrimentos (extracto de levadura 1 % y peptona 2 %) pero sin ajuste de pH. Se emplearon los sacarificados obtenidos del BAG pretratado con AL, HA y LI [Emim][OAc] que emplearon una carga normalizada de 20 g celulosa/L. La concentración de etanol se expresó en g/L.

#### **5.5.13. Determinación de etanol**

El etanol se determinó empleando un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con una columna Agilent Hi-Plex H, un detector de índice de refracción utilizando como fase móvil 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y un flujo de 0.5 mL/min con un volumen de inyección de 20 µL (Sluiter et al., 2006). Soluciones de etanol en agua (0-5 g/L) se utilizaron como estándares.

#### **5.5.14. Análisis estadístico**

El programa Design-Expert 7.1.5 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) fue utilizado para realizar el análisis de varianza (ANDEVA) de los resultados experimentales. Un nivel de probabilidad del 5 % ( $p = 0.05$ ) se utilizó para aceptar o rechazar la hipótesis nula sobre la significancia de las diferencias de los resultados. La prueba de rango múltiple de Duncan en un nivel del 5 % se utilizó para analizar la significancia del grado de deslignificación de los materiales pretratados.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Composición del bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX)

Para la obtención de BEX se realizó un proceso de extracción de oxalato de calcio empleando HCl para remover la mayor cantidad posible del BAG. De este tratamiento, se obtuvo un rendimiento de biomasa recuperada cercano al ~80 % (79.1±1.15 g) lavándola apropiadamente con agua destilada y secándola hasta una humedad menor al 10 % para los experimentos con pretratamientos.

Se comparó la composición química del BAG y BEX encontrando que la composición química del BAG sin extraer es consistente con los reportados para otros bagazos de agave similares (lignina-19.6 %, hemicelulosa-21.3 % y celulosa-40.6 %) (Davis et al., 2011) mientras que el BEX presentó en porcentaje, valores similares a BAG para lignina; se redujo su contenido de hemicelulosa (14.8 %) y se enriqueció el de celulosa (46.6 %) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Análisis composicional de bagazo de agave y bagazo de agave extraído sin tratar.

Sustrato	Biomasa recuperada (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina total <sup>a</sup> (%)	Lignina soluble en ácido (%)	Lignina insoluble en ácido (%)	Cenizas (%)
<b>BAG</b>	100±0.0 (100 g)	40.5±0.5 (40.5 g)	21.3±0.4 (21.3 g)	19.6±0.4 (19.6 g)	3.6±0.3 (3.6 g)	16.0±0.6 (16.0 g)	6.4±0.2 (6.4 g)
<b>BEX</b>	79.1±1.1 (79.1 g)	46.6±0.5 (36.9 g)	14.8±0.1 (11.7 g)	19.3±0.3 (15.3 g)	4.1±0.1 (3.2 g)	15.2±1.4 (12.0 g)	2.8±0.6 (2.2 g)

<sup>a</sup>Lignina total = lignina soluble en ácido + lignina insoluble en ácido

La extracción del oxalato de calcio en BEX resultó en una modificación relativa de sus constituyentes, reflejándose mayormente en un menor contenido final de hemicelulosa de 11.7 g contra 21.3 g en BAG. Lo anterior fue debido al proceso de extracción ácida con HCl, la cual solubiliza a la hemicelulosa y por lo tanto, desorganiza al material lignocelulósico estructurado mediante enlaces covalentes e hidrógeno, además de fuerzas de Van der Waals (Li et al., 2010).

El contenido de lignina total también se vio afectado por el procedimiento de extracción, pasando de un contenido de 19.6 g para BAG a 15.3 g en BEX. Asimismo, el contenido de cenizas presenta una diferencia notable de 6.4 g a 2.2 g para BAG y BEX, respectivamente, lo cual corresponde a una diferencia menor al ~60 % cuando se compara con BAG, debido a la remoción de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .

## 6.2. Análisis composicional de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) pretratados con (LI) [Bmim]Cl y peróxido de hidrógeno alcalino (PHA).

Los BAG y BEX se sometieron a dos pretratamientos diferentes: con el líquido iónico (LI) [Bmim]Cl y peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) en las condiciones que se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Diseño experimental para los pretratamientos con líquidos iónicos (LI) empleando [Bmim]Cl y con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) en BAG y BEX.

Pretratamiento	Sustrato	T (°C)		Carga de solvente		t (h)
LI [Bmim]Cl	BAG	120	160	0.3 g sustrato/ 9.7 g LI		3
	BEX					
PHA	BAG	23		0.125 g $\text{H}_2\text{O}_2$ /g	0.5 g $\text{H}_2\text{O}_2$ /g	48
	BEX			sustrato	sustrato	

Los cambios en la composición química del BAG y BEX pretratados con LI [Bmim]Cl y con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) se muestran en la Tabla 7. Los cambios relativos de la celulosa y hemicelulosa de las muestras de biomasa se presentan en el anexo 1 y se calcularon a partir de la diferencia de cada componente al inicio y al final del pretratamiento.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 7, se puede observar que el mejor tratamiento que permitió el mayor incremento en el contenido de celulosa fue el [Bmim]Cl - 160 °C en BAG, y PHB-B en el BEX. En ambos casos la celulosa incrementó cerca del 30 y 20 % de acuerdo al contenido de celulosa inicial en los

BAG y BEX respectivamente. El análisis de varianza del cambio relativo de la celulosa (Anexo 2), muestra que el tipo de material no tiene un efecto significativo sobre la cantidad de celulosa obtenida ( $p > 0.5$ ), pero el tipo de pretratamiento sí lo afecta ( $p < 0.5$ ). La interacción entre los factores tiene un efecto significativo sobre el cambio relativo.

Respecto al contenido de hemicelulosa, no se observaron incrementos en el porcentaje de las muestras en ningún caso. Para el BAG se mantuvo dentro del valor del material sin tratar, mientras que para el BEX los tratamientos sí tuvieron un efecto negativo sobre este componente.

El cambio relativo de la hemicelulosa (anexo 1) no presentó una interacción entre pretratamientos donde el mayor cambio fue con [Bmim]Cl a 160 °C obtenida para ambos BAG y BEX con 12.7 % y 28.7 %, respectivamente. El análisis de varianza del cambio relativo de la hemicelulosa (anexo 3) muestra que todos los factores y sus interacciones tienen un efecto significativo sobre la cantidad de hemicelulosa después de los pretratamientos cuando se compara con el material sin tratar

En cuanto al grado de deslignificación (Fig. 7), la mayor remoción de lignina para ambos BAG y BEX fue con [Bmim]Cl-160 °C y PHA-B que emplearon la mayor temperatura y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para cada condición de pretratamiento, respectivamente. Por lo tanto, el pretratamiento con LI fue más efectivo que PHA en BEX y BAG.

El análisis de varianza de la deslignificación muestra que el tipo de pretratamiento tiene un efecto significativo sobre el grado de remoción de lignina de los materiales pretratados al compararse los pretratamientos con LI [Bmim]Cl ( $p > 0.5$ ). Asimismo, la interacción entre los factores no tiene un efecto significativo sobre el grado de deslignificación (anexo 4).

La prueba de rango múltiple de Duncan se utilizó para comparar las medias de la deslignificación de los diferentes tratamientos. Los valores de deslignificación para BEX tratado con [Bmim]Cl son estadísticamente diferentes a los demás tratamientos

obteniendo los niveles más elevados de remoción de lignina, sin embargo, no difieren estadísticamente entre sí (18.1 % a 120 °C vs 20.2 % a 160 °C).

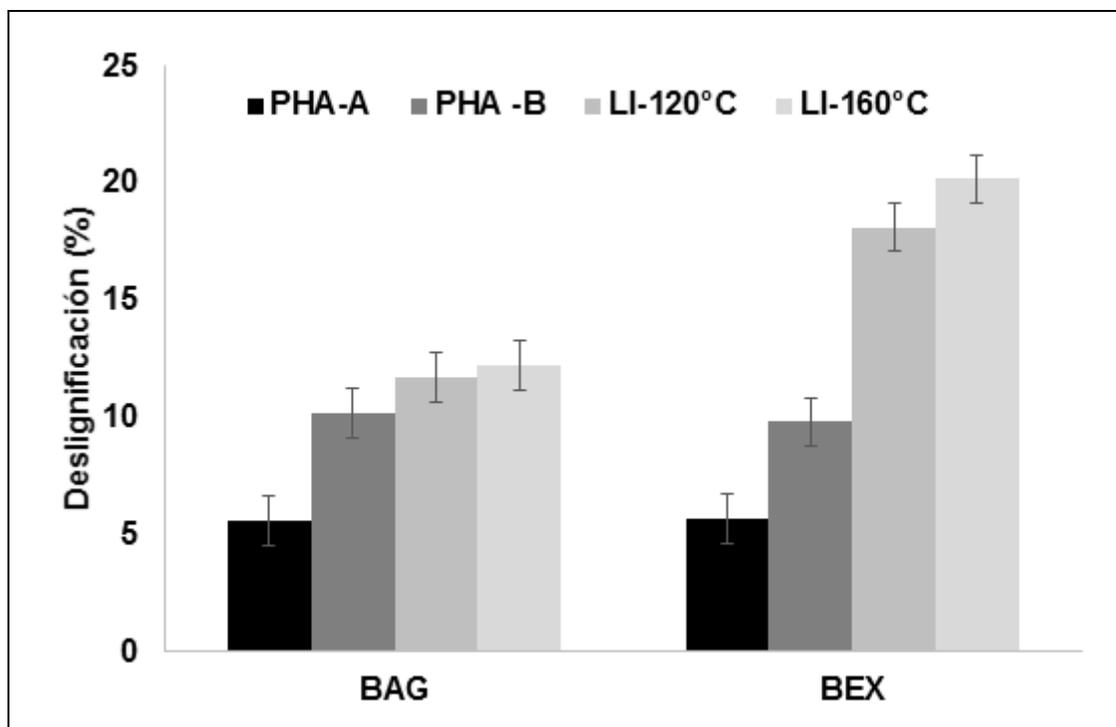
**Tabla 7.** Análisis composicional de bagazo de agave y bagazo de agave pretratado con el líquido iónico (LI) [Bmim]Cl y con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA).

<b>Bagazo de agave (BAG)</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina total<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Lignina soluble en ácido (%)</b>	<b>Lignina insoluble en ácido (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>
PHA-A <sup>b</sup>	40.8±0.7	19.9±0.6	18.5±0.4	2.8±0.2	15.7±0.2	8.8±0.2
PHA-B <sup>c</sup>	44.5±0.7	18.9±0.2	17.6±0.1	2.5±0.0	10.3±0.1	4.5±0.3
[Bmim]Cl - 120 °C	49.9±0.7	19.2±0.0	17.3±0.2	2.5±0.1	14.8±0.1	4.3±0.4
[Bmim]Cl - 160 °C	52.5±0.4	18.6±0.1	17.2±0.1	2.5±0.0	14.7±0.1	4.0±0.3
<b>Bagazo de agave extraído (BEX)</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina total<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Lignina soluble en ácido (%)</b>	<b>Lignina insoluble en ácido (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>
PHA-A <sup>b</sup>	46.9±0.6	13.2±0.5	18.2±0.4	3.4±0.2	14.8±0.3	3.1±0.3
PHB-B <sup>c</sup>	58.9±0.3	10.9±0.3	17.4±0.7	2.1±0.2	15.3±0.5	2.7±0.4
[Bmim]Cl - 120 °C	53.5±0.4	11.6±0.1	15.8±0.2	1.9±0.0	13.9±0.2	2.2±0.8
[Bmim]Cl - 160 °C	56.5±0.4	10.6±0.0	15.4±0.2	1.8±0.1	13.6±0.1	1.9±0.9

<sup>a</sup>Lignina total = lignina soluble en ácido + lignina insoluble en ácido

<sup>b</sup>Peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.125g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.

<sup>c</sup>Peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.5g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.



**Fig. 7.** Deslignificación de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) pretratado con líquidos iónicos (LI) y peróxido de hidrógeno alcalino calculado sobre los materiales sin tratar (controles). PHA-A = peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.125g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa y PHA-B = peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.5g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa. Las desviaciones son el error estándar del diseño experimental (Montgomery, 1991).

Las diferencias en la eficiencia de deslignificación entre las muestras de BAG y BEX son probablemente debidas a las siguientes razones: (1) la presencia del CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> afecta al tipo de biomasa otorgándole una mayor recalcitrancia restringido a plantas con un alto nivel de CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, (2) al emplear altas temperaturas en el LI y una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sus respectivas condiciones de procesos, presentaron un pretratamiento más efectivo, indicando que puede haber una efectiva transición vítrea de la lignina que se debe exceder para solubilizar eficientemente a la lignina, y (3) la interacción de un líquido iónico específico con la biomasa dependerá del catión, anión, temperatura, y tiempo empleado en el proceso de pretratamiento por lo que deben realizarse estudios con otros tipos de materiales de interés para las aplicaciones en una biorefinería como maderas, residuos agroindustriales y pastos de crecimiento acelerado.

### 6.3. Análisis composicional de bagazo de agave (BAG) pretratado con LI [Emim]OAc, hidrólisis ácida diluida e hidrólisis alcalina

Al observar que la remoción de oxalato de calcio del BAG no favorecía el pretratamiento, se decidió emplear al BAG en los pretratamientos con el líquido iónico (LI) [Emim]OAc, hidrólisis ácida diluida (HA) e hidrólisis alcalina (AL) en las condiciones que se describen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Diseño experimental para los pretratamientos con el líquido iónico (LI) [Emim]OAc; hidrólisis ácida diluida (HA) e hidrólisis alcalina (AL).

Pretratamiento	Sustrato	T (°C)		Carga de solvente	Presión (psi)	t (h)
LI [Emim]OAc	BAG	120	160	1 g sustrato/ 9.0 g LI	-	3
HA	BAG	130		1 g sustrato/ 9.0 mL solución	20	0.5
AL	BAG	121		1 g sustrato/ 9.0 mL solución	14.7	0.5

La caracterización fisicoquímica del BAG pretratado con AL, HA y LI [Emim]OAc en términos porcentuales con respecto de una base de 100 mg de BAG seco y sin tratar, se presenta en la Tabla 9. La mayor recuperación de biomasa se obtuvo con los pretratamientos alcalinos (AL) mientras que en los procesos que involucran ácidos o líquidos iónicos se obtuvieron valores considerablemente menores debido a la severidad de cada proceso. El pretratamiento HA utilizando ácido sulfúrico fue el más efectivo al remover hemicelulosa hasta un 7.7 % con HA-2 %. La deslignificación más elevada fue con el pretratamiento con LI [Emim]OAc seguida por AL.

Basados en el porcentaje inicial de lignina en BAG, el grado de deslignificación para AL-1 % y AL-2 % fueron de 9.2 % y 19.9 %, mientras que el LI [Emim]OAc en 120 °C y 160 °C resultaron en 37.2 % y 28.6%, respectivamente.

El pretratamiento con el LI [Emim]OAc presentó los valores más elevados de acumulación de celulosa llegando hasta 61.0 % a 160 °C seguido por 51.8 % a 120 °C. Respecto al contenido de lignina, los mejores pretratamientos para su remoción fueron con AL y LI.

Los reportes para el pretratamiento de bagazo de agave es limitado cuando se compara con otros sustratos para la producción de biocombustibles como el bagazo de caña o el rastrojo de maíz (Kumar et al. 2009a; Li et al., 2011).

López-Nevárez (2012) reportó para BAG una deslignificación del 24.77 % utilizando 1.5 % NaOH (15 min a 121°C) y de 35.6 % empleando 3 % NaOH. Por otra parte, Caspeta et al. (2014) utilizó un pretratamiento para BAG con organosolventes utilizando una mezcla de ácido sulfúrico, etanol y agua a temperaturas relativamente elevadas 160-180 °C obteniendo un producto recuperado con una cantidad de celulosa enriquecida y una cantidad cercana a cero de hemicelulosa facilitando la hidrólisis enzimática. Asimismo, Pérez-Pimienta et al., (2013) reportaron que cuando se pretrató BAG empleando [Emim]OAc con una concentración de LI/biomasa del 3 % sin agitación, se obtuvo una deslignificación del 17 y 44 % a 120 y 160 °C respectivamente. Por otra parte, durante el pretratamiento HA no se detectaron cantidades medibles de ácido acético, furfural y HMF, los cuales son productos de la degradación de la biomasa lignocelulósica.

Estudios previos han encontrado que [Emim]OAc es un solvente efectivo para solubilizar la pared celular de las plantas usando temperaturas moderadas, asimismo se puede precipitar a la celulosa y regenerarla mediante la adición de agua como antisolvente para rechazar a la lignina en la solución (Singh et al., 2009). La reducción del contenido de lignina con BAG pretratado con [Emim]OAc-120 °C fue de 37.2 %, que resulta mayor al compararlo con el 26.1 % reportado por Sun et al. (2009) quienes trataron madera de pino con [Emim]OAc a 110 °C empleando condiciones de tiempo mayores (16 h).



**Tabla 9.** Análisis composicional de bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida (HA) y líquidos iónicos [Emim]OAc.

Bagazo de agave (BAG)	Biomasa recuperada (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina total <sup>a</sup> (%)	Lignina soluble en ácido (%)	Lignina insoluble en ácido (%)	Cenizas (%)
AL-1 %	68.1±0.8 (68.1 mg)	41.3±0.1 (28.1 mg)	12.6±0.6 (8.6 mg)	17.8±0.3 (12.1 mg)	2.7±0.1 (1.8 mg)	15.1±0.2 (10.3 mg)	5.7±0.9 (3.9 mg)
AL-2 %	63.0±0.5 (63.0 mg)	43.4±0.4 (27.3 mg)	15.5±0.2 (9.8 mg)	15.7±0.1 (9.9 mg)	2.6±0.0 (1.6 mg)	13.1±0.1 (8.3 mg)	5.1±0.2 (3.2 mg)
HA-1 %	53.0±1.8 (53.0 mg)	44.5±0.3 (23.6 mg)	9.7±0.4 (5.1 mg)	21.7±0.5 (11.5 mg)	5.3±0.3 (2.8 mg)	16.4±0.6 (8.7 mg)	3.2±0.2 (1.7 mg)
HA-2 %	55.0±1.7 (55.0 mg)	47.7±0.5 (26.2 mg)	7.7±0.9 (4.2 mg)	21.9±0.3 (12.0 mg)	4.2±0.1 (2.3 mg)	17.7±0.2 (9.8 mg)	1.6±0.2 (0.9 mg)
[Emim]OAc 120 °C	59.3±1.0 (59.3 mg)	51.8±0.6 (30.7 mg)	20.4±0.0 (12.1 mg)	12.3±0.4 (7.3 mg)	1.4±0.0 (0.8 mg)	10.9±0.4 (6.5 mg)	4.0±0.6 (2.4 mg)
[Emim]OAc 160 °C	50.1±1.2 (50.1 mg)	61.0±0.5 (30.6 mg)	18.7±0.1 (9.4 mg)	14.0±0.3 (7.0 mg)	1.5±0.0 (0.8 mg)	12.5±0.3 (6.2 mg)	6.0±0.2 (3.0 mg)

<sup>a</sup>Lignina total = lignina soluble en ácido + lignina insoluble en ácido

\*Valores entre paréntesis representan la cantidad de cada componente recuperado de 100 mg de bagazo de agave

Asimismo, Lee et al. (2009) emplearon [Emim]OAc como solvente para extraer lignina de harina de madera de maple, y fue capaz de extraer el 85 % de la lignina después de un pretratamiento a 90 °C durante 70 h. Adicionalmente, Li et al., (2011) reportaron una eficiencia del 17.3 % de remoción de lignina de rastrojo de maíz utilizando [Emim]OAc a 160 °C durante 3 h. El grado de deslignificación obtenido con LI [Emim]OAc para el BAG es consistente con valores reportados cuando este material es pretratado con [Emim]OAc a 120 °C durante 3 h (~17%) siendo la diferencia significativa el tipo de líquido iónico empleado (Pérez-Pimienta et al., 2013). Finalmente, al comparar el pretratamiento de BAG con LI empleando [Bmim]Cl y [Emim]OAc se puede hacer notar que con [Emim]OAc hubo un enriquecimiento del contenido de celulosa de 61.0 % vs 52.5 % que se obtuvo con [Bmim]Cl. Así mismo el porcentaje de lignina residual obtenida en el material pretratado con [Emim]OAc fue menor que con [Bmim]Cl (12.3 % vs.17.2 %).

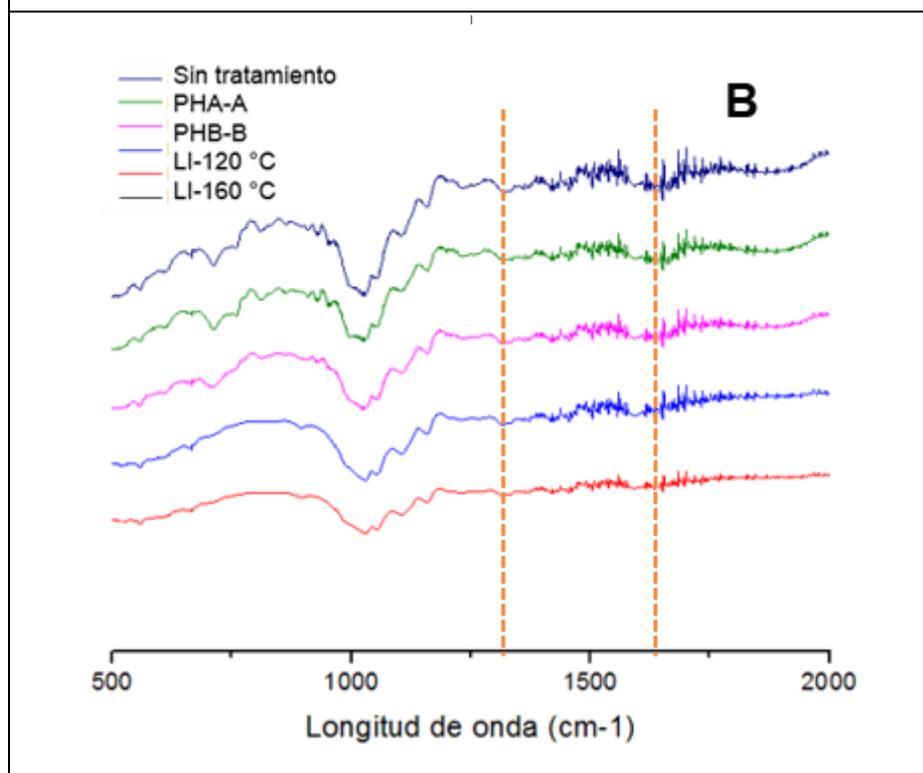
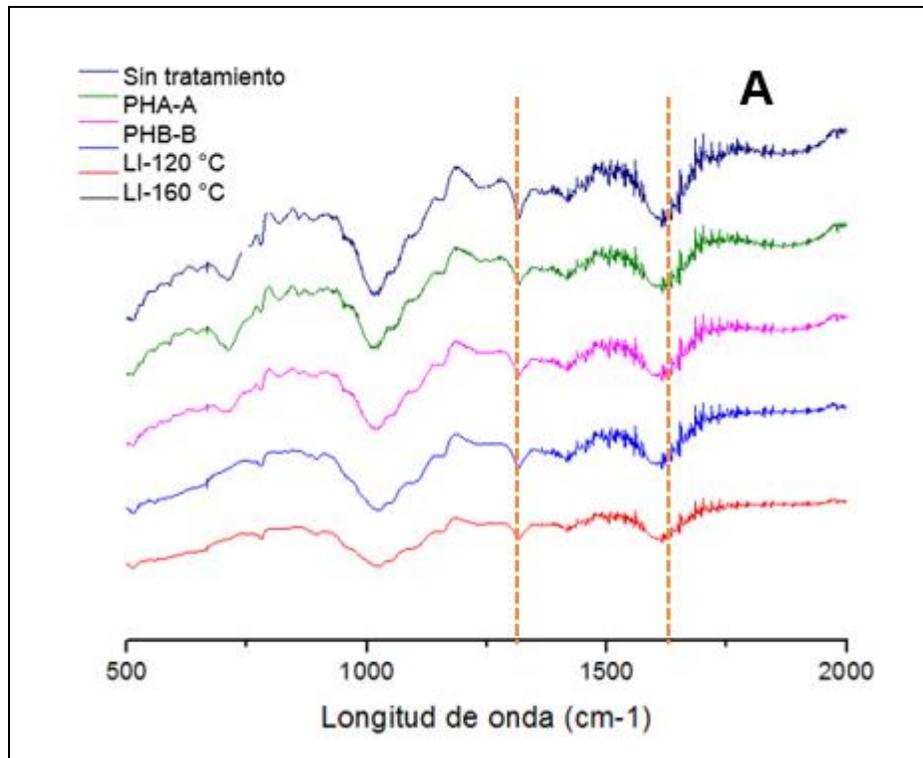
#### 6.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

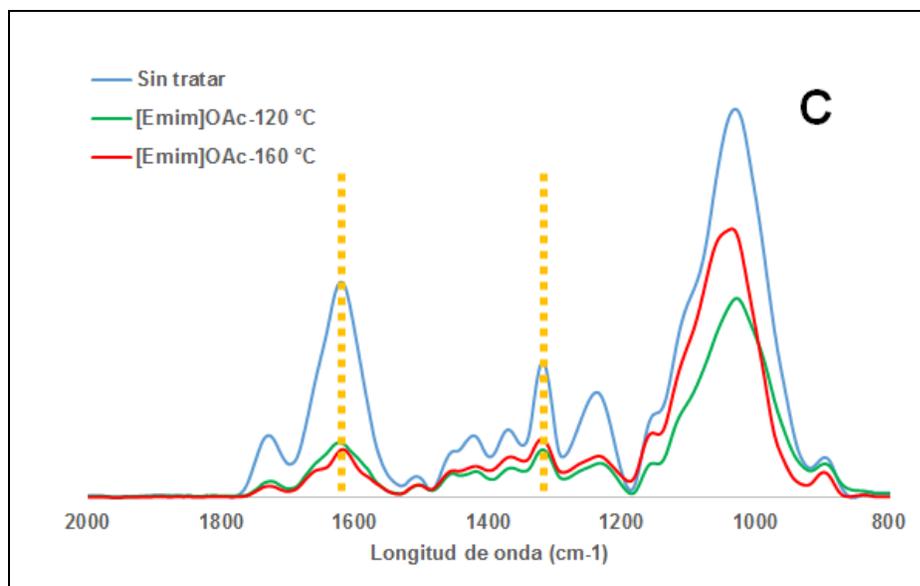
Para poder identificar el efecto de los pretratamientos en la estructura de la biomasa lignocelulósica, se utilizó la espectroscopía FTIR para rastrear los cambios químicos en diversos sustratos (Kumar et al., 2009b; Li et al., 2010). De esta manera, la espectroscopía FTIR se utilizó para rastrear los cambios en la composición química de las muestras de biomasa (BAG y BEX) sin tratar y pretratadas con PHA y LI [Bmim]Cl, además de BAG pretratado con LI [Emim OAc] (Fig. 8).

Los cambios relativos de la composición química junto con la asignación de las posiciones de las bandas se presentan en la Tabla 10 para el BAG pretratado con PHA y con los LI [Bmim]Cl y [Emim][OAc], mientras que en la Tabla 11 se presenta para BEX pretratado con PHA y con el LI [Bmim]Cl. Para los espectros de FTIR, se utilizaron seis bandas para seguir los cambios químicos de la lignina y los carbohidratos, además de dos bandas para el oxalato de calcio, asimismo para el intervalo de la celulosa amorfa a cristalina (Fig. 8).

La posición de las bandas que se atribuyen al  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  en  $1321$  y  $1622\text{ cm}^{-1}$ , estuvieron presentes como se esperaba en el BAG mientras que en BEX mostraron una menor intensidad debido al proceso de extracción de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  (Nevin et al., 2008). Los cambios relativos a nivel molecular de BAG y BEX mostraron diferencias superiores en el pretratamiento con LI [Bmim]Cl específicamente en las bandas de oxalato cuando se comparan con el pretratamiento con PHA. Al comparar las muestras pretratadas de BAG con las muestras sin tratar se observa una disminución de la intensidad de los picos del  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  en todos los casos.

En el BAG con el pretratamiento con LI [Bmim]Cl se observó una mayor disminución de las bandas de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  que en el BAG pretratado con PHA debido a una mayor remoción de lignina. Por otra parte, en BAG pretratado con LI [Emim]OAc se observa una disminución de su intensidad superior al 60 % en ambas bandas cuando se compara con BAG sin tratar. Asimismo, en el pico en  $1321\text{ cm}^{-1}$  se consigue una mayor disminución a  $120\text{ °C}$  mientras que en  $1622\text{ cm}^{-1}$  sucedió lo contrario obteniéndose la mayor disminución con la muestra pretratada en  $160\text{ °C}$  esto reflejado como una remoción del  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .





**Fig. 8.** Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de bagazo de agave (A) y bagazo de agave extraído (B) de muestras sin tratar y pretratadas con peróxido de hidrógeno y líquido iónico [Bmim]Cl. Bagazo de agave sin tratar y pretratado con líquido iónico [Emim]OAc (C). Las bandas de oxalato de calcio están indicadas ( $1321$  y  $1622$   $\text{cm}^{-1}$ ).

El pico en  $900$   $\text{cm}^{-1}$  (estrechamiento anti-simétrico fuera del plano de la celulosa amorfa) se observa en el espectro de las muestras pretratadas con ambos LI [Bmim]Cl y [Emim]OAc, los cuales reflejan el incremento relativo del contenido de celulosa como resultado de la remoción parcial de la lignina y la hemicelulosa.

Es de hacer notar que [Emim]OAc se observa una disminución del 15.5 % y 36.4 % con las muestras tratadas a 120 y 160 °C, respectivamente. La banda en  $1745$   $\text{cm}^{-1}$  la cual se asocia con el estrechamiento del grupo carbonilo C=O se reduce para PHA en un grado similar para el BAG y el BEX, lo cual indica una mayor escisión de la remoción de lignina y sus cadenas laterales, asimismo [Emim]OAc-160 °C presentó el valor mas elevado de hasta el 83.0 % (Kumar et al., 2009a y Kumar et al., 2009b). Sin embargo, la banda en  $1510$   $\text{cm}^{-1}$  (esqueleto aromático de la lignina) no pudo ser determinado debido a la superposición del pico de lignina con el pico de gran intensidad del oxalato de calcio para BAG.

De manera similar, las bandas en  $1375\text{ cm}^{-1}$  (deformación C-H en la celulosa y hemicelulosa) y en  $1056\text{ cm}^{-1}$  (estrechamiento C-O en la celulosa y hemicelulosa) en comparación con las muestras sin tratar, disminuyen la intensidades de ambos pretratamientos para los dos materiales (BAG y BEX), siendo el retratamiento con LI donde se presenta la mayor disminución para  $1375\text{ cm}^{-1}$  dentro del intervalo de 10.4-17.5 % y para  $1056\text{ cm}^{-1}$  con 50.4-54.9 % debido probablemente a la remoción de hemicelulosa (Li et al., 2010).

Estos resultados muestran que el pretratamiento con líquidos iónicos debilitan a las interacciones de Van der Waals entre los polímeros de la pared celular. Asimismo, para la banda en  $1510\text{ cm}^{-1}$  en BEX atribuida a la remoción de lignina tiene su mayor disminución para [Emim][OAc]-160 °C seguido por [Emim]OAc-120 °C acorde a lo obtenido en el análisis composicional, sin embargo, los valores se obtuvieron resultados opuestos para el pretratamiento PHA en los que se obtuvo un mayor valor para PHA-A (4.7 %) que para PHA-B (2.0 %), debido posiblemente a alguna interacción dentro de este espectro por microcristales de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  remanentes.

El intervalo de intensidades de las bandas entre  $900$  y  $1098\text{ cm}^{-1}$  son dependientes de la condición del pretratamiento que puede alterar el intervalo de la celulosa amorfa a cristalina, en las que los valores más elevados se obtuvieron con el pretratamiento LI dentro del intervalo de 1.08-1.23 en comparación con el pretratamiento PHA (0.88- 0.91) para ambos materiales (BAG y BEX) relación que puede comprobarse con los estudios de cristalinidad.

**Tabla 10.** Cambios relativos a nivel molecular del bagazo de agave (BAG) después del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino y los líquidos iónicos [Bmim]Cl y [Emim]OAc\*.

Banda	Asignación	Pretratamiento						
		Sin tratar	PHA-A <sup>a</sup>	PHA-B <sup>b</sup>	[Bmim]Cl 120 °C	[Bmim]Cl 160 °C	[Emim]OAc 120 °C	[Emim]OAc 160 °C
900	Remoción de celulosa amorfa		6.0	3.2	13.0	14.4	15.5	36.4
1056	Estrechamiento C-O en celulosa y hemicelulosa		14.7	2.8	50.7	50.4	49.3	22.5
1098/900	Intervalo de celulosa cristalina a amorfa	0.88	0.91	0.86	1.09	1.08	0.35	0.48
1235	Estrechamiento C-O en lignina y hemicelulosa		13.5	9.3	26.1	27.1	67.0	60.1
1321	Estrechamiento C=O del oxalato de calcio		11.4	4.1	32.6	33.7	64.5	56.4
1375	Deformación C-H de la celulosa y hemicelulosa		6.7	-5.7	17.0	17.5	58.4	41.4
1510	Esqueleto aromático de la lignina**		ND	ND	ND	ND	ND	ND
1622	Estrechamiento C-O del oxalato de calcio		15.7	15.5	34.5	35.5	74.5	77.9
1745	Estrechamiento del carbonilo (C=O)		6.7	7.1	2.0	3.6	78.0	83.0

\* %Cambio relativo = 100\*(intensidad de los sólidos sin tratar – intensidad de los sólidos pretratados)/ intensidad de los sólidos sin tratar; donde los números positivos indican reducción.

ND=No determinado.

<sup>a</sup>Peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.125g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.

<sup>b</sup>Peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.5g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.

**Tabla 11.** Cambios relativos a nivel molecular del bagazo de agave extraído (BEX) después del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino y el líquido iónico [Bmim]Cl\*.

Banda	Asignación	Pretratamiento				
		Sin tratar	PHA-A <sup>a</sup>	PHA-B <sup>b</sup>	LI-120 °C	LI-160 °C
900	Remoción de celulosa amorfa		9.6	5.4	5.0	0.4
1056	Estrechamiento C-O en celulosa y hemicelulosa		18.0	13.7	54.9	50.4
1098/900	Intervalo de celulosa cristalina a amorfa	0.84	0.89	0.88	1.16	1.23
1235	Estrechamiento C-O en lignina y hemicelulosa		9.6	6.7	19.0	21.5
1321	Estrechamiento C=O del oxalato de calcio		7.9	3.7	18.5	21.2
1375	Deformación C-H de la celulosa y hemicelulosa		5.7	1.9	10.4	12.8
1510	Esqueleto aromático de la lignina		4.7	2.0	4.4	7.0
1622	Estrechamiento C-O del oxalato de calcio		7.1	2.4	2.3	7.3
1745	Estrechamiento del carbonilo (C=O)		7.8	5.8	-0.3	3.1

\* %Cambio relativo = 100\*(intensidad de los sólidos sin tratar – intensidad de los sólidos pretratados)/ intensidad de los sólidos sin tratar; donde los números positivos indican reducción.

<sup>a</sup>Peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.125g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.

<sup>b</sup>Peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.5g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.

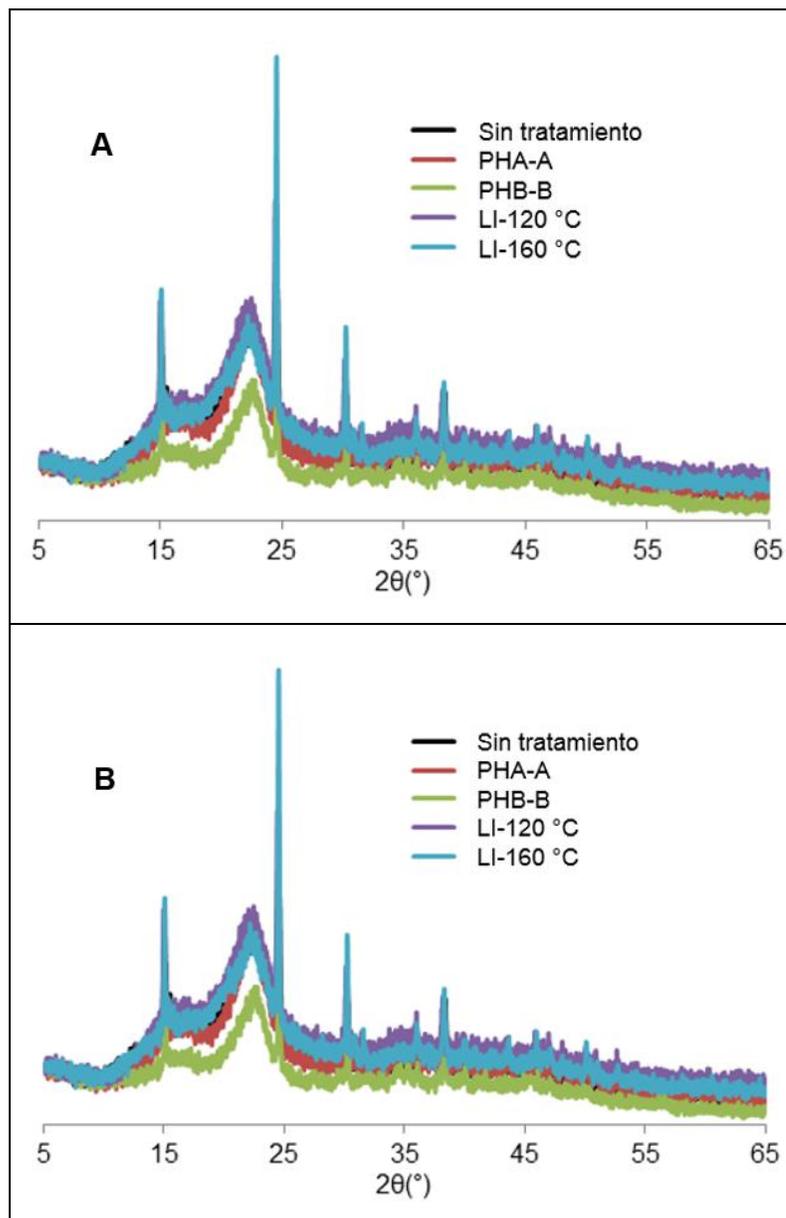
## 6.5. Difracción de rayos X

Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X (DRX) del BAG y BEX. Se puede observar en la Fig. 9A el patrón de difracción del BAG con unos picos prominentes de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  presentes en  $2\theta = 15^\circ$ ,  $24.5^\circ$  y  $30.5^\circ$ . Estos picos corresponden a los planos de la red cristalina en (10-1), (020) y (20-2) de oxalato de calcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ) monoclinico (el cual es un sistema cristalino que consta de un eje binario, un plano perpendicular a éste y un centro de inversión). Los patrones de difracción del BEX muestran una notable reducción en cada uno de los picos de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  (Fig. 9B). Lo que confirmó la eficiencia del proceso de extracción de oxalato de calcio.

Por otro lado, el índice de cristalinidad (ICr) del plano de la red cristalina de la celulosa I se estimó mediante un programa para separar las contribuciones amorfas y cristalinas del espectro de difracción empleando una metodología de ajuste de curvas. El ICr del BAG sin tratar fue de 39 % con una reducción en las muestras pretratadas correspondientes a 35 % (PHA-A), 34 % (PHA-B), 28 % (LI-120 °C) y 17 % (LI-160 °C). En contraste, el BEX tuvo un ICr de 28 % y las muestras pretratadas fueron 30 % (PHA-A), 29 % (PHA-B), 14 % (LI-120 °C) y 11 % (LI-160 °C) todas menor que el BAG. Solamente en las muestras de BEX pretratadas con LI a 120 y 160 °C, el pico principal alrededor de  $22.0^\circ$  se desplazó a un menor ángulo ( $21.2^\circ$ ) y se volvió más amplio en comparación con la muestra sin tratar.

Pérez-Pimienta et al. (2013) reportaron un desplazamiento similar en los picos presentes en las muestras de BAG pretratado con [Emim]OAc al 3 % a 120 °C durante 3 h. El pico ancho en  $16.0^\circ$  redujo su intensidad y se volvió más débil correspondiente al pico de lignina. Sin embargo, el ICr se calcularon resultando en 17 y 11% para las muestras pretratadas con el LI [Bmim]Cl a 160 °C, los cuales no alcanzaron una disminución tan notable en la cristalinidad como sucedió con bagazo de agave pretratado con [Emim]OAc utilizando la misma temperatura y tiempo de pretratamiento (160 °C y 3 h) presentadas en el mismo reporte la cual alcanzó un ICr del 3 %. Una disminución en la cristalinidad debido a estos cambios es consistente con una severa distorsión de la red cristalina de la celulosa I (Cheng et al., 2012).

La cristalinidad de las muestras de BAG pretratadas con [Emim]OAc no se determinó debido a que se cuenta con los valores de un reporte previo en las mismas condiciones a 120 °C y 160 °C (Pérez-Pimienta et al., 2013).

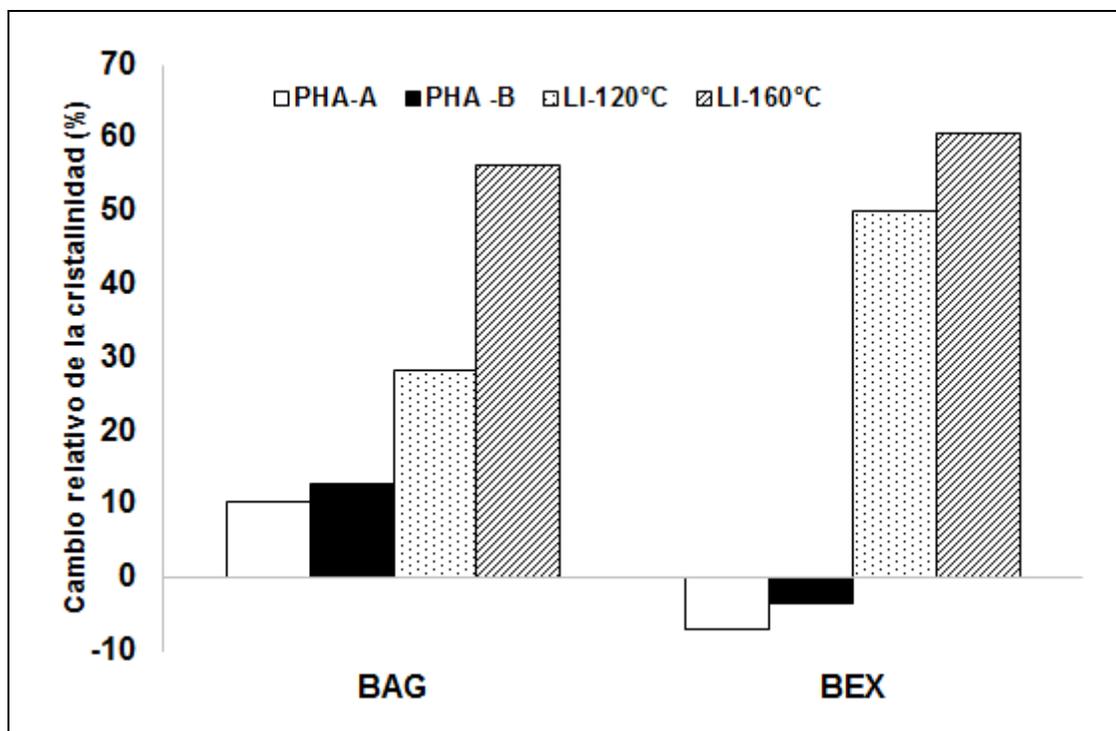


**Fig. 9.** Difractogramas de rayos X para: (A) bagazo de agave y (B) bagazo de agave extraído.

La cristalinidad de la biomasa celulósica afecta la eficiencia de la sacarificación enzimática (Cheng et al., 2011). Los pretratamientos con líquidos iónicos, explosión de vapor con amoníaco, oxidación húmeda, hidrólisis ácida, entre otros han demostrado que al perturbar los enlaces inter e intra cadena de hidrógeno de la fibrillas de celulosa en la biomasa resulta en un cambio en su cristalinidad y estructura volviéndola más susceptible a la sacarificación enzimática (Mosier et al., 2005).

La Fig. 10 presenta el porcentaje del cambio relativo de la cristalinidad (CRC) de las muestras de BAG y BEX pretratadas con LI [Bmim]Cl y PHA. El CRC del BAG presentó números positivos para ambos tratamientos (LI y PHA). Durante el pretratamiento PHA-A y PHA-B en BAG alcanzó valores similares de CRC (10 y 13 %). Mientras que para BEX solamente con el pretratamiento con LI se obtuvieron valores positivos, pero no con el PHA donde se obtuvo una disminución de hasta el 7 % con respecto del material sin tratar.

Las muestras de BEX pretratadas con PHA-A y PHA-B presentaron una disminución del 7 y 4 %, respectivamente. Mientras que el pretratamiento con el LI [Bmim]Cl se obtuvo la mayor CRC a 160 °C para ambos BAG (56 %) y BEX (61 %) mientras que a 120 °C donde se obtuvieron 28 % y 50 % para BAG y BEX, respectivamente. Además, el CRC para el pretratamiento con LI a 160 °C en BAG y BEX alcanzaron valores similares con una diferencia menor (~5 %) en comparación con el pretratamiento con LI a 120 °C (~22 %). Todos estos resultados sugieren que el  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  provee una recalcitrancia específica al bagazo de agave y su remoción podría llevar a un menor ICr en el pretratamiento con LI.



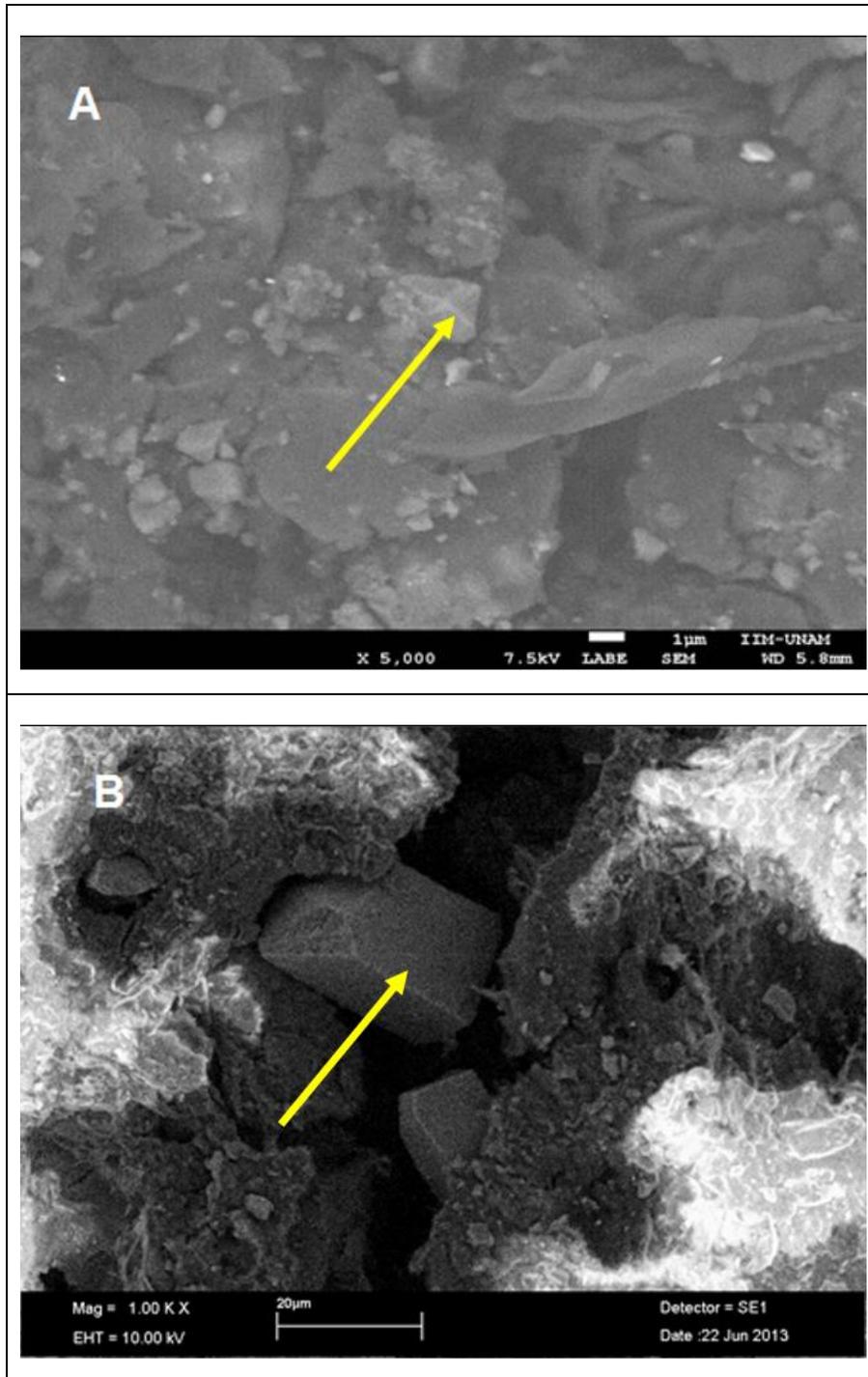
**Fig. 10.** Efecto del pretratamiento con el LI [Bmim][Cl] y peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) en bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) sobre el porcentaje de cambio relativo de la cristalinidad (CRC). PHA-A=pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.125g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa y PHB-B = pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.5 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa.

### 6.6. Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de BAG y BEX sin tratar en ambos casos, se tomaron con un aumento de 5,000X y 1,000X con el propósito de encontrar e identificar los cristales de CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Fig. 11A y 11B). Los cristales de oxalato de calcio de aproximadamente 1 μm, se encontraron en cantidades considerables en BAG sin tratar, principalmente en la forma de estiloides dispersos sobre la superficie, los cuales son consistentes con reportes previos los cuales presentaron las mismas formas características en diversas muestras de bagazo de agave (Prychid y Rudall, 1999). Las condiciones ambientales pueden influir en la cantidad de oxalato de calcio producido y el número de cristales formados en la planta.

En el género *Agave* los cristales se encuentran almacenados en depósitos localizados en la superficie cuticular, pueden presentar varias formas, ya sea en drusas (formas compuestas), estiloides (elongado simple) y ráfides (elongados en agregados). Éstos se vuelven un sistema de defensa en contra de insectos y animales. El oxalato de calcio presente en las plantas en diversas formas se vuelven agentes principales en la dermatitis durante la manipulación en trabajadores de destilerías en la industria del tequila (Salinas et al., 2011).

La imagen del BAG confirma los niveles de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  que son superiores a la mayoría de la materia prima empleada para la fabricación de biocombustibles cuando se compara con otras materias primas para la producción de biocombustibles como rastrojo de maíz o maderas (Nobel y Berry, 1985; Teramoto et al., 2007; Zhu et al., 2009). Cuando se compara la microscopia del BEX ésta presenta una diferencia notable con el BAG en el contenido de cristales de calcio libres y separados de la pared celular de la planta los cuales se señalan con flechas en las Fig. 12A y 12B. Estos cristales de oxalato alcanzaron un tamaño de  $\sim 20\mu\text{m}$ , como resultado del proceso de extracción con un crecimiento del plano pinacoide  $\{001\}$ , resultando en caras largas  $\{001\}$  y truncadas  $\{101\}$  como se identifican en cristales aislados de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  reportados por Peannisi et al. (2001).



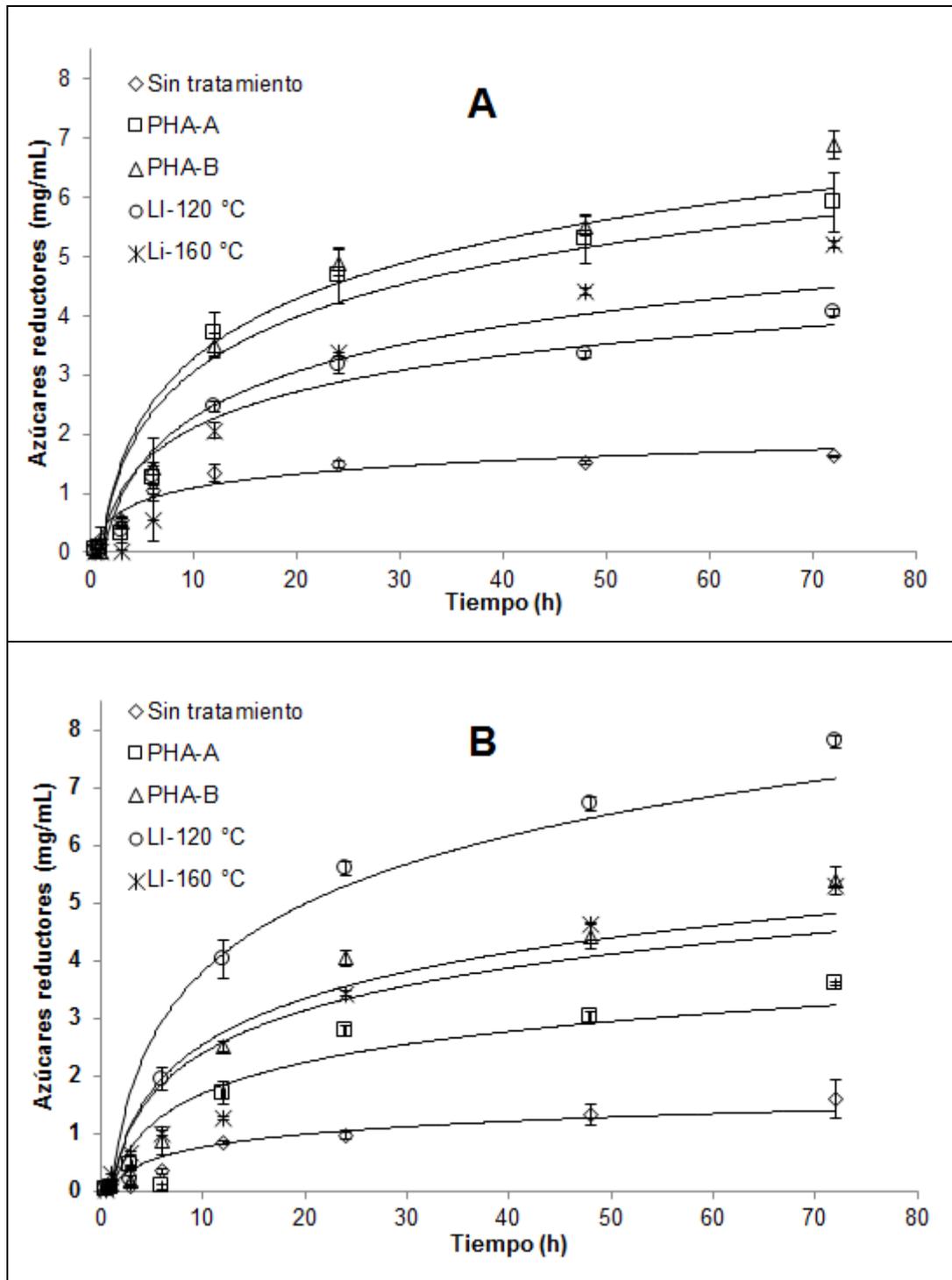
**Fig. 11.** Micrografías electrónicas de barridos de bagazos de agave (A) y bagazo de agave extraído (B) sin tratar. Las flechas indican los microcristales de oxalato de calcio.

### **6.7. Sacarificación enzimática de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX) sin tratar y pretratado**

Los experimentos de sacarificación se llevaron a cabo empleando cócteles enzimáticos comerciales de Novozymes (Celluclast 1.5L y Novozyme 188) para comparar la digestibilidad del BAG y BEX (sin tratar y pretratados) utilizando un contenido de celulosa normalizado (5 g/L). Las cinéticas de producción de azúcares reductores para BAG y BEX sin tratar y pretratado con PHA y LI [Bmim]Cl se presentan en la Fig. 12. Cuando se comparan la producción de azúcares de las muestras sin tratar de BAG y BEX contra la producción de azúcares de las muestras pretratadas con LI [Bmim]Cl y PHA, se observa que en las muestras tratadas se tuvieron producciones elevadas de azúcares debido a un menor contenido de lignina y cristalinidad.

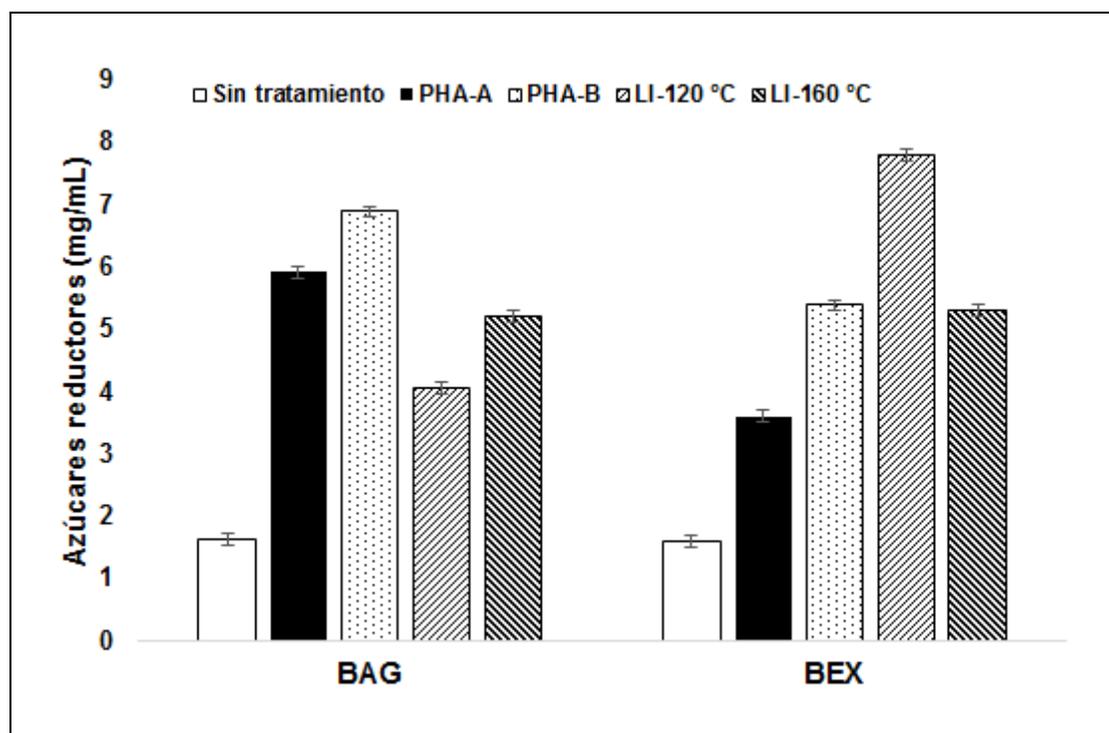
La producción de azúcares más elevada en BAG se obtuvo con ambas condiciones de PHA resultando en 5.92 mg/mL para PHA-A y 6.89 mg/mL para PHA-B, mientras que en las muestras tratadas con LI [Bmim]Cl a 120 y 160 °C resultaron en 4.06 y 5.21 mg/mL, respectivamente. A partir del BAG sin tratar sólo se alcanzó 1.62 mg/mL. Con estos resultados se logró un incremento en la producción de azúcares para ambos pretratamientos cuando se compara con la producción de las muestras sin tratar reflejándose en un incremento del 325 % (PHA-B) y 222 % ([Bmim]Cl -160 °C).

Por otro lado, las cinéticas de producción de azúcares a partir de BEX alcanzaron sus valores más elevados en las muestras pretratadas con LI [Bmim]Cl, resultados inversos a los obtenidos con BAG en las mismas condiciones. La producción de azúcares en BEX pretratado con [Bmim]Cl-120 °C y 160 °C fue 7.79 y 5.29 mg/mL, respectivamente, a las 72 h de sacarificación. Por otra parte, a partir del BEX pretratado con PHA-A y PHA-B se obtuvieron 3.60 y 5.38 mg/mL, respectivamente. Esto representa un aumento significativo en comparación con el BEX sin tratar (1.60 mg/mL) obteniéndose las mayores producciones con el BEX pretratado con [Bmim]Cl-120 °C seguido por PHA-B.



**Fig. 12.** Sacarificación enzimática de bagazo de agave (A) y bagazo de agave extraído (B) de muestras sin tratar y pretratadas usando una carga enzimática constante.

En la Fig. 13 se resume la producción de azúcares a las 72 h, de las muestras de BAG y BEX pretratados en las diferentes condiciones. La mejor producción de azúcares reductores durante la sacarificación enzimática, se obtuvo empleando las muestras de BAG pretratadas con PHA-B y la menor con BAG pretratada con LI [Emim]OAc-120 °C, mientras que para el BEX el pretratamiento donde mayores azúcares se obtuvieron fue con LI [Emim]OAc-120 °C y la menor producción con el pretratamiento PHA-A.



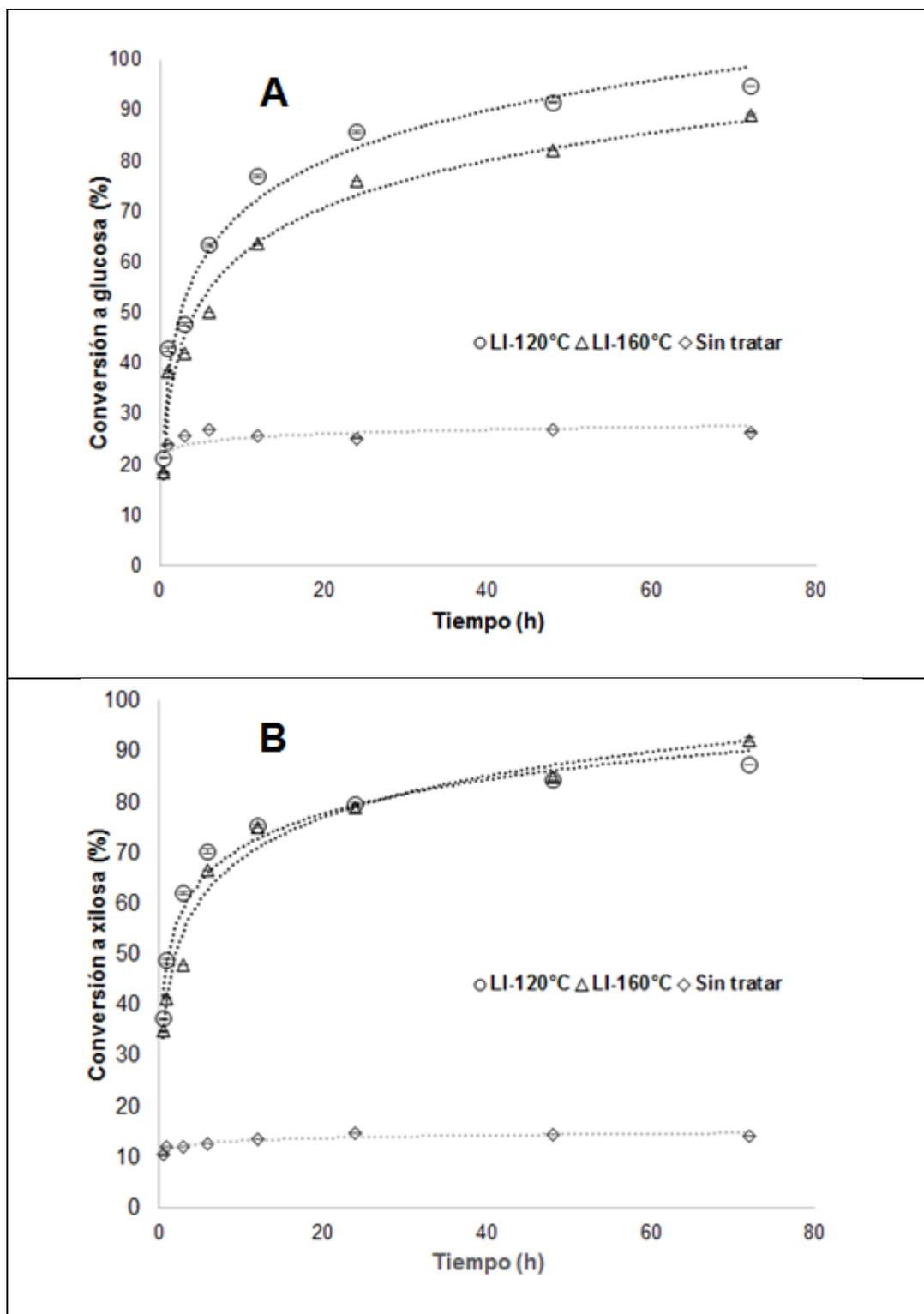
**Fig. 13.** Producción de azúcares a las 72 h con biomasa sin tratar y pretratada [bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX)]. PHA-A = peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.125 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa y PHA-B = peróxido de hidrógeno alcalino usando 0.5 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g biomasa. LI = [Bmim]Cl. Las desviaciones son el error estándar del diseño experimental (Montgomery, 1991).

Por otro lado, el BAG pretratado con [Emim]OAc a 120 °C y 160 °C se sacarificó en las condiciones establecidas previamente. Los resultados se muestran en términos de su conversión de celulosa a glucosa (Fig. 14A) y de hemicelulosa a xilosa (Fig.14B), calculadas a partir de las ecuaciones 13 y 14, empleando la concentración del azúcar recuperado (glucosa o xilosa), su valor teórico determinado a partir de sus

respectivos pesos moleculares (celulosa a glucosa y hemicelulosa a xilosa) y el contenido en peso en la biomasa.

La máxima sacarificación se obtuvo a las 72 h en las muestras de BAG tratado con LI-120 y LI-160 °C con valores de conversión a glucosa de 94.7 y 88.9 %, respectivamente (correspondientes a concentraciones de glucosa de 5.26 y 4.94 mg/mL para LI-120°C y LI-160°C), mientras que la conversión para el BAG sin tratar alcanzó valores limitados con una conversión del 26.4 %. Cabe resaltar que la conversión de celulosa en glucosa fue superior al 85 % en 24 h lo cual permitiría reducir los tiempos de proceso dando ventaja en el procesado dentro de una biorefinería.

Por otra parte, la conversión en xilosa de las muestras pretratadas con [Emim]OAc fue de 87.4 y 92.4 % para LI-120 °C y LI- 160 °C (correspondientes a concentraciones de xilosa de 2.09 y 1.87 mg/mL para LI-120°C y LI-160°C), mientras que para el BAG sin tratar fue de 14.2 % (0.38 mg/mL). En términos de la suma de glucosa y xilosa en el punto final de la sacarificación (72 h) se obtuvieron valores mayores de producción de azúcares en las muestras tratadas con [Emim]OAc que con [Bmim]Cl. Debido probablemente a que aunque ambos LI compartan un catión similar con base en el imidazolio, es el anión el que tiene el papel más importante en la disolución de la celulosa. El anión acetato en el [Emim]OAc es mucho más fuerte que el anión cloruro en el [Bmim]Cl, lo cual pudo ser evidente en el BAG otorgando un material con una menor cantidad de lignina y cristalinidad (Brandt et al., 2013).

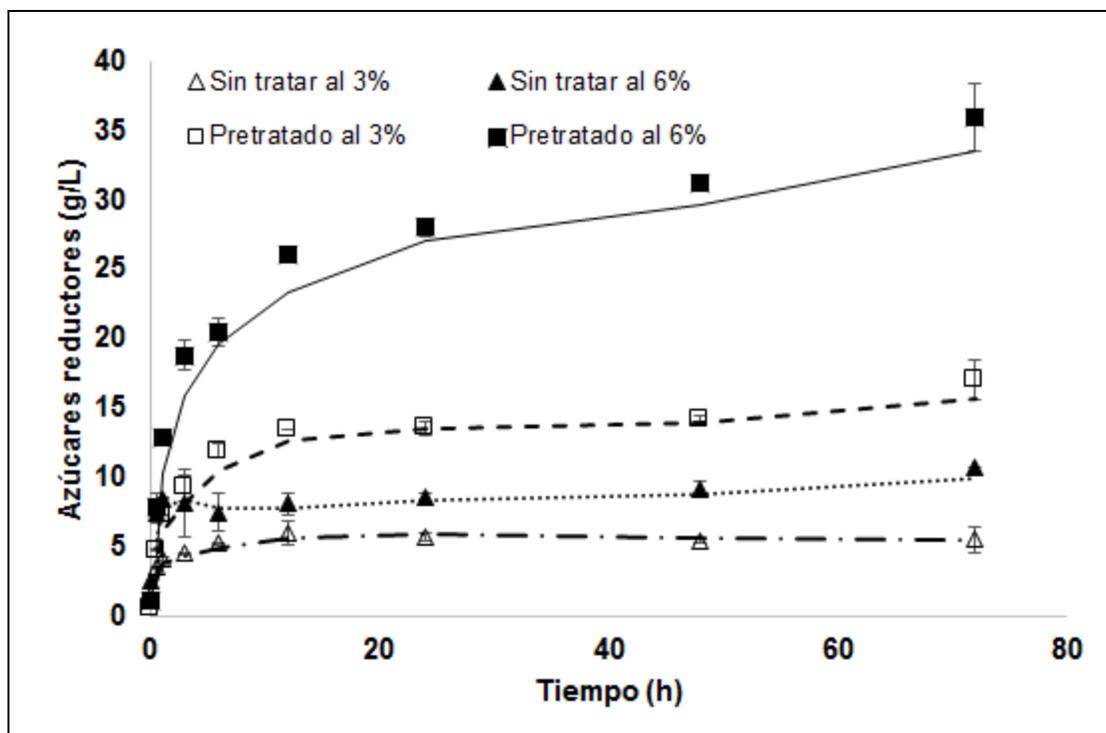


**Fig. 14.** Conversión a glucosa (A) y xilosa (B) de la sacarificación enzimática de bagazo de agave sin tratar y pretratado con [Emim]OAc usando una carga enzimática constante.

De acuerdo a los resultados anteriores, el LI-[Emim]OAc es más efectivo que el LI-[Bmim]Cl sobre el pretratamiento del BAG ya que favoreció la deslignificación y despolimerización de la hemicelulosa, la disminución de la cristalinidad de la celulosa, incrementó la porosidad y el área de superficie de la celulosa lo que llevó a una mejor hidrólisis enzimática obteniéndose una cantidad más elevada de azúcares en un menor tiempo.

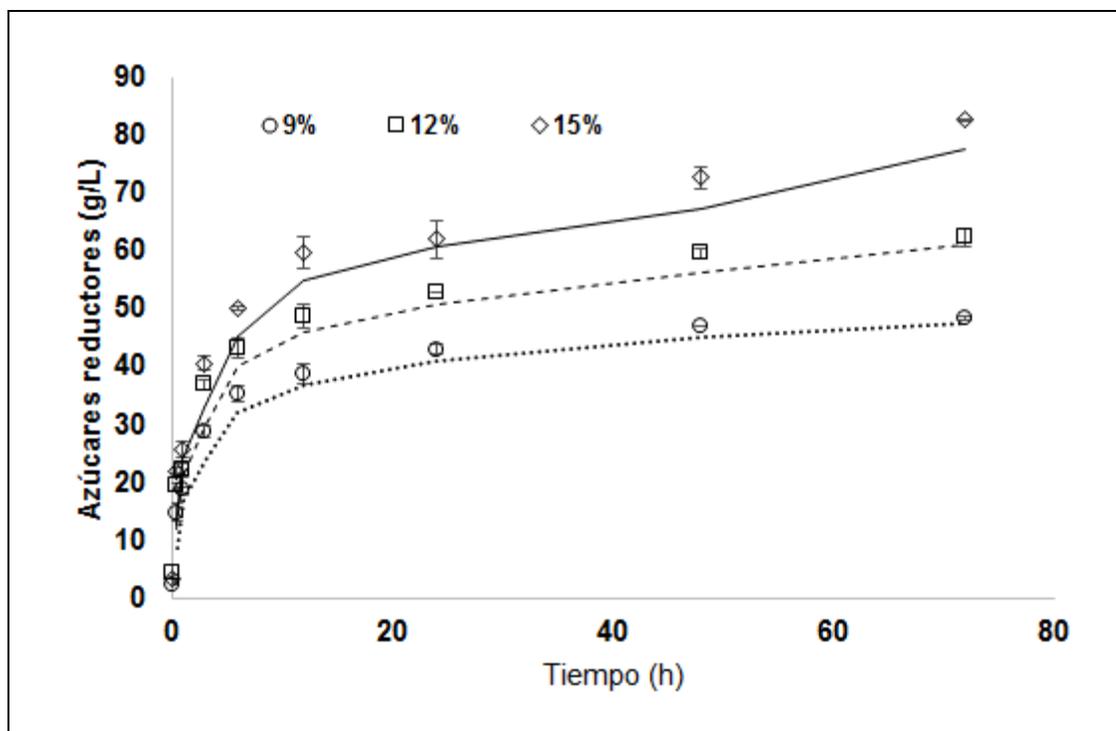
Por otra parte, con la finalidad de obtener una cantidad de azúcares reductores favorables para llevar a cabo la fermentación de los mismos, se realizaron experimentos utilizando solamente BAG pretratado con AL-1% y con cargas de biomasa del 3, 6, 9, 12 y 15 % en peso. Se empleó una carga de sólidos de 5 g celulosa/L en los experimentos cuyos resultados se presentan en las Fig. 12-14, que vendrían siendo equivalentes a una carga ligeramente menor al 3% en peso. La producción de azúcares reductores empleando una carga de biomasa del 3 y 6 % se presentan en la Fig. 15. Mientras que las cinéticas enzimáticas de producción de azúcares reductores empleando una carga de sólidos al 9, 12 y 15 % se muestran en la Fig. 16.

Empleando una carga de sólidos del 3 % de la muestra pretratada resultó en una producción de azúcares de 17.04 g/L a las 72 h mientras que para el BAG sin tratar fue de 5.52 g/L. Por otra parte, cuando se empleó una carga de sólidos del 6 %, el BAG pretratado produjo en términos de azúcares reductores 35.92 g/L siendo (~70 %) mayor que para el BAG sin tratar en la misma cantidad de sólidos (10.72 g/L).



**Fig. 15.** Producción de azúcares reductores en bagazo de agave sin tratar y pretratado con NaOH utilizando una carga de sólidos del 3 y 6%.

Respecto a la producción de azúcares reductores con las cargas de sólidos del 9, 12 y 15 % a las 72 h, éstas fueron de 48.33, 62.22 y 82.67 g/L, respectivamente. Comparando estos resultados con los obtenidos con las cargas de sólidos de 3 y 6 % en el mismo tiempo (72 h), se puede observar que existe una tendencia ascendente en la producción de azúcares conforme se aumenta la cantidad de sólidos en los hidrolizados, manteniendo constante la relación enzima-sustrato. Se seleccionó una carga de sólidos del 6 % (equivalentes a 20 g celulosa/L) para los experimentos posteriores (sacarificación y fermentación con BAG pretratado con AL, HA y LI [Emim]OAc) para obtener una cantidad adecuada de azúcares reductores para llevar a cabo la fermentación.



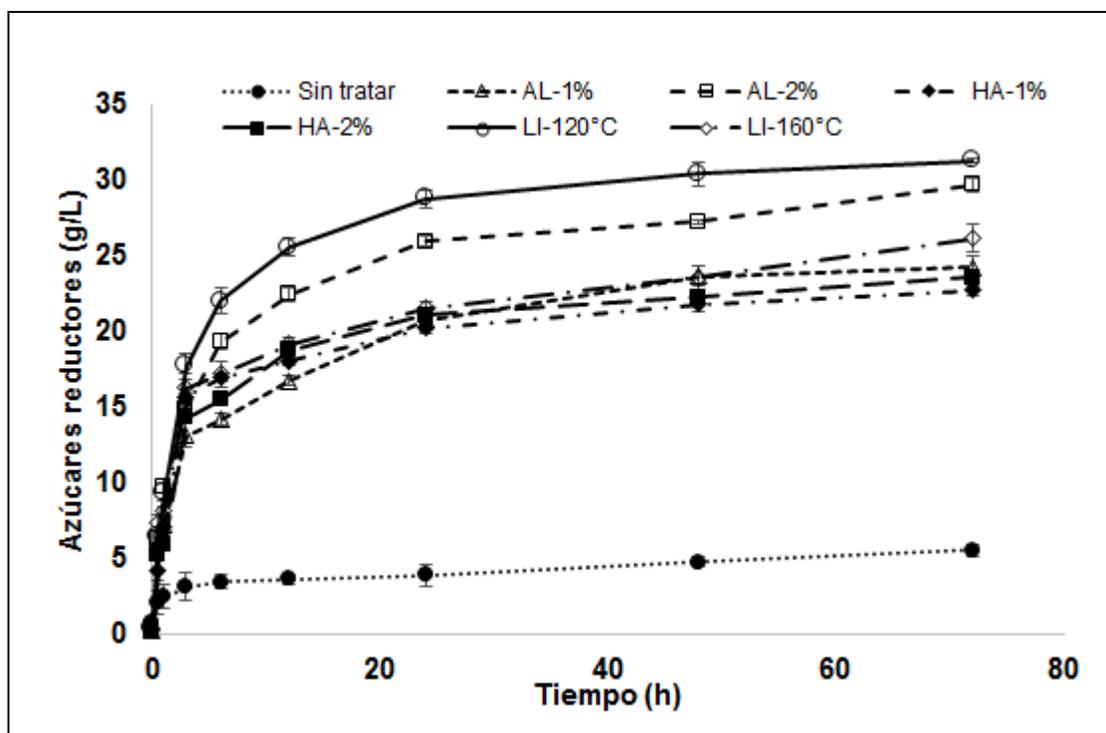
**Fig. 16.** Producción de azúcares reductores en bagazo de agave pretratado con NaOH utilizando una carga de sólidos del 9, 12 y 15 %.

Se evaluó el potencial de producción de azúcares a partir de bagazo de agave pretratado con AL, HA y LI [Emim]OAc, utilizando una carga enzimática constante y un contenido de celulosa normalizado (20 g celulosa/L). Los resultados se presentan en la Fig.17.

El BAG pretratado con LI [Emim]OAc mostró los valores más elevados de azúcares reductores durante el proceso de sacarificación alcanzando 31.3 g/L para [Emim]OAc-120 °C a las 72 h mientras que para [Emim]OAc-160 °C fue de 26.2 g/L. Por otra parte, la muestra con el pretratamiento alcalino alcanzó 24.3 g/L y 29.7 g/L para AL-1 y AL-2 %, respectivamente. Por último, el BAG pretratado con ácido diluido se obtuvieron 22.7 y 23.5 g/L para HA-1% y HA-2 %, respectivamente.

La pérdida de enlaces por puente de hidrógeno intra e intermoleculares da como resultado una celulosa amorfa la cual provee de un área de superficie incrementada dando como resultado una mejor accesibilidad a las enzimas y mayores sitios de unión en las fibras de celulosa recuperadas en el material pretratado.

La diferencia en la cantidad total de azúcares liberados de los tres pretratamientos puede ser atribuida a las diferencias en las estructuras de la celulosa amofra del pretratamiento con líquidos iónicos, una celulosa más cristalina y menor cantidad de hemicelulosa para el pretratamiento con hidrólisis ácida diluida y la remoción de lignina, además de la mayor área de superficie accesible para el pretratamiento con hidrólisis alcalina (Li et al., 2010; Xu et al., 2010).

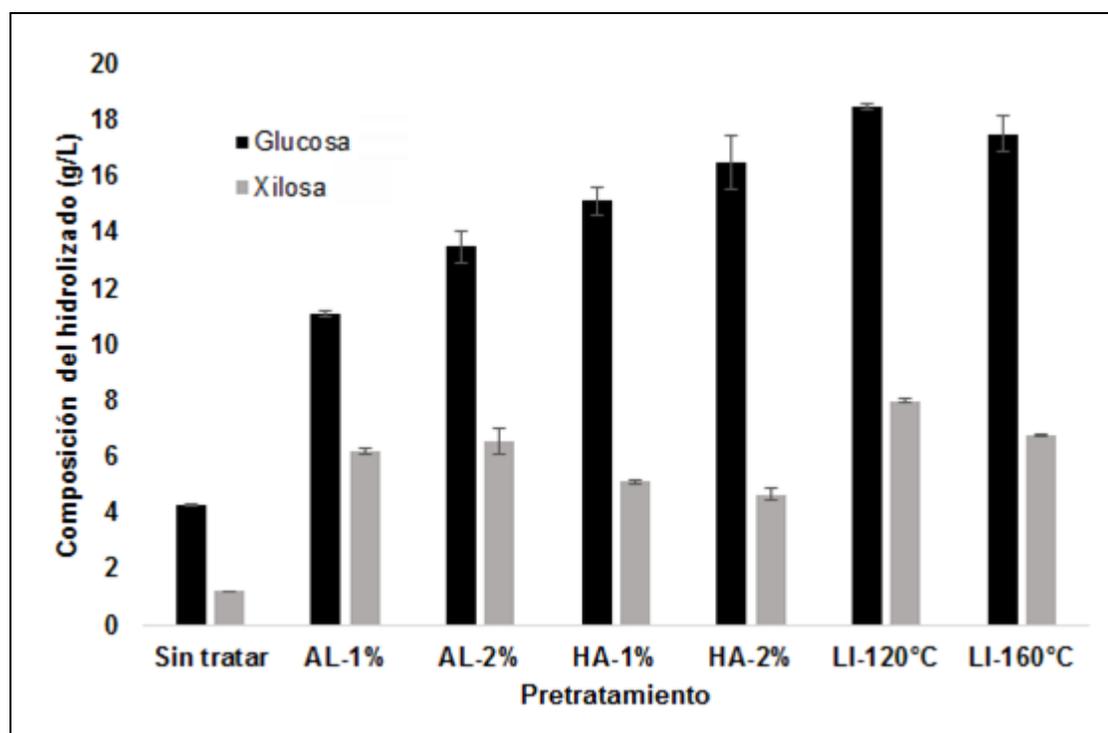


**Fig. 17.** Azúcares reductores en bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y líquidos iónicos (LI-[Emim]OAc).

La Fig. 18 presenta el contenido de glucosa y xilosa a las 72 h en los sacarificados de BAG sin tratar y pretratado. Existe una concordancia con los valores reportados de azúcares reductores en la Fig. 15, que representa una carga del 6% en la que acumulando los valores de glucosa y xilosa se obtienen valores similares.

Las muestras de BAG pretratadas con LI [Emim]OAc liberaron, durante la sacarificación enzimática, una elevada concentración de glucosa, obteniéndose los valores superiores de todas las muestras evaluadas con [Emim]OAc-120 y -160 °C resultando en 18.5 g/L y 17.5 g/L, respectivamente.

Asimismo, continuando en orden descendente con las muestras pretratadas con HA y AL, se obtuvo la concentración más elevada de glucosa utilizando HA-2% y AL-2%, resultando en 16.50 g/L y 13.49 g/L respectivamente. En cambio, el BAG sin tratar produjo solamente 4.30 g/L de glucosa. Sin embargo, para el BAG pretratado con AL, aunque produjo una cantidad elevada de azúcares reductores durante la sacarificación ésto no se tradujo en una alta conversión en glucosa debido posiblemente a la formación de una cantidad elevada de otros azúcares tales como la celobiosa. Por otra parte, la producción más alta de xilosa fue de 8.02 g/L al sacarificar al BAG pretratado con [Emim]OAc-120 °C, mientras el valor inferior para las muestras pretratadas fue de 4.67 g/L con HA-2%, como era de esperarse ya que presenta el menor contenido de hemicelulosa. Cuando se compara la producción de glucosa obtenida con las dos cargas utilizadas de celulosa (5 y 20 g/L) en el punto final de la sacarificación (72 h), el BAG pretratado con [Emim]OAc-120 °C presentó la producción más elevada de todas las condiciones estudiadas con 5.26 g/L (Fig. 14) y 18.5 g/L (Fig. 18).

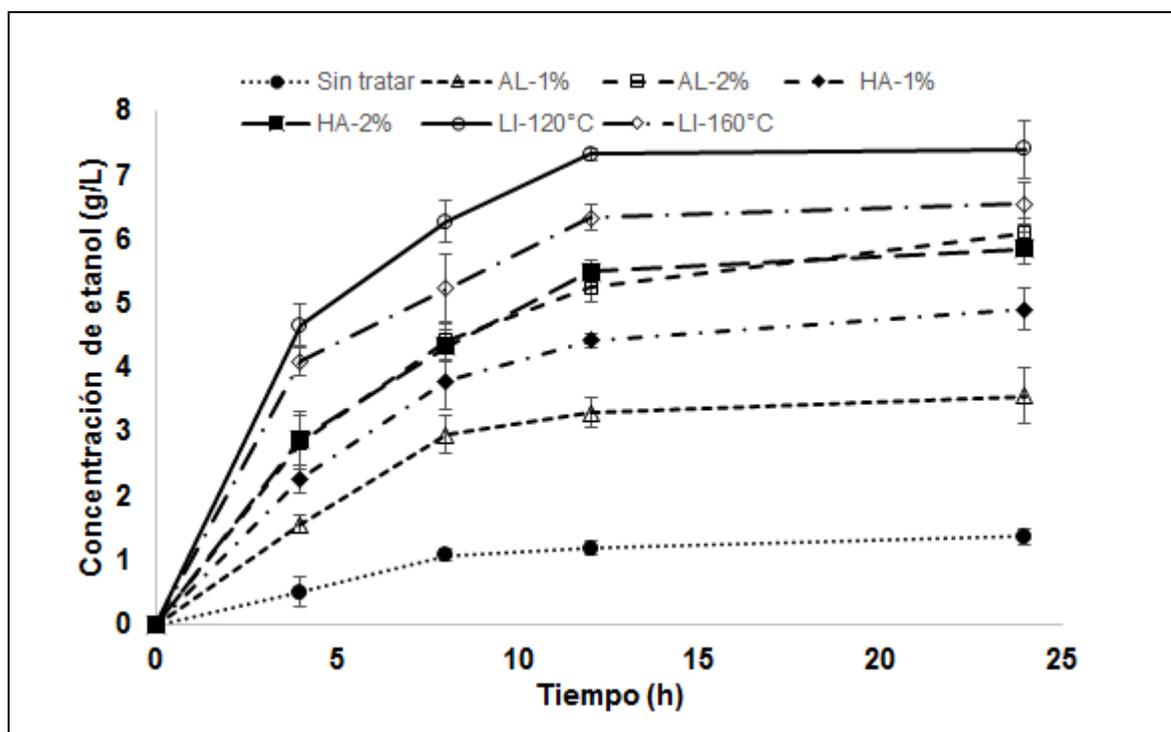


**Fig. 18.** Producción de glucosa y xilosa a 72 h de sacarificación de bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y LI-[Emim]OAc. Las barras de error muestran la desviación estándar de

mediciones por triplicado.

### 6.8. Fermentación alcohólica

Con la finalidad de probar los sacarificados obtenidos de BAG sin tratar y pretratados con AL, HA y el LI [Emim]OAc, en la producción en etanol, se llevaron a cabo ensayos de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* (CDBB-L-331). La fermentación se dejó por 24 h. La producción de etanol más elevada se obtuvo con los sacarificados de las muestras pretratadas con LI [Emim]OAc-120 °C y LI [Emim]OAc-160 °C resultando en 7.4 y 6.6 g/L, respectivamente. A partir del sacarificado de BAG tratado con AL-2% se obtuvo un valor cercano a los anteriores, 6.1 g/L, mientras que el sacarificado de BAG con AL-1% sólo se obtuvo 3.6 g/L. Del sacarificado del material sin tratar se obtuvo solamente 1.4 g/L de etanol (Fig. 19). Es de resaltar que de los sacarificados de las muestras pretratadas con LI [Emim]OAc se tuvieron los valores más elevados de producción de etanol seguidos por HA y AL.



**Fig. 19.** Producción de etanol de los sacarificados de bagazo de agave pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y líquido iónico ([Emim]OAc).

Los resultados ponen de manifiesto el efecto favorable de los pretratamientos en la sacarificación del BAG para su posterior conversión a etanol. La producción de etanol sucedió en las primeras 8 h de la fermentación y a partir de este punto se disminuyó la velocidad de formación del producto, siendo más marcada a partir de las 12 h de proceso. Lo anterior pudo deberse a un rápido consumo de la glucosa presente en los sacarificados dejando remanente a la xilosa ya que *S. cerevisiae* carece de la capacidad de fermentar pentosas.

Se determinaron los rendimientos de conversión de celulosa a etanol ( $R_{E/C}$ ) con base en la cantidad normalizada de celulosa inicial (20 g/L) empleada en la sacarificación enzimática, y los rendimientos de glucosa a etanol ( $R_{E/G}$ ) basándose en la cantidad de glucosa consumida y convertida en etanol durante la fermentación. Asimismo, se determinó la eficiencia de conversión obtenida a partir de la relación entre la cantidad de etanol teórico y el etanol real obtenido (Tabla 12).

Al comparar los  $R_{E/G}$  del BAG pretratado con base en el material sin tratar, resultan valores cercanos desde 0.32 a 0.45 g etanol/ g glucosa. Asimismo, al comparar los  $R_{E/C}$  entre sí resulta evidente la importancia del pretratamiento en el proceso global de producción de etanol obteniéndose el valor superior de 0.37 g etanol/g celulosa con BAG pretratado con el LI [Emim]OAc-120 °C mientras que a partir del BAG sin tratar se obtuvo 0.07 g etanol/g celulosa, lo cual significó un incremento de 5.3 veces.

Por otra parte, la eficiencia de conversión en etanol para las condiciones de proceso estudiadas en BAG se encontró dentro del intervalo del 63 al 89 % obteniéndose su valor inferior (63 %) a partir de los azúcares liberados por BAG sin tratar.

La eficiencia de fermentación más elevada se consiguió utilizando los sacarificados de BAG pretratado con AL-2% resultando en ~89%, mientras que el BAG pretratado con LI [Emim]OAc-120 °C, su sacarificado obtuvo valores cercanos al 80%, eficiencia superior cuando se compara con lo obtenido a partir de HA.

**Tabla 12.** Rendimientos de producción de etanol a partir de los sacarificados de bagazo de agave (BAG) pretratado con hidrólisis alcalina (AL), hidrólisis ácida diluida (HA) y líquidos iónicos (LI-[Emim]OAc).

Material (20 g celulosa iniciales)	Glucosa (g/L)	Etanol obtenido (g/L)	Etanol teórico (g/L)	$R_{E/C}$ (g etanol/ g celulosa) <sup>1</sup>	$R_{E/G}$ (g etanol/ g glucosa) <sup>2</sup>	Eficiencia (%) <sup>3</sup>
Sin tratar	4.3±0.1	1.4±0.1	2.2±0.0	0.07±0.00	0.32±0.01	63.0±2.5
AL-1%	11.1±0.2	3.6±0.2	5.7±0.1	0.18±0.01	0.32±0.01	63.0±2.9
AL-2%	13.5±0.8	6.1±0.4	6.9±0.4	0.31±0.02	0.45±0.00	88.9±0.2
HA-1%	15.1±0.7	4.9±0.3	7.7±0.4	0.25±0.01	0.33±0.00	63.8±0.8
HA-2%	16.5±1.0	5.9±0.3	8.4±0.5	0.30±0.02	0.36±0.01	69.7±1.6
LI-120 °C	18.5±0.2	7.4±0.4	9.4±0.1	0.37±0.02	0.40±0.02	78.7±3.9
LI-160 °C	17.5±0.9	6.6±0.4	8.9±0.5	0.33±0.02	0.37±0.00	73.5±0.6

<sup>1</sup>Rendimiento de celulosa a etanol = g etanol obtenido / g celulosa

<sup>2</sup>Rendimiento de glucosa a etanol = g etanol obtenido / g glucosa

<sup>3</sup>Eficiencia = (etanol obtenido / etanol teórico) x 100

Caspeta et al. (2014) reportaron la producción de etanol a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos de muestras de BAG pretratado mediante una combinación de etanol, ácido sulfúrico y agua utilizando diferentes temperaturas y tiempos de residencia. En el mismo reporte, al sacarificar BAG pretratado mediante organosolventes provenientes de bioreactores con 10% y 20 % en peso de sólidos obtuvieron concentraciones de 44.2 y 90.2 g glucosa/L los cuales después de fermentar, se lograron tener 21.4 y 40.5 g etanol/L, respectivamente. Asimismo, éstos representaron una eficiencia de conversión del máximo teórico de glucosa a etanol de 95% y 88%, respectivamente. Finalmente, cuando se comparan estos resultados con la eficiencia de conversión en etanol del sacarificado obtenido del BAG pretratado con [Emim]OAc-120 °C (~80%) éste representa un valor competitivo teniendo en cuenta el alto contenido de azúcares que se produjeron durante la sacarificación enzimática.

## 7. CONCLUSIONES

El oxalato de calcio es un componente importante del BAG, y su presencia contribuyó negativamente al pretratamiento con LI [Bmim]Cl en términos de deslignificación, 12.2 % vs. 20.2 % cuando se compara con BEX. De igual manera sucedió con la producción de azúcares reductores.

Los microcristales libres y de mayor tamaño de oxalato de calcio en la superficie del BEX reaccionaron negativamente con PHA durante el pretratamiento resultando en un cambio negativo en la cristalinidad del 7 %, por lo que se deben tomar precauciones al utilizar pretratamientos con oxidantes fuertes en materiales con alto contenido de oxalato de calcio.

De los diferentes pretratamientos a los que se sometió el BAG, el pretratamiento con líquidos iónicos tuvo la mayor deslignificación (20.2 %) y además, un elevado enriquecimiento de celulosa (29.7 %). El índice de cristalinidad en BAG pretratado con LI [Bmim]Cl y PHA mostró una notable reducción de celulosa cristalina, observándose el cambio más significativo con LI-160 °C con un ICr de 39 % al compararse con el BAG sin tratar ICr de 17 %.

Durante la sacarificación enzimática del BAG, la mayor producción de glucosa (18.5 g/L) y xilosa (8.0 g/L) se obtuvo con las muestras pretratadas con el líquido iónico [Emim]OAc cuando se compara con algunos pretratamientos consolidados como la hidrólisis ácida diluida (HA) e hidrólisis alcalina (AL). Asimismo, al sacarificar el BAG pretratado con [Emim]OAc se obtuvieron conversiones de celulosa a glucosa superiores al 90 % en un menor periodo de tiempo (24 h) al empleado en el tiempo total de sacarificación (72 h).

A partir de los sacarificados de las muestras de BAG pretratadas con LI [Emim]OAc-120 °C, se obtuvo la mayor concentración de etanol (7.4 g/L) y con un rendimiento de celulosa a etanol de 0.37 g etanol/ g celulosa, lo que refleja el potencial del BAG pretratado en esas condiciones para ser usado en la producción de azúcares y su posterior conversión a etanol en una biorefinería.

## 8. REFERENCIAS

- Al-Wahsh, I.A., Wu, Y., Liebman, M., 2012. A comparison of two extraction methods for food oxalate assessment. *Food Research* 1:233-239.
- Arora, R., Manisseri, C., Li, C., Ong, M.D., Scheller, H.V., Vogel, K., Simmons, B.A., Singh, S., 2010. Monitoring and analyzing process streams towards understanding ionic liquid pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *BioEnergy Research* 3:134-145.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Saez F., Ballesteros M., 2001. Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of olive oil extraction. *Applied Biochemical Biotechnology* 91/93:237-252.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Negro, M., Oliva, J., Saez, F., 2008. Dilute-Sulfuric acid pretreatment of Cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal* 42:84-91.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J.S., Hodge, D., Walton, J., 2011. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels* 4:1-16.
- Borland, A.M., Griffiths, H., Hartwell, J., Smith, J.A., 2009. Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany* 60:2879–2896.
- Brandt, A., Grasvik, J., Hallet, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry* 15:550-583.
- Caspeta, L., Caro-Bermudez, M.A., Ponce-Noyola, T., Martinez, A., 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loading for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy* 113:277-286.
- Castro-Martínez, C.C., Valverde, M.E., Paredes-López, O., 2009. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Revista Ide@s Concyteg* 54:1246–1270.
- Cheng, G., Varanasi, P., Li, C., Liu, H., Melnichenko, Y.B., Simmons, B.A., Kent, M.S., Singh, S., 2011. Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules* 12:933-941.
- Cheng, G.; Varanasi, P.; Arora, R.; Stavila, V.; Simmons, B.A.; Kent, M.S.; Singh, S., 2012. Impact of Ionic Liquid pretreatment conditions on cellulose crystalline structure using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Journal of Physical Chemistry B* 116:10049-10054.
- da Costa, L., Chundawat, S.P.S, Venkatesk, B., Dale, B.E., 2009. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion on Biotechnology* 20:339-347.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., 2006. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnology and Bioengineering* 95:904-910.
- Davis, S.C., Dohleman, F.G., Long, S.P., 2011. The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* 3:68-78.
- Demirbaş, A., 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy sources*; 27:328-329.
- de Wild, P., Reith, H., Heeres, E., 2011. Biomass pyrolysis for chemicals. *Biofuels* 2:185-208
- Dien, B., Hespell, R.B., Wyckoff, H.A., Bothast, R.J., 1998. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme and Microbial Technology* 23:366-371.
- Feng, L., Cheng, Y.Z., 2008. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids* 142:1-5.
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56:41-71.
- Fukushima, R.S., Hatfield, R.D., 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52:3713-3720.
- Hoekstra, T.W., Shachak, M. (eds.), 1999. Arid Lands Management: Toward Ecological Sustainability Urbana. *University of Illinois Press*, Illinois.
- Jørgensen H., Kristensen J.B., Felby C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefineries* 1:119–134.

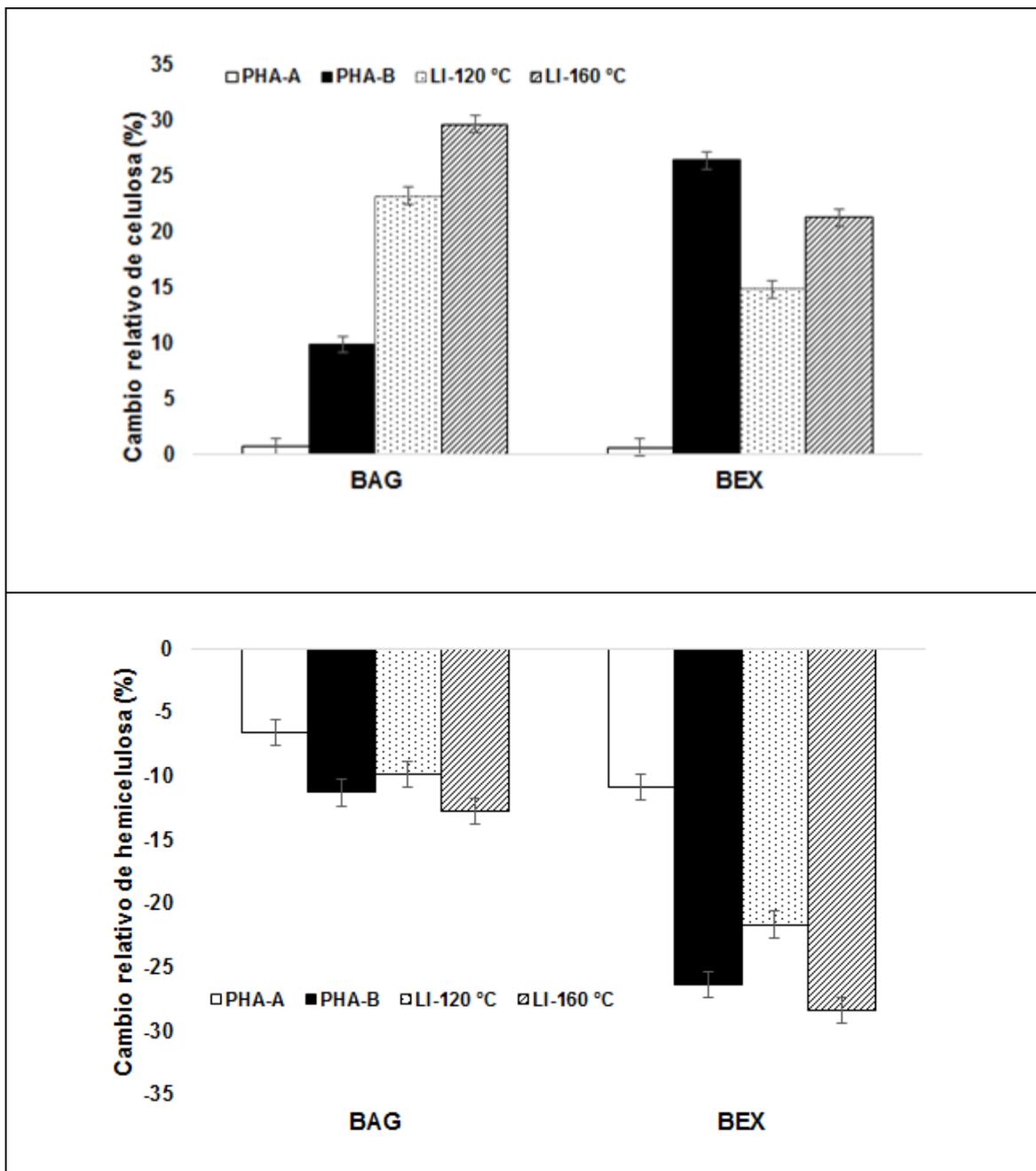
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009a. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48:3713-3729.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009b. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 100:3948-3962.
- Lee, S.H., Doherty, T.V., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2009. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 102:1368-1376.
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H.V., Auer, M., Vogel, K.P., Simmons, B.A., Singh, S., 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 101:4900-4906.
- Li, C., Cheng, G., Balan, V., Kent, M.S., Ong, M., Chundawat, S.P., Sousa, L.D., Melnichenko, Y.B., Dale, B.E., Simmons, B.A., Singh, S., 2011. Influence of physic-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 102:6928-6936.
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:627-642.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- Monje, P.V., Baran, E.J., 2010. Characterization of calcium oxalate biominerals in some (non-cactaceae) succulent plant species. *Zeitschrift für Naturforsch* 65c:429-432.
- Montgomery, D.C., 1991. Design and Analysis of Experiments. 3rd ed. New York: *John Wiley*.
- 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.
- Nakata, P.A., 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164:901-909.
- Nevin, A.; Melia, J.L.; Osticioli, I.; Gautier, G.; Colombini, M.P., 2008. The identification of copper oxalates in a 16<sup>th</sup> century Cypriot exterior wall painting using micro FTIR, micro Raman spectroscopy and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Cultural Heritage* 9:154-161.
- Nguyen, T.D., Kim, K., Han, S.J., Cho, H.Y., Kim, J.W., Park, S.M., Park, J.C., Sim, S.J., 2010. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocelluloses conversion to fermentable sugars. *Bioresource Technology* 101:7432-7438.
- Nidetzky, B., Steiner, W., 1993. A new approach for modeling cellulose-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 42:469-479.
- Nobel, P.S., 1983. Nutrients levels in cacti-relation to nocturnal acid accumulation and growth. *American Journal of Botany* 70:1244-1253.
- Nobel, P.S., Berry, W.L., 1985. Element responses of agaves. *American Journal of Botany* 72:686-694.
- Peannisi, S.V., McConell, D.B., Gower, L.B., Kane, M.E., Lucansky, T., 2001. Intracellular calcium oxalate crystal structure in *Dracaena sanderiana*. *New Phytologist* 150:111-120.
- Pérez-Pimienta, J.A., López-Ortega, M.G., Varanasi, P., Stávila, V., Cheng, G., Singh, S., Simmons, B.A., 2013. Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Bioresource Technology* 127:18-24.
- Prychid, C.J.; Rudall, P.J., 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of Botany* 84:725-739.
- Quintero, J.A., Moncada, J., Cardona, C.A., 2013. Techno-economic analysis of bioethanol production from lignocellulosic residues in Colombia; A process simulation approach. *Bioresource Technology* 139:300-307.
- Radillo, J.J.V., Ruiz-López, M.A., Macías, R.R., Ramírez, L.B., García-López, P.M., Toral, F.A.L., 2010. Fermentable sugars from *lupinus rotundiflorus* biomass by hydrochloric acid hydrolysis. *Bioresources* 6:344-355.

- Ruiz-Corral, J.A., 2007. Conocimiento y practicas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. *INIFAP Libro Técnico* Num. 4:13-36.
- Salinas, M.L., Ogura, T., Soffchi, L., 2011. Irritant contact dermatitis caused by needlelike calcium oxalate crystals, raphides, in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact Dermatitis* 44:94-96.
- Selig, M.J., Vinzant, T.B., Himmel, E.M., Decker, S.R., 2009. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 155:397-406.
- Singh, S., Simmons, B.A., Vogel, K.P., 2009. Visualization of biomass solubilization and cellulose regeneration during ionic liquid pretreatment of switchgrass. *Biotechnology and Bioengineering* 104:68-75.
- Skoog, K., Hahn-Hägerdal, B., 1988. Xylose fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 10:66-80.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2006. Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction samples. TP-510-42623 *NREL Analytical Procedure*. National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008a. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. LAP-002 *NREL Analytical Procedure*. National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008b. Determination of ash in biomass. LAP-005 *NREL Analytical Procedure*. National Renewable Energy Laboratory.
- Smith, A.M., 2008. Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant Journal* 54:546-558.
- Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S.C., Long, S.P., 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science* 329:790-792.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology* 83:1-11.
- Sun, N., Rahman, M., Qin, Y., Maxim, M.L., Rodriguez, H., Rogers, R.D., 2009. Complete dissolution and partial delignification of Wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chemistry* 11:646-655.
- Sun, F., Roderick, M.L., Farquhar, G.D., Lim, W.H., Zhang, Y., Bennett, N., Roxburgh, S.H., 2010. Partitioning the variance between space and time. *Geophysical Research Letters*, 37, L12704.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2002. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 124: 4974-4975.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 9:1621-1651.
- Tan, H.T., Lee, K.T., Mohamed, A.R., 2011. Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimization study using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 83:1862-1868.
- Teramoto, Y., Tanaka, N., Lee, S-H, Endo, T., 2007. Pretreatment of eucalyptus wood chips for enzymatic saccharification using combined sulfuric acid-free ethanol cooking and ball milling. *Biotechnology and bioengineering* 99:75-85.
- Torget, R., Walter, P., Himmerl, M., Grohmann, K., 1991. Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28/29:75-86.
- Travaini, R., Morales Otero, M.D., Coca, M., da-Silva, R., Bolado, S., 2013. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresource Technology* 133:332-339.
- Wyman, C. E., 1996. Ethanol production from lignocellulosic biomass Overview. En: *Handbook on bioethanol: Production and utilization*. Taylor and Francis, Washington, DC, Capítulo 1:1-18.
- Xu, J., Cheng, J.J., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., 2010. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. *Energy & Fuels* 24:2113-2119.
- Yang, B., Wyman, C., 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 86:88-95.
- Yang, B., Wyman, C., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2:26-40.

- Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J., Spiess, A.C., 2009. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-) cellulose. *Bioresource Technology* 100:2580-2587.
- Zakrzewska, M.E., Bogel-Lukasik, E., Bogel-Lukasik, R., 2011. Ionic Liquid-Mediated Formation of 5-Hydroxymethylfurfural-A Promising Biomass-Derived Building Block. *Chemical Reviews* 111:397-417.
- Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzaple, M.T., 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology* 99:3817-3828.
- Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Vinzant, T., Schell, D.J., McMillan, J.D., Zhang, Y.H., 2009. Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fractionation: enzymatic hydrolysis, supramolecular structure and substrate accessibility. *Biotechnology and bioengineering* 103:715-724.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1



**Fig. 1.1.** Cambios relativos de la celulosa y hemicelulosa de la biomasa (bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BAE) sometido a los pretratamientos con líquidos iónicos y peróxido de hidrógeno alcalino sobre los sólidos sin tratar. Cambio relativo = (valor de los sólidos pretratados - valor de los sólidos sin tratar) / valor de los sólidos pretratados; donde los valores positivos indican incremento. Las desviaciones son el error estándar del diseño experimental (Montgomery, 1991).

## 9.2. Anexo 2.

**Tabla 2.1.** Resultados del análisis de varianza del cambio relativo de la celulosa.

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>Prob</b>	
Modelo	2641.87	7	377.41	223.93	<0.0001	significativo
A	0.050	1	0.050	0.030	0.8649	
B	2021.20	3	673.73	399.74	<0.0001	
AB	620.62	3	206.87	122.74	<0.0001	
Error	26.97	16	1.69			
Cor Total	2668.84	23				

A = biomasa; B = pretratamiento; SC = suma de cuadrados; GL = grados de libertad; MC = media de cuadrados; F = Valor de F; Prob = probabilidad > F

### 9.3. Anexo 3.

**Tabla 3.1.** Análisis de varianza del cambio relativo de la hemicelulosa.

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>Prob</b>	
Modelo	1436.72	7	205.25	65.64	<0.0001	significativo
A	820.87	1	820.87	262.51	<0.0001	
B	491.12	3	163.71	52.35	<0.0001	
AB	124.73	3	41.58	13.30	0.0001	
Error	50.03	16	3.13			
Cor Total	1486.75	23				

A = biomasa; B = pretratamiento; SC = suma de cuadrados; GL = grados de libertad; MC = media de cuadrados; F = Valor de F; Prob = probabilidad > F

#### 9.4. Anexo 4.

**Tabla 4.1.** Análisis de varianza de la deslignificación de bagazo de agave (BAG) y bagazo de agave extraído (BEX).

<b>Fuente</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>Prob</b>	
Modelo	578.47	7	82.64	26.11	<0.0001	significativo
A	74.45	1	74.45	23.52	0.0002	
B	421.73	3	140.58	44.41	<0.0001	
AB	82.30	3	27.43	8.67	0.0012	
Error	50.65	16	3.17			
Cor Total	629.12	23				

A = biomasa; B = pretratamiento; SC = suma de cuadrados; GL = grados de libertad; MC = media de cuadrados; F = Valor de F; Prob = probabilidad > F