SEP SES TecNM

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Toluca

“HIDRÓLISIS DE TALLO DE HABA Y OLOTE, Y EL USO POTENCIAL DE LOS AZÚCARES OBTENIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

JULIO CÉSAR GÓMORA HERNÁNDEZ
No. CONTROL: 0628D0629

DIRECTORA:
DRA. MARÍA DEL CARMEN CARREÑO DE LEÓN (ITT)

CODIRECTORA:
DRA. SUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE (ININ)

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, A 12 DE AGOSTO DE 2020

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Metepec, Edo. de México., 04/septiembre/2020
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
DEPI-3200-375/2020

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E

Por este medio comunicamos a usted que la comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **"HIDRÓLISIS DE TALLO DE HABA Y OLOTE, Y EL USO POTENCIAL DE LOS AZÚCARES OBTENIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO"**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias Ambientales presenta el **C. JULIO CÉSAR GÓMORA HERNÁNDEZ** con número de control **0628D0629** para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad para proceder a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

DRA. MARÍA DEL CARMEN CARREÑO DE LEÓN
DIRECTORA DE TESIS

DRA. SUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE
CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA DEL CONSUELO HÉRNANDEZ BERRIEL
REVISORA DE TESIS

EDUCACIÓN
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DR. ISAIAS DE LA ROSA GÓMEZ
REVISOR DE TESIS

DR. JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO
REVISOR DE TESIS

DR. NICOLÁS FLORES ÁLAMO
REVISOR DE TESIS

Metepec, Edo. de México., 09/septiembre/2020
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
DEPI-3200-381/2020

C. JULIO CÉSAR GÓMORA HERNÁNDEZ
CANDIDATO AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica dependiente de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su trabajo de Tesis titulado **"HIDRÓLISIS DE TALLO DE HABA Y OLOTE, Y EL USO POTENCIAL DE LOS AZÚCARES OBTENIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO"**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E

"Educación, integridad y ciencia"

EDUCACIÓN
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

JLGR/IMAB

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental del Instituto Tecnológico de Toluca bajo la asesoría de la Dra. María del Carmen Carreño de León y en el Laboratorio D del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del mismo instituto con el invaluable apoyo del Dr. Nicolás Flores Álamo.

La investigación también se realizó en el Departamento de Química de la Gerencia de Ciencias Básicas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares dentro del proyecto “Investigación en obtención y almacenamiento de hidrógeno y en materiales multifuncionales para electrólisis del agua y celdas de combustible” bajo la asesoría de la Dra. Suilma Marisela Fernández Valverde y en el Departamento de Radiobiología con el enorme apoyo del Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero.

Los análisis por cromatografía de líquidos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato con la colaboración de la Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez.

“No sólo practiques tu arte, sino esfuérzate por alcanzar sus secretos, por el conocimiento y la verdad que hacen al hombre rozar la divinidad”

Ludwig Van Beethoven

“El primer trago del vaso de las ciencias naturales te hará ateo, pero en el fondo del vaso Dios te está esperando”

Werner Heisenberg

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para adentrarte en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

A G R A D E C I M I E N T O S

A DIOS

Por la dicha de vivir, aprender, crecer y sentir, por las bendiciones que día a día se manifiestan a través de la vida, por las enseñanzas adquiridas tras los obstáculos, por el amor y comprensión que nos da la capacidad de disfrutar plenamente la existencia.

A MI PADRE (†)

Anastacio Gómora Pichardo por su amor incondicional, consejos, tiempo y apoyo. Por haberme guiado con honradez y dedicación, y ser más que un padre para mí. Por todas las enseñanzas que me dio a lo largo de la vida y fomentar en mí el espíritu de superación y constancia. Este es un logro que hemos alcanzado juntos.

A MI MADRE

Hermelinda Hernández Guzmán por su invaluable apoyo, amor, tiempo y dedicación. Por impulsarme a seguir adelante día tras día y enseñarme a no rendirme pese a las adversidades. Con mucho amor y agradecimiento.

A MI FAMILIA

A Karina Abigail Hernández Hernández y a mi hija Elizabeth Janeth Gómora Hernández por brindarme su cariño y apoyo incondicional. Por haberme motivado a seguir adelante y regalarme inmensos momentos de felicidad que le dieron un toque especial a mi formación profesional. Por su paciencia, detalles, palabras de aliento y estar a mi lado incluso en los momentos más difíciles.

A MI HERMANA Y SOBRINOS

Claudia Gabriela Gómora Hernández por toda la vida que hemos compartido, por las experiencias vividas y el apoyo que me has dado. A mis sobrinos Gustavo Molina

Gómora y Jeshua Molina Gómora por las alegrías, detalles, y cariño y el haberme mostrado que lo más bonito se encuentra en las cosas más sencillas.

A MI ABUELITA (†)

Emma Judith Pichardo Puentes por todo su amor, tiempo, sacrificios, lucha, risas y anécdotas que compartió conmigo. Gracias porque los consejos y recuerdos siempre estarán a mi lado guiándome.

A MI FAMILIA Y AMIGOS

Agradezco de todo corazón el cariño y los momentos compartidos. Agradezco mucho la motivación, palabras de aliento y sobretodo el mostrarme que los lazos sanguíneos no crean una familia, sino el cariño, apoyo y resguardo de las personas para las que eres importante.

A LA DRA. SUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE

Por ser mi mentora, maestra y amiga, por su tiempo, asesoría, consejos, cariño y el fomentar en mí el espíritu de curiosidad y autodidacta que me ha permitido alcanzar este logro. Trabajar con ella ha sido una experiencia inigualable, desde el punto de vista académico y humano. Con enorme cariño, respeto, admiración y gratitud.

A LA DRA. MARÍA DEL CARMEN CARREÑO DE LEÓN

Por nunca dejar de creer en mí y permitirme desarrollar profesionalmente brindándome confianza, cariño y respaldo en todo momento. Muchas gracias por su inmenso apoyo y oportunidades que brindo las cuales que fueron importantes para mi desarrollo profesional. Con especial cariño y respeto.

AL DR. NICOLÁS FLORES ÁLAMO

Por todo el apoyo, consejos y confianza que me permitieron culminar el presente trabajo y crecer profesionalmente. Muchas gracias por las enseñanzas que me dio

desde la licenciatura y mostrarme que la constancia y dedicación son las claves para alcanzar las metas.

AL DR JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO

Por darme la oportunidad de trabajar y aprender de él. Por toda la confianza, facilidades y palabras que enriquecieron considerablemente el trabajo y mi persona.

AL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

Por las facilidades otorgadas durante la realización de este trabajo, por la formación académica, uso de las instalaciones y la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

Por permitirme realizar parte de la investigación en sus instalaciones, por la beca alimenticia y de transporte. A los técnicos del Departamento de Química por su oportuna participación en el análisis de muestras.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Por la beca otorgada.

D E D I C A T O R I A S

A KARINA ABIGAIL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Has estado siempre conmigo brindándome amor, confianza, tiempo y dedicación. Me mostraste lo valioso de la vida

A MI HIJA ELIZABETH JANETH GÓMORA HERNÁNDEZ

Has llegado en el momento más preciso y nos has colmado de alegría y amor

A MIS PADRES

Con eterno amor, respecto, agradecimiento

A MI HERMANA Y SOBRINOS

Con cariño para aquellos que de diferentes formas me han hecho estar bien

A MI FAMILIA

A todas aquellas personas, amigos, compañeros, alumnos que aportaron de manera indirecta al trabajo con consejos, auxilio, preguntas o simplemente con una sonrisa o palabra de aliento que me motivo a trabajar más.

RESUMEN

El problema de la emisión a la atmósfera de gases de efecto invernadero derivados del consumo excesivo de combustibles fósiles ha hecho necesaria la búsqueda de fuentes energéticas ambientalmente amigables y eficientes como el hidrógeno, que posee el poder calorífico más alto de entre todos los combustibles conocidos y al oxidarse genera principalmente vapor de agua como subproducto. El hidrógeno puede producirse a través de procesos bioquímicos utilizando materiales orgánicos residuales como la biomasa lignocelulósica, sin embargo debido a su estructura compleja y recalcitrante necesita tratamientos previos para su uso. La hidrólisis alcalina con NaOH del Tallo de Haba (TH) y del Rastrojo de Maíz (RM) no incrementó la producción de azúcares reductores, ya que en ambos casos se solubilizó a la lignina y se eliminó gran parte de la hemicelulosa. En el presente trabajo dos de los residuos agrícolas más importantes en el Estado de México; olote y TH se investigaron para producir azúcares reductores por hidrólisis con H_3PO_4 y posteriormente evaluar el potencial de dichos azúcares para la producción de biohidrógeno por fermentación, la caracterización del TH y del olote antes y después de la hidrólisis ácida también se reporta. La hidrólisis ácida se hizo a diferentes concentraciones de H_3PO_4, temperaturas y tiempos de reacción, el rendimiento de azúcares se incrementó al aumentar tanto la temperatura como la concentración del ácido, alcanzando los rendimientos más altos con 1.34 M H_3PO_4, 110 ºC y 300 minutos. La mayor cantidad de azucares se obtuvo con el olote. El estudio cinético y termodinámico mostró que en ambos materiales la hidrólisis es un proceso no espontáneo y endotérmico que involucra la formación de un complejo ácido-celulosa estable. El análisis por Cromatografía de Líquidos de Intercambio Aniónico (HPAEC-PAD) de los hidrolizados reveló que los azucares predominantes son; xilosa para el olote y glucosa para el TH, los cuales se utilizaron como fuente de carbono y se fermentaron con los microorganismos productores de hidrógeno. El hidrolizado de TH alcanzó los mayores rendimientos de producción de hidrógeno con una cantidad menor de azúcares, lo cual se atribuye a su alto contenido de glucosa y a su baja concentración de aldehídos. El TH además de ser un material novedoso para su revalorización resultó eficiente para la producción de biohidrógeno.

ABSTRACT

The emission of greenhouse gasses to the atmosphere mainly caused by the excessive fossil fuels burning has made necessary the search of new, efficient and environmental-friendly energy sources such as hydrogen. Among all known fuels, hydrogen has the highest calorific power and generates water as the main oxidation by-product; this fuel can be produced by biological routes employing residual organic materials such as lignocelluloses. Lignocellulosic materials have a complex physicochemical structure and high recalcitrance, thus some treatments are necessary to increase their fermentability. Alkaline treatment performed on corn stover (CS) and Stem of Faba Bean (SFB) was not efficient to improve reducing sugars production in the subsequent acid hydrolysis stage, this fact is due to the potential of alkaline treatment to solubilize not only lignin but also hemicellulose. In this work, two of the most important agricultural wastes generated in Mexico State; corncob and SFB were evaluated to produce reducing sugars by acid hydrolysis and the subsequent fermentative hydrogen production from their hydrolysates. Characterization of raw and hydrolyzed corncob and SFB was also investigated and reported. Acid hydrolysis was carried out using H_3PO_4 at different temperatures, reaction times and acid concentrations; reducing sugars production increased with a raise in hydrolysis temperature and acid loading reaching the maximum yields at 110 ºC, 1.34 M H_3PO_4 and 300 minutes reaction time. Kinetic and thermodynamic study of acid hydrolysis of both corncob and SFB showed the nature of the process; non-spontaneous and endothermic reaction which involves the formation of cellulose-water stable complex. HPLC and HPAEC-PAD analyses revealed the predominant sugars in hydrolysates of corn cob and SFB, they were: xylose and glucose respectively. Hydrolysates produced from both wastes were an adequate carbon sources for hydrogen producing microorganisms, however, STB hydrolysates achieved the highest yields and hydrogen rates which is associated to the high glucose content and the low aldehydes concentration in hydrolysate. In addition, STB was not only a novel material for it revalorization but also an efficient source to produce fermentative biohydrogen.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras xiv
Índice de Tablas xviii
INTRODUCCIÓN 1
1. FUNDAMENTOS 3
1.1 Residuos lignocelulósicos 3
1.1.1 Residuos agrícolas 5
1.2 Tratamiento de lignocelulosa 7
1.2.1 Tipos de pretratamiento 9
1.3 Tratamiento alcalino 12
1.4 Hidrólisis ácida 14
1.4.1 Azúcares fermentables e inhibidores 16
1.4.2 Factores que afectan a la hidrólisis ácida 18
1.4.3 Mecanismos y cinética de la hidrólisis ácida 21
1.5 Biohidrógeno 24
1.5.1 Mecanismos para la producción de biohidrógeno 24
1.6 Producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura 27
1.6.1 Rutas metabólicas dirigidas a la producción de biohidrógeno fermentativo 27
1.6.2 Factores que afectan la producción de biohidrógeno fermentativo 29
1.6.3 Microorganismos y sustratos utilizados en la producción de biohidrógeno 34
2. METODOLOGÍA 39
2.1. Preservación de los microorganismos 39
2.2. Obtención y caracterización de los residuos agrícolas 40
2.3. Tratamiento alcalino de los residuos agrícolas 40
2.4. Hidrólisis ácida de los residuos agrícolas 41
2.4.1 Análisis cinético y termodinámico de la hidrólisis ácida 43
2.5. Producción de biohidrógeno mediante fermentación 44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 48
3.1 Caracterización de los residuos agrícolas 48
3.2 Hidrólisis ácida del olote 49
3.2.1 Producción de azúcares reductores con olote y factor de severidad 49
3.2.2 Parámetros cinéticos y termodinámicos de la hidrólisis ácida del olote 54
3.2.3 Caracterización del olote hidrolizado 66
3.2.4 Análisis factorial de la hidrólisis ácida del olote 73
3.2.5 Hidrólisis del olote con ácido sulfúrico 88
3.3 Tratamiento alcalino del tallo de haba y del rastrojo de maíz 93
3.3.1 Delignificado del tallo de haba y del rastrojo de maíz 94

3.3.2 Hidrólisis ácida del tallo de haba y del rastrojo de maíz pretratados con NaOH 97
3.4 Hidrólisis ácida del tallo de haba 100
3.4.1 Producción de azúcares reductores 100
3.4.2 Parámetros cinéticos y termodinámicos de la hidrólisis ácida del tallo de haba 101
3.4.3 Caracterización del tallo de haba hidrolizado 107
3.5 Análisis cualitativo de los hidrolizados ácidos de olote y de tallo de haba 111
3.6 Hidrólisis ácida del rastrojo de maíz a bajas temperaturas 116
3.7 Rendimientos de la producción de azúcares y parámetros termodinámicos reportados en la literatura 118
3.8 Producción de biohidrógeno mediante fermentación 124
3.8.1 Resiembra de los microorganismos 124
3.8.2 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de olote 125
3.8.3 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de TH 126
3.8.4 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de olote y de TH. Efecto de la cantidad inicial de azúcares 129
CONCLUSIONES 135
REFERENCIAS 137
ANEXOS 162
Anexo A. Técnicas analíticas para sólidos 162
Anexo A1. Determinación de pH 162
Anexo A2. Determinación de humedad 162
Anexo A3. Determinación de SVT 163
Anexo A4. Preparación para sustrato libre de extractivos 164
Anexo A5. Determinación de holocelulosa 164
Anexo A6. Determinación de lignina 165
Anexo A7. Análisis por FTIR 166
Anexo A8. Análisis por DRX 166
Anexo B. Técnicas analíticas para líquidos 167
Anexo B1. Determinación de pH 167
Anexo B2. Determinación de azúcares reductores 167
Anexo B3. Determinación de furfural 168
Anexo B4. Determinación de HMF 169
Anexo B5. Conteo de bacterias 170
Anexo C. Análisis por cromatografía de gases 171
Anexo D. Diseño geométrico y construcción del reactor de hidrólisis tipo tanque agitado 172
Anexo E. Contribución científica 175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribución de la lignocelulosa en las paredes celulares de las plantas	5
Figura 1.2	Efecto del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica	8
Figura 1.3	Estructura molecular de la xilosa y de la glucosa	17
Figura 1.4	Producción de inhibidores a partir de a) hexosas y b) pentosas	17
Figura 1.5	Mecanismo de la hidrólisis ácida	21
Figura 2.1	Metodología general del trabajo de investigación	39
Figura 2.2	Metodología empleada para el tratamiento alcalino e hidrólisis ácida de los residuos agrícolas	42
Figura 3.1	Producción de azúcares reductores a partir de olote	50
Figura 3.2	Efecto de la concentración del ácido sobre la producción de azúcares reductores a a) 90 ºC y a b) 110 ºC utilizando olote	51
Figura 3.3	Efecto de la temperatura sobre la producción de azúcares reductores a con una solución a) 0.96 y a b) 1.34 M H_3PO_4 utilizando olote	51
Figura 3.4	FSC calculados para cada una de las hidrólisis del olote	53
Figura 3.5	Producción de azúcares reductores a partir del olote en función del FSC	54
Figura 3.6	Transformación de a) la celulosa a glucosa mediante hidrólisis ácida y b) deshidratación térmica de la glucosa a aldehídos y ácidos orgánicos	55
Figura 3.7	Datos experimentales de la producción de azúcares a partir de olote mediante hidrólisis con a) 0.58 M, b) 0.77 M, c) 0.96 M y d) 1.34 M H_3PO_4 ajustados al modelo cinético de Saeman	57
Figura 3.8	Datos experimentales de la producción de azúcares a partir de olote mediante hidrólisis con a) 0.58 M, b) 0.77 M, c) 0.96 M y d) 1.34 M H_3PO_4 ajustados al modelo cinético de primer orden	58
Figura 3.9	Efecto de la concentración del ácido sobre las constantes cinéticas de producción de azúcares calculadas a partir del a) Modelo de Saeman y del b) Modelo de primer orden	59
Figura 3.10	Constantes cinéticas k_1 del modelo de Saeman ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y b) Eyring	60
Figura 3.11	Constantes cinéticas obtenidas con el modelo de primer orden ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y b) Eyring	62
Figura 3.12	Comportamiento de los parámetros termodinámicos de la producción de azúcares calculados con el modelo cinético de a) Saeman y de b) Primer orden en función de la concentración del ácido	63
Figura 3.13	Constantes cinéticas k_2 del modelo de Saeman ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y b) Eyring	64

Figura 3.14 Espectros FTIR de las muestras de olote tomadas antes y después de 180 y 300 minutos de hidrólisis con 0.58 M H_3PO_4 y 100 ºC 67

Figura 3.15 Espectros FTIR de las muestras de olote tomadas antes y después de 180 y 300 minutos de hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC 68

Figura 3.16 Patrones de difracción de rayos X del olote antes y después de la hidrólisis ácida a diferentes condiciones de operación 69

Figura 3.17 Micrografías del olote a) antes y después de la hidrólisis durante 300 minutos con H_3PO_4 b) 1.34 M y 90 ºC, c) 0.96 M y 110 ºC, y d) 1.34 M y 110 ºC a 95 aumentos 71

Figura 3.18 Micrografías del olote a) antes y después de la hidrólisis durante 300 minutos con H_3PO_4 b) 1.34 M y 110 ºC, a 500 aumentos 72

Figura 3.19 Comportamiento de los valores calculados con los modelos cuadráticos en función de los valores experimentales para los a) azúcares reductores, b) furfural y c) FSC 78

Figura 3.20 Superficies de respuesta obtenidas para la producción de azúcares; a) Temperatura y concentración a 90 minutos, b) Temperatura y tiempo con 5 %v H_3PO_4 y c) concentración y tiempo a 110 °C 79

Figura 3.21 Superficies de respuesta obtenidas para la producción de furfural; a) Temperatura y concentración a 90 minutos, b) Temperatura y tiempo con 5 %v H_3PO_4 y c) concentración y tiempo a 110 ºC 81

Figura 3.22 Superficies de respuesta obtenidas para el FSC; a) Temperatura y concentración a 90 minutos, b) Temperatura y tiempo con 5 %v H_3PO_4 y c) concentración y tiempo a 110 ºC 82

Figura 3.23 Producción de a) azúcares y de b) furfural en función del FSC 83

Figura 3.24 Efecto de la a) temperatura y de la b) concentración del ácido sobre la producción de azúcares reductores a diferentes valores del FSC 84

Figura 3.25 Comportamiento de la concentración de furfural en función de la cantidad de azúcares reductores 85

Figura 3.26 Espectros FTIR de las muestras tomadas antes (línea negra) y después de la hidrólisis ácida con diferentes severidades; FSC=0.838 (línea roja) y FSC=1.164 (línea azul) 86

Figura 3.27 Comportamiento lineal observado entre a) producción de azúcares y transmitancia relativa, b) producción de furfural y transmitancia relativa, y c) FSC y transmitancia relativa. 87

Figura 3.28 Comportamiento de la producción de a) azúcares reductores y de b) furfural durante la hidrólisis del olote con ácido sulfúrico 1.34 M 89

Figura 3.29 Espectros Uv-Vis de los hidrolizados de olote a obtenidos a 110 ºC y 300 90

minutos utilizando ácido sulfúrico y fosfórico 1.34 M

Figura 3.30 Comportamiento de la producción de azúcares en función del FSC durante la hidrólisis del olote con ácido sulfúrico 91

Figura 3.31 Datos experimentales de la producción de azúcares mediante hidrólisis con 1.34 M ácido sulfúrico del olote ajustados al modelo cinético de Saeman 92

Figura 3.32 Espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después de 60 minutos de tratamiento con NaOH al 1 %p y 2 %p 95

Figura 3.33 Espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después del tratamiento con NaOH al 3 %p durante 60 y 120 minutos 96

Figura 3.34 Espectros FTIR de las muestras de RM tomadas antes y después del tratamiento con NaOH al 3 %p durante 60 y 120 minutos 97

Figura 3.35 Producción de azúcares reductores mediante hidrólisis con 0.96 M H_3PO_4 y 100 °C a partir de TH y RM con y sin tratamiento alcalino previo 98

Figura 3.36 Datos experimentales de la producción de azúcares mediante hidrólisis con 0.96 M H_3PO_4 y 100 ºC de a) TH sin tratamiento alcalino, b) TH con tratamiento alcalino, c) RM sin tratamiento alcalino y d) RM con tratamiento alcalino ajustados al modelo cinético de Saeman 99

Figura 3.37 Producción de azúcares reductores por hidrólisis ácida del TH 100

Figura 3.38 Efecto de la concentración del ácido fosfórico sobre la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis del TH a a) 90 ºC y b) 110 ºC 101

Figura 3.39 Datos experimentales de la producción de azúcares a partir de TH mediante hidrólisis con a) 0.58 M, b) 0.96 M y c) 1.34 M H_3PO_4 ajustados al modelo cinético de Saeman 102

Figura 3.40 Efecto de la concentración del ácido sobre las constantes cinéticas de producción de azúcares calculadas con el modelo de Saeman 104

Figura 3.41 Constantes cinéticas k_1 obtenidas con el modelo de Saeman para la hidrólisis del TH ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y de b) Eyring 105

Figura 3.42 Comportamiento del factor *A* determinados en la hidrólisis del TH en función de la concentración del ácido 106

Figura 3.43 Espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después de 180 y 300 minutos de hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC, utilizando un rango espectral de a) 2000 a 600 cm^{-1} y de b) 1450 a 1250 cm^{-1} 107

Figura 3.44 Espectros de difracción del TH antes y después de la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC 109

Figura 3.45 Micrografía del TH obtenida antes de la hidrólisis ácida 109

Figura 3.46 Micrografía del TH hidrolizado durante 300 minutos con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C 110

Figura 3.47	Cromatogramas de los hidrolizados de olote obtenidos con a) 0.58 M H_3PO_4, 90 °C y 30 minutos, y con b) 1.34 M H_3PO_4, 110 °C y 300 minutos	112
Figura 3.48	Cromatogramas de los hidrolizados de TH obtenidos con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C después de a) 30 y b) 300 minutos de tiempo de reacción	113
Figura 3.49	Relación entre las intensidades de los picos cromatográficos de la a) glucosa con trehalosa y arabinosa y de la b) xilosa con trehalosa y arabinosa	114
Figura 3.50	Cromatograma del hidrolizado de TH obtenido con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C después de 210 minutos de tiempo de reacción cambiar por la figura	115
Figura 3.51	Comportamiento del pH y del crecimiento bacteriano durante la fermentación de los hidrolizados de olote	126
Figura 3.52	Datos experimentales del crecimiento bacteriano obtenidos durante la fermentación del olote ajustados al modelo de Gompertz modificado	126
Figura 3.53	Producción de biohidrógeno y crecimiento bacteriano observado durante la fermentación de los hidrolizados de a) olote y de b) TH	130
Figura 3.54	Valores de pH determinados después de la fermentación de los hidrolizados de olote y de TH	131
Figura 3.55	Rendimientos de producción de biohidrógeno en función del volumen de hidrolizado obtenidos en la fermentación de los hidrolizados de olote y de TH	133
Figura B1	Reducción del ácido 3-5 dinitro salicílico para la cuantificación de azúcares	167
Figura B2	Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores	168
Figura B3	Curva de calibración para la determinación de furfural	169
Figura B4	Curva de calibración para la determinación de HMF	169
Figura C1	Curva de calibración empleada para la cuantificación de H_2	171
Figura D1	Dimensiones del reactor tipo tanque agitado a escala laboratorio	173
Figura D2	Reactor de hidrólisis tipo tanque agitado a escala laboratorio	174
Figura D3	Diseño en AutoCAD del reactor de hidrólisis tipo tanque agitado	174

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Resumen del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en algunos residuos agrícolas comunes	5
Tabla 1.2	Composición química del rastrojo de haba	6
Tabla 1.3	Producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura a partir de diferentes sustratos	36
Tabla 1.4	Rendimientos citados en la literatura para la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados ácidos	38
Tabla 2.1	Composición del medio de cultivo utilizado en las fermentaciones	45
Tabla 3.1	Caracterización de los residuos agrícolas	48
Tabla 3.2	Efecto de las variables sobre la producción de azúcares a partir de la hidrólisis del olote	52
Tabla 3.3	Parámetros cinéticos y estadísticos determinados a partir del modelo de Saeman para la hidrólisis del olote	56
Tabla 3.4	Parámetros cinéticos y estadísticos de la producción de azúcares a partir del olote determinados con el modelo de primer orden	59
Tabla 3.5	Parámetros termodinámicos de la producción de azúcares mediante hidrólisis ácida del olote calculados con las constantes cinéticas del modelo de Saeman	61
Tabla 3.6	Parámetros termodinámicos de la producción de azúcares a partir de olote calculados con los modelos cinéticos de Saeman y de Primer orden	63
Tabla 3.7	Parámetros termodinámicos de la deshidratación térmica de los azúcares calculados para la hidrólisis de olote con 0.96 y 1.34 M H_3PO_4	64
Tabla 3.8	Principales vibraciones del olote con y sin hidrolizar observadas en los espectros FTIR	68
Tabla 3.9	Producción de azúcares e ICr del olote hidrolizado con ácido fosfórico a diferentes condiciones de operación	70
Tabla 3.10	Análisis elemental del olote antes y de los residuos, después de la hidrólisis con ácido fosfórico a diferentes condiciones	73
Tabla 3.11	Valores codificados y reales de las variables de la hidrólisis del olote	74
Tabla 3.12	Resultados experimentales de la hidrólisis de olote en H_3PO_4 diluido	75
Tabla 3.13	ANOVA obtenido para el modelo matemático cuadrático de los azúcares	76
Tabla 3.14	Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis con ácido sulfúrico del olote determinados con el modelo de Saeman	92
Tabla 3.15	Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida del olote	93
Tabla 3.16	Porcentajes de lignina determinados en el TH y en el RM antes y después de la hidrólisis alcalina a 121 ºC	94

Tabla 3.17	Parámetros cinéticos y estadísticos de la producción de azúcares reductores a partir de TH y RM con y sin tratamiento alcalino	98
Tabla 3.18	Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis ácida del TH determinados con el modelo de Saeman	103
Tabla 3.19	Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida del TH calculados con las constantes cinéticas del modelo de Saeman	106
Tabla 3.20	Análisis elemental del TH antes y después de la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4, 110°C y 300 minutos	111
Tabla 3.21	Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis de RM en HCl a bajas temperaturas determinados con el modelo de Saeman	116
Tabla 3.22	Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis de RM en HCl a bajas temperaturas determinados con los modelos de Saeman bifásico y de primer orden	117
Tabla 3.23	Parámetros termodinámicos calculados para la hidrólisis de RM en HCl a bajas temperaturas de operación	117
Tabla 3.24	Rendimientos citados para la producción de azúcares	118
Tabla 3.25	Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos reportados en la literatura	122
Tabla 3.26	Producción de biohidrógeno de los diferentes cultivos sembrados en medio de tioglicolato con resarzurina	124
Tabla 3.27	Datos experimentales obtenidos durante la fermentación del hidrolizado de TH ajustado a pH 7 con KOH 0.1 M	127
Tabla 3.28	Datos experimentales obtenidos durante la fermentación de los hidrolizados de TH sin adición de KOH 0.1 M	128
Tabla 3.29	Datos experimentales obtenidos durante la fermentación de los hidrolizados de olote y de TH	132
Tabla 3.30	Comparación de los rendimientos de hidrógeno	133

INTRODUCCIÓN

En México el maíz es uno de los principales cultivos, del cual el olote genera la mayor cantidad de residuos con aproximadamente 19.3 millones de toneladas al año (SAGARPA, 2015). A nivel estatal los cultivos predominantes son el haba y el chícharo, sus residuos (hojas, tallos y cáscaras), estos residuos agrícolas no siempre son utilizados como alimento para ganado o composteo, al no aprovecharse pueden convertirse en focos de agentes patógenos, como insectos y roedores. Usualmente, los residuos agrícolas son dispuestos en rellenos sanitarios o en tiraderos a cielo abierto, contribuyendo a la contaminación atmosférica por la generación de gases de efecto invernadero tales como el metano y el dióxido de carbono (Ajala *et al.,* 2020; Mechery *et al.,* 2019). Aunado a lo anterior, los tiraderos a cielo abierto generan un volumen elevado de lixiviados, los cuales son capaces de erosionar el suelo y contaminar los cuerpos subterráneos de agua. Al mismo tiempo la demanda de los combustibles fósiles aumenta año con año y con ello las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera. Los productos de combustión generados por los energéticos derivados del petróleo en su mayoría son, óxidos de nitrógeno (NOx), óxidos de carbono (COx), compuestos de azufre y plomo, que además de contribuir al calentamiento global, ocasionan afecciones en la salud del ser humano (López-Hidalgo *et al.,* 2017; Solarte-Toro *et al.,* 2019).

Ante la problemática de los residuos agrícolas y debido a la necesidad de incorporar combustibles no contaminantes que posean un alto poder calorífico y tengan un campo de aplicabilidad amplio, el presente trabajo propone utilizar residuos agrícolas para obtener biohidrógeno; un combustible de alto valor calorífico, renovable y no contaminante. La idea del H_2 como combustible alternativo ha tomado mucha relevancia en los últimos años; algunos países europeos y asiáticos han optado por esta tecnología creando *"Hidrogeneras",* las cuales abastecen a los autos que utilizan celdas de combustible. Las tecnologías para la producción de biohidrógeno han resultado eficientes, económicas, sustentables y ambientalmente amigables. Además de la producción de energéticos y de la disminución de residuos orgánicos, estos procesos ofrecen beneficios adicionales tales como la generación de subproductos

de interés comercial y su aplicación a escala industrial. En la actualidad se ha implementado la fermentación oscura para brindar energía en países en vías de desarrollo utilizando sustratos fácilmente degradables (Patinvoh *et al.,* 2019), sin embargo, debido a su abundancia, bajo costo y poco aprovechamiento los residuos lignocelulósicos parecen ser una opción viable para su uso en procesos fermentativos. Las lignocelulosas comprenden materiales como los residuos agrícolas y forestales, los cuales son ricos en celulosa y hemicelulosa; carbohidratos que pueden transformarse en azúcares monoméricos utilizados posteriormente para la producción de energéticos y compuestos de interés, sin embargo, el uso directo de este tipo de biomasa en fermentaciones en estado sólido ha mostrado bajas eficiencias y tasas de producción poco competitivas (Cao *et al.,* 2014). Con la finalidad de incrementar la eficiencia durante la etapa de fermentación de la biomasa lignocelulósica, se han propuesto diversos tratamientos siendo la hidrólisis ácida uno de los más eficientes y rápidos (Solarte-Toro *et al.,* 2019). El objetivo de este estudio es obtener los parámetros cinéticos y termodinámicos de la hidrólisis del olote y del tallo de haba; dos de los residuos agrícolas más generados en el Estado de México y determinar el potencial de los azúcares obtenidos durante las hidrólisis, para la producción de biohidrógeno.

El presente trabajo está conformado por tres apartados, el primero presenta los fundamentos relacionados con la recuperación de azúcares a partir de biomasa lignocelulósica, estudio químico y cinético de la hidrólisis ácida, producción de biohidrógeno, así como trabajos reportados en la literatura y sus respectivos rendimientos. En el segundo apartado se describe la metodología empleada durante la hidrólisis ácida de los residuos agrícolas y la producción de biohidrógeno, así como las técnicas y métodos analíticos empleados en el estudio. Finalmente, el tercer apartado muestra y discute los resultados obtenidos.

1. FUNDAMENTOS

1.1 Residuos lignocelulósicos

La biomasa lignocelulósica es un material orgánico abundante presente en la pared celular de las plantas, que puede ser utilizado para la producción de biogás, biodiesel y bioenergía (Yi *et al.,* 2014), tiene una producción anual global de más de 200 billones de toneladas métricas en base seca y corresponde a los residuos forestales, agrícolas, orgánicos, de la industria del papel y comida, así como los desechos agroindustriales (Chayanon *et al.,* 2014). La lignocelulosa está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, de los cuales los dos primeros son respectivamente matrices de homo y hetero polisacáridos que poseen diferentes propiedades, grados de cristalinidad y composición, dependiendo del tipo, especie y recurso de biomasa (Agbor *et al.,* 2011). La estructura lignocelulósica compuesta por los tres biopolímeros está organizada de una forma compleja brindándole un carácter recalcitrante y una alta resistencia a los tratamientos químicos y biológicos (Raud *et al.,* 2016).

a) Celulosa: La celulosa es el principal componente estructural de la pared celular de las plantas, la cual otorga resistencia mecánica y estabilidad química. Es un homopolisacárido compuesto por glucosas unidas mediante enlaces β-(1-4) glucosídicos agrupados en cadenas que forman micro fibras (Singh *et al.,* 2014). Las moléculas de celulosa tienen diferentes orientaciones a lo largo de su estructura, ésto le confiere una región amorfa y una cristalina, de las cuales, la región cristalina es difícilmente biodegradable (Yi *et al.,* 2014). Algunos microorganismos son capaces de producir celulasas, enzimas que permiten utilizar de manera directa la celulosa presente en las plantas, sin embargo, los métodos de pretratamiento de celulosa son necesarios en aplicaciones industriales, a fin de hacer sustentable, eficiente y económicamente viable el proceso (Roy & Kumar, 2013).

b) Hemicelulosa: Es el segundo polímero más abundante (20-50%) de la biomasa lignocelulósica, es heterogéneo y está compuesto por pentosas, hexosas y azúcares acetilados (Agbor *et al.,* 2011). El peso molecular de la hemicelulosa, el grado de cristalinidad, la resistencia mecánica y el grado de polimerización son mucho menores que los de la celulosa. La hemicelulosa es un polímero ramificado y su composición en términos de monosacáridos difiere mucho de especie a especie (Ingle *et al.,* 2020). La hemicelulosa presente en residuos agrícolas está constituida principalmente por xilosa, mientras que los residuos forestales presentan en su mayoría manosa (Agbor *et al.,* 2011). La hemicelulosa es un carbohidrato eficiente para la producción de compuesto químicos de valor agregado, ya que es más inestable que la celulosa y se depolimeriza fácilmente en presencia de agentes químicos y calor (Ingle *et al.,* 2020).

c) Lignina: La lignina es un polímero hidrocarbonado complejo que posee constituyentes aromáticos y alifáticos, su principal monómero es fenil propano unido de diferentes formas. Este polímero es amorfo, hidrofóbico, termoplástico, no hidrolizable por ácidos y presenta propiedades mecánicas inferiores a la celulosa (Gaur *et al.,* 2016). La lignina es un compuesto recalcitrante que une a las cadenas de celulosa y hemicelulosa manteniendo la matriz lignocelulósica junta y otorgándole fuerza, rigidez e impermeabilidad a la pared celular de las plantas. Su contenido depende de la taxonomía y tipo de planta alcanzando un porcentaje de 30 % en biomasa forestal y de entre 10 y 20 % en rastrojos. La despolimerización de la lignina y su aprovechamiento en la síntesis de químicos de interés es un proceso complejo y presenta bastantes desafíos en comparación con la celulosa y hemicelulosa, sin embargo, en años recientes ha tomado interés debido a su alto contenido de compuestos aromáticos (Ingle *et al.,* 2020; Paul & Dutta, 2018).

Chayanon *et al.* (2014) y Paul & Dutta (2018), realizaron una recopilación de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en diferentes residuos agrícolas, un resumen de los resultados de la distribución del material lignocelulósico en las plantas se muestra en la Tabla 1.1.

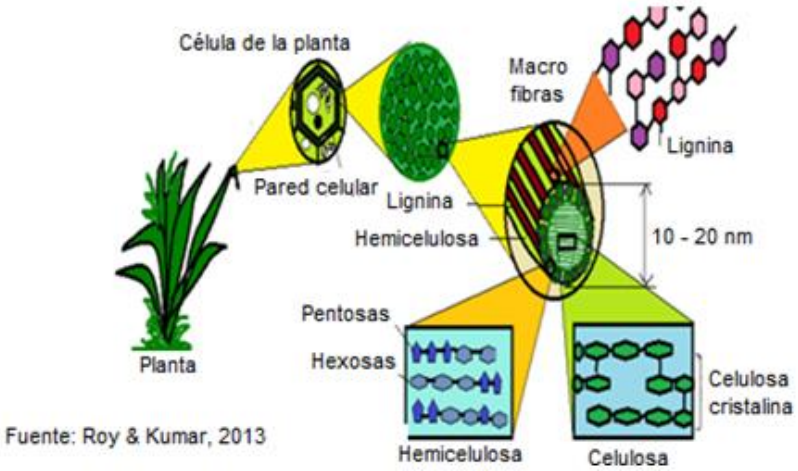


Figura 1.1. Distribución de la lignocelulosa en las paredes celulares de las plantas

Tabla 1.1 Resumen del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en algunos residuos agrícolas comunes

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	CELULOSA (%)	HEMICELULOSA (%)	LIGNINA (%)
[a] Rastrojo de maíz	37.5	22.4	17.6
[a] Bagazo de azúcar de caña	25	17	12
[a] Rastrojo de arroz	32-47	19-27	7-24
[a] Eucalipto	38-44	12-13	24-37
[a] Tallo de girasol	31	17	29
[a] Rastrojo de cebada	37	24	27
[b] Tallo de algodón	31	11	28
[b] Paja de alfalfa	31	10	10
[b] Olote	45	25	15
[b] Paja de colza	37	25	17
[b] Piña	25-44	26-32	28-48
[b] Planta de tomate	39	29	12
[b] Maple rojo	39	33	23

Fuentes: [a]Chayanon *et al.,* 2014 ; [b]Paul & Dutta, 2018

1.1.1 Residuos agrícolas

La mayor parte de los residuos agrícolas pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles. Países como India, Taiwán, China e Irlanda utilizan los residuos provenientes de las cosechas de arroz, trigo, papa, maíz y pasto para la producción

de bioetanol (Singh *et al.,* 2014), sin embargo aún es necesario estudiar la producción de biohidrógeno a partir de lignocelulosas mediante digestión anaerobia (Ingle *et al.,* 2020).

El Estado de México es rico en diversidad climática, lo que permite la proliferación de una gran cantidad de especies vegetales y animales. Entre los cultivos más importantes a nivel estatal se encuentran el maíz, haba, chícharo, tuna, durazno y avena (SAGARPA, 2015), cuyos productos de cosecha propician la contaminación atmosférica por la emisión de gases de efecto invernadero debido a la quema de los mismos y la proliferación de plagas atribuida al mal manejo de los residuos (Mechery *et al.,* 2019). A continuación se describen los dos primeros residuos agrícolas por ser los de interés en este trabajo:

a) Residuos de Haba: El cultivo de haba en el Estado de México contribuye con el 55% (32,033 toneladas) de la producción total anual (INEGI, 2009). Los residuos generados durante su cosecha son hojas, tallos y cáscaras, los cuales tienen un alto contenido de lignocelulosa, difícilmente metabolizada por los microorganismos (Paul & Dutta, 2018). Los residuos de haba son considerados como materia prima potencial para la obtención de bioetanol y biogás. La composición del rastrojo de haba mostrada en Tabla 1.2 fue determinada por Petersson *et al.* (2007).

Tabla 1.2 Composición química del rastrojo de haba

COMPONENTE	COMPOSICIÓN BASE SECA **(%)**
Glucano	28.4
Xilano	12.4
Galactano	4.0
Manosa	2.2
Arabinosa	1.8
Cenizas	7.9
Extractivos	8.8
Lignina	14.4

Fuente: Petersson *et al.* 2007

b) Residuos de maíz: El rastrojo de maíz es uno de los residuos agrícolas predominantes en China con una producción anual en base seca de 1.2 billones de toneladas (Cao *et al.,* 2009). Por otro lado, el maíz es uno de los cultivos principales a nivel nacional con una producción neta anual de 19.3 millones de toneladas anuales (SAGARPA, 2015). Los residuos provenientes del cultivo de maíz constan de hojas, olote, tallos y rastrojo, los cuales están compuestos en su mayoría por lignocelulosa (Li *et al.,* 2016). De acuerdo a lo reportado por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en 2010, el olote genera la mayor cantidad de residuos provenientes de la cosecha de maíz en México, alcanzando aproximadamente 25 millones de t / año. Este residuo es un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del maíz, está compuesto en base seca aproximadamente, por 45% de celulosa, 25% de hemicelulosa y lignina 15% de lignina, ver Tabla 1.1

1.2 Tratamiento de lignocelulosa

El uso de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles no es de uso común, debido a la estructura rígida y resistencia al ataque microbiano. Por esta razón, los tratamientos y pretratamientos aplicados a la biomasa recalcitrante son esenciales para incrementar su fermentación y el rendimiento de los procesos de digestión (Yi *et al.,* 2014). Tanto la celulosa como la hemicelulosa presente en la biomasa lignocelulósica pueden transformarse en azúcares monoméricos mediante tratamientos químicos o biológicos, sin embargo, la ruta más convencional para llevar a cabo este proceso es un pretratamiento químico o fisicoquímico seguido de una hidrólisis o sacarificación enzimática (Láinez *et al.,* 2018; Yu *et al.,* 2019).

La pre-hidrólisis o pretratamiento se refiere a la etapa requerida para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica y hacer más accesible a la celulosa, facilitando su conversión en glucosa e incrementando los rendimientos de la hidrólisis enzimática posterior (Raud *et al.,* 2016). El pretratamiento es una etapa importante que tiene como objetivo romper la matriz lignocelulósica, disminuir la cristalinidad y

aumentar el área superficial del material, es una etapa clave en los procesos de biorefinación ya que el costo y la eficiencia final dependen en gran medida del tipo de pretratamiento (Sahoo *et al.,* 2018). El pretratamiento ideal debe mejorar la fermentación de los azúcares, al evitar la pérdida y degradación de los sacáridos, disminuir la producción de inhibidores, mejorar la hidrólisis de celulosa, tener bajos costos de operación y de requerimientos energéticos, reducir la cristalinidad de la celulosa y su grado de polimerización y romper la estructura que mantiene unidos a la celulosa, hemicelulosa y lignina (Roy & Kumar, 2013; Yu *et al.,* 2019). La Figura 1.2 muestra el efecto del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica.

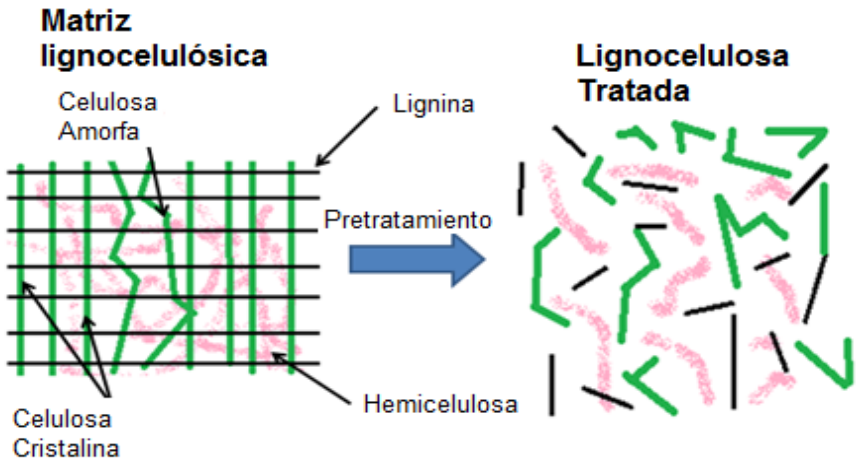


Figura 1.2. Efecto del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica

La etapa de hidrólisis de celulosa se lleva a cabo mediante la acción enzimática de algunos microorganismos y en algunas ocasiones mediante la adición de sustancias químicas (Roy & Kumar, 2013). La hidrólisis enzimática es llevada a cabo mediante enzimas denominadas *celulasas* provenientes de bacterias y hongos, sus principales ventajas son: alta selectividad, alto rendimiento de producción de azúcares, temperaturas bajas de operación y no producen inhibidores ni problemas por corrosión, sin embargo, sus principales desventajas son el cuidado minucioso que se debe tener durante el proceso y el alto costo de operación (Maitan-Alfenas *et al.,* 2015). La hidrólisis enzimática resulta compleja debido a las características estructurales de la matriz lignocelulósica y a que algunas enzimas son absorbidas

por la lignina condensada durante la sacarificación propiciando la formación de complejos enzima-lignina que disminuyen la eficiencia de producción de glucosa (Poovaiah *et al.,* 2014).

1.2.1 Tipos de pretratamiento

Los pretratamientos pueden ser clasificados en físicos, químicos, biológicos y combinados. Estos últimos han tomado gran relevancia durante los últimos años debido a su alta eficiencia, sin embargo los costos de operación son un impedimento para su aplicación industrial (Singh *et al.,* 2014). El tipo de pretratamiento debe ser elegido dependiendo la naturaleza de la biomasa y de sus características fisicoquímicas, no existe un único método de tratamiento para todas las lignocelulosas ya que la eficiencia de éste varía mucho de recurso a recurso (Paul & Dutta, 2018). La factibilidad de los pretratamientos simples o combinados durante su estudio y escalamiento a nivel industrial está relacionada con los requerimientos energéticos, costos y selectividad química de sus componentes. De entre todos los pretratamientos existentes, los métodos fisicoquímicos además de ser eficientes durante la producción de biohidrógeno han mostrado tener un alto potencial desde la perspectiva de la química verde (Mudhoo *et al.,* 2018).

a) Pretratamientos físicos: Se refieren a todos aquellos métodos que no utilizan reactivos químicos ni actividad microbiana (Yi *et al.,* 2014), tienen la capacidad de incrementar el área superficial accesible y el tamaño de poro, así como disminuir el grado de cristalinidad de la celulosa (Yu *et al.,* 2019). Los principales tratamientos físicos son los mecánicos y los de irradiación, los cuales se utilizan para mejorar la biodegradabilidad de los residuos orgánicos. Los pretratamientos mecánicos son conocidos por ser altamente eficientes y ambientalmente amigables, de ellos, la molienda mecánica es la más estudiada debido a su capacidad de reducir considerablemente el tamaño de partícula, el grado de polimerización de los polisacáridos y la cristalinidad de la celulosa (Liu *et al.,* 2019). Los métodos de radiación involucran el uso de rayos gamma, ultrasonido, rayos de electrones, rayos UV y microondas (Yi *et al.,* 2014), los cuales tienen

como finalidad incrementar la fermentación de la biomasa. Las radiaciones de alta energía son capaces de alterar la estructura y morfología de la lignocelulosa, disminuyendo su área superficial y cristalinidad, y depolimerizando parcialmente a los polisacáridos y a la lignina (Kapoor *et al.,* 2017).

b) Pretratamientos químicos: El tratamiento químico se ha convertido en el método más prometedor para mejorar la biodegradación de la celulosa, remover lignina y hemicelulosa, disminuir el índice de cristalinidad y reducir el grado de polimerización de la biomasa lignocelulósica (Shuvashish *et al.,* 2014). Los métodos químicos se refieren al uso de sustancias tales como ácidos, bases, líquidos iónicos, sales metálicas, entre otros, que alteran las características físicas y químicas de la biomasa (Yi *et al.,* 2014). Los principales tratamientos químicos son: ácido, alcalino, líquidos iónicos, solventes orgánicos, ozonólisis, oxidación húmeda y ataque con peróxido, sin embargo, investigaciones recientes muestran que los tratamientos ácidos o alcalinos combinados con tratamientos físicos mejoran drásticamente la eficiencia de la hidrólisis y reducen la producción de residuos químicos (Lee *et al.,* 2015; Liu *et al.,* 2019), además ambos tratamientos han sido utilizados eficientemente previo a la producción de biohidrógeno por fermentación (Prabakar *et al.,* 2018). El tratamiento con amonio es otro método químico estudiado en los últimos años, tiene como finalidad romper los enlaces éster entre la lignina y los polisacáridos y producir poros nanométricos que incrementan la difusión de las enzimas durante la sacarificación (Singh *et al.,* 2015). La ozonólisis busca remover parcial o totalmente a la lignina dejando casi inalterada la estructura de la celulosa y hemicelulosa, usualmente los tratamientos con ozono son llevados a cabo a temperatura ambiente, presión normal y su principal ventaja es que no produce ningún tipo de inhibidor (Shuvashish *et al.,* 2014). El tratamiento con sales metálicas es un método novedoso y eficiente para transformar a la celulosa y hemicelulosa en azúcares monoméricos, disminuyendo la cantidad de compuestos inhibidores en comparación con la hidrólisis ácida (Yu-Loong *et al.,* 2015).

c) Pretratamientos fisicoquímicos: Los pretratamientos que combinan los procesos físicos y químicos para alterar la estructura de la lignocelulosa y aumentar la accesibilidad microbiana de la celulosa se denominan pretratamientos fisicoquímicos (Shuvashish *et al.,* 2014). Esta categoría incluye los métodos de explosión de vapor, líquidos calientes catalizados, oxidación húmeda catalizada, explosión de amonio y solventes de celulosa (Kumar *et al.,* 2019). La explosión de vapor o auto-hidrólisis es el método fisicoquímico más conocido, consiste en tratar la biomasa lignocelulósica con vapor a alta temperatura (160 – 260 ºC) durante tiempos de reacción cortos (0 – 10 minutos) y presiones superiores a los 33 bar, su objetivo es: solubilizar a la hemicelulosa y a la lignina, incrementar el área superficial y expandir las fibras de carbohidratos (Paul & Dutta, 2018; Shuvashish *et al.,* 2014). La explosión de vapor puede ser catalizada con ácido sulfúrico o con una mezcla de dióxido de carbono - dióxido de azufre, la cual resulta más eficiente que la explosión de vapor sin catalizar pero produce una mayor cantidad de compuestos inhibidores (Kumar *et al.,* 2019). El tratamiento con agua caliente es similar a la explosión de vapor, ya que tanto las condiciones de operación como el impacto sobre la matriz lignocelulósica son parecidas: sus principales ventajas son: reducción en los costos de operación, baja producción de inhibidores y un proceso sustentable (Shuvashish *et al.,* 2014).

d) Pretratamientos biológicos: Este tipo de pretratamiento ha sido asociado a la acción metabólica de los hongos capaces de producir enzimas que degradan lignina, hemicelulosa y compuestos no polifenólicos (Agbor *et al.,* 2011). Algunos microorganismos no son capaces de degradar celulosa, debido a su resistencia y cristalinidad (Shuvashish *et al.,* 2014). Los tratamientos biológicos generalmente buscan deslignificar la biomasa utilizando hongos de podredumbre blanca y café, así como microorganismos capaces de generar enzimas peroxidasas y lacasas que degradan la lignina en compuestos de menor peso molecular. Estos tratamientos se llevan a cabo a condiciones ambiente y son favorables desde el punto de vista costo-beneficio (Kumar *et al.,* 2019). Las desventajas más notorias

son la lentitud del proceso, los bajos rendimientos y el control estricto de las condiciones de crecimiento de los microorganismos (Yi *et al.,* 2014).

1.3 Tratamiento alcalino

El tratamiento alcalino es uno de los métodos químicos más estudiados, el cual utiliza reactivos básicos como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y peróxido de hidrógeno, así como una combinación de ellos (Shuvashish *et al.,* 2014). Las principales ventajas de este tratamiento son su alta eficiencia para solubilizar a la lignina, la baja corrosión y toxicidad de los reactivos utilizados, y la aplicación de esta tecnología en condiciones ambientales (Kim *et al.,* 2016).

La hidrólisis alcalina involucra la disolución de la lignina y una saponificación de los enlaces éster intermoleculares que unen a los carbohidratos con la lignina y con otros componentes de la biomasa (Singh *et al.,* 2014; Kim *et al.,* 2016), lo que propicia una disminución en el grado de cristalinidad debido a la eliminación de las regiones amorfas y un incremento en el área superficial y en la porosidad de la biomasa (Shuvashish *et al.,* 2014). El éxito de la hidrólisis alcalina depende del tipo de materia prima y de las condiciones de operación, siendo más eficiente en biomasa lignocelulósica con bajo contenido de lignina como en los residuos agrícolas y agroindustriales (Singh *et al.,* 2014). La hidrólisis alcalina causa modificaciones estructurales dentro de la matriz lignocelulósica, descomponiendo a la lignina, solubilizando y descristalizando parcialmente a la celulosa e incrementando la acción metabólica de los microorganismos en la fermentación posterior (Michalska *et al.,* 2015). Las bases fuertes como el hidróxido de sodio y el hidróxido de potasio pueden romper los enlaces éster y éter, mientras que las bases débiles como el amoníaco solamente pueden romper los enlaces éster. Este método es menos eficiente que la hidrólisis ácida, sin embargo, su potencial se incrementa cuando se utilizan agentes oxidantes como el oxígeno y el peróxido de hidrógeno (Kumar *et al.,* 2019). El método alcalino – peróxido de hidrógeno incrementa tanto la remoción de la lignina y

hemicelulosa como el porcentaje de celulosa en el sólido hidrolizado, lo cual favorece la posterior hidrólisis enzimática (Ayeni & Daramola, 2017).

Se ha reportado el tratamiento con hidróxido de sodio como un método eficiente para la delignificación y el mejoramiento de la producción de biogás a partir de rastrojo de maíz, tallos de girasol, paja de arroz y rastrojo de sorgo (Yi *et al.,* 2014). He *et al.,* (2008), utilizando paja de arroz observaron que el tratamiento con hidróxido de sodio además de romper los enlaces éster entre la lignina y los carbohidratos, también es capaz de corromper los grupos funcionales de la celulosa, hemicelulosa y lignina, y destruir las interacciones intermoleculares de la matriz lignocelulósica. El hidróxido de sodio destruye eficientemente las esterificaciones y los enlaces presentes en el complejo hemicelulosa-lignina y corrompe el enlace C-C de las moléculas de lignina (Kim *et al.,* 2016). El hidróxido de sodio se disocia en los iones hidroxilo: OH^{-1} y Na^{+1} favoreciendo la hidrólisis con un incremento en la concentración de iones hidroxilo (Modenbach, 2013).

A fin de incrementar la deslignificación y la eficiencia de la subsecuente etapa de hidrólisis, el tratamiento alcalino se ha acoplado en los últimos años con otros métodos tales como la extrusión mecánica (Coimbra *et al.,* 2016), el tratamiento con microondas (Li *et al.,* 2014) y la hidrólisis ácida – alcalina (Camesasca *et al.,* 2015; Zu *et al.,* 2014), siendo ésta última la que mostró la mayor remoción de lignina. Los procesos combinados que involucran en una primera etapa la hidrólisis alcalina seguida del tratamiento con ácido no son factibles, ya que durante la hidrólisis alcalina se forma un líquido conocido como *licor negro* el cual está compuesto por lignina soluble, derivados de la lignina y azúcares provenientes de la hemicelulosa que no puede fermentarse debido al alto contenido de compuestos fenólicos (Lee *et al.,* 2015). El *licor negro* contiene una mezcla de compuestos orgánicos y residuos inorgánicos, en algunos casos dicho licor se concentra por evaporación y se quema con la intención de recuperar los compuestos inorgánicos en forma de carbonatos y sulfato de sodio, generando al mismo tiempo energía usada en los procesos a escala industrial tal y como sucede en la producción de papel (Woiciechowski *et al.,* 2020).

El licor negro es el quinto combustible más importante en el mundo, con una capacidad calorífica de 13.5 – 14.5 MJ / kg y una producción anual neta de 130 millones de toneladas anuales (Bajpal, 2018).

1.4 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un método químico altamente eficiente usado para alterar la matriz lignocelulósica y romper los enlaces β1-4 glucosídicos característicos de la celulosa y hemicelulosa; tiene la capacidad de solubilizar principalmente a la hemicelulosa, sin embargo, dependiendo de las condiciones de operación también pueden ser parcialmente removidas la lignina y la celulosa (Woiciechowski *et al.,* 2020). La hidrólisis ácida ha sido estudiada extensamente y se considera como la técnica más cercana al escalamiento industrial y comercial (Solarte-Toro *et al.,* 2019).

Éste método químico utiliza ácidos diluidos o concentrados en procesos catalizados por temperatura, puede realizarse a temperatura alta y baja concentración de ácido o a baja temperatura y alta concentración de ácido (Woiciechowski *et al.,* 2020).

a) Hidrólisis con ácido concentrado: El proceso con alta concentración de ácido presenta algunas ventajas sobre el proceso con ácido diluido, tales como mayor índice de despolimerización de carbohidratos, mínima formación de inhibidores, reducción en el grado de cristalinidad de la celulosa, no requiere una hidrólisis enzimática posterior y no hay restricción para el uso de biomasa proveniente de diversas fuentes (Siripong *et al.,* 2016 Yoon *et al.,* 2014), sin embargo, las concentraciones altas de ácido favorecen la corrosión de los reactores por lo cual deben construirse con materiales más resistentes incrementando el costo del tratamiento (Yi *et al.,* 2014). La hidrólisis con ácidos concentrados se lleva a cabo usualmente con ácido fosfórico y sulfúrico, ambos de-polimerizan eficientemente a la hemicelulosa y disminuyen el grado de cristalinidad de la celulosa, sin embargo, el ácido fosfórico no degrada completamente a la lignina por lo que debe acoplarse con otro método de tratamiento que incremente el poder oxidante de la

solución como es el caso del peróxido de hidrógeno (Wang *et al.,* 2016). De acuerdo con Solarte-Toro *et al.* (2019), la hidrólisis con ácido concentrado se lleva a cabo en 3 etapas principales: solubilización de hemicelulosa, ruptura de celulosa en azúcares oligoméricos y producción de azúcares monoméricos. La ruptura de la fase cristalina de la celulosa se lleva a cabo entre la primera y la segunda etapa.

b) Hidrólisis con ácido diluido: El tratamiento con ácido diluido es uno de los métodos más utilizados tanto para pre-tratar a la biomasa lignocelulósica como para producir azúcares monoméricos (Boontum *et al.,* 2019; Swiatek *et al.,* 2020), es considerado un método económico y factible para su escalamiento industrial como una etapa que antecede a la producción de biocombustibles tales como el bioetanol y el biohidrógeno (Díaz-Blanco *et al.,* 2018; Gonzales *et al.,* 2016). Su principal ventaja es su alta eficiencia (> 75 %) para recuperar los azúcares provenientes de la hemicelulosa y dependiendo de las condiciones de operación puede incluso despolimerizar a la glucosa y cambiar sus propiedades fisicoquímicas, además los costos por reactivos y construcción del reactor son más bajos en comparación con los procesos con ácido concentrado y el método puede acoplarse con otras tecnologías incrementado su potencial (Kumar *et al.,* 2015; Solarte-Toro *et al.,* 2019). La principal desventaja del tratamiento con ácido diluido es la descomposición térmica de las pentosas y hexosas, que da como resultado la formación de furfural e hidroximetil furfural (HMF) respectivamente, sustancias que inhiben la actividad metabólica de los microorganismos (Kumar *et al.,* 2019; Gonzales *et al.,* 2016). La hidrólisis con ácido diluido puede llevarse a cabo en un rango de temperaturas de 100 a 215 ºC, concentraciones de ácido de entre 0.1 y 5 % en peso, tiempos de operación menores a los 120 minutos y presiones entre 1 y 10 atmósferas (Solarte-Toro *et al.,* 2019; Woiciechowski *et al.,* 2020).

El tratamiento ácido involucra la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos tales como el sulfúrico, fosfórico, clorhídrico, nítrico, maléico y acético (Kumar *et al.,* 2019). De ellos el ácido sulfúrico ha sido mayormente estudiado debido a su alto poder

catabólico y a su menor costo de producción en comparación con el clorhídrico y el fosfórico, además ha mostrado ser eficiente para incrementar el área superficial de la biomasa y producir una gran cantidad de azúcares (Láinez *et al.,* 2018; Shuvashish *et al.,* 2014). La principal desventaja de éste ácido es su alta toxicidad que involucra el uso de reactores resistentes a la corrosión lo que incrementa el costo del proceso (Woiciechowski *et al.,* 2020). El ácido fosfórico es menos corrosivo y tóxico que el sulfúrico, además durante la etapa de neutralización previa a la fermentación produce sales de fosfato que pueden ser utilizadas como fertilizantes, suplementos alimenticios y nutrientes para los microorganismos (Cao *et al.,* 2018; Siripong *et al.,* 2016). Con respecto a los ácidos orgánicos, Amnuaycheewa *et al.* (2016), estudiaron la hidrólisis ácida de la paja de arroz con los ácidos acético, cítrico y oxálico demostrando que éste último fue el más eficiente para producir azúcares monoméricos y para reducir la masa de la paja de arroz al término del tratamiento.

La hidrólisis ácida es un método químico que puede utilizarse como pretratamiento o método de hidrólisis directa (Arslan *et al.,* 2012; Kumar *et al.,* 2015; Shuvashish *et al.,* 2014). Sus principales desventajas son la producción de compuestos inhibidores del crecimiento microbiano, generación de agua residual y toxicidad en cuerpos de agua, pese a ello el tratamiento ácido es utilizado debido a su alto potencial para producir azúcares y para incrementar la eficiencia de la fermentación de la biomasa lignocelulósica, además de poder llevarse a cabo utilizando una gran variedad de condiciones de operación (Solarte-Toro *et al.,* 2019).

1.4.1 Azúcares fermentables e inhibidores

La glucosa es el componente principal de la celulosa, mientras que la xilosa es el monómero mayoritario presente en la hemicelulosa. Ambos monosacáridos son capaces de formar estructuras cíclicas (Figura 1.3) fácilmente fermentables por los microorganismos (Cieciura-Wloch *et al.,* 2019). La hemicelulosa puede degradarse en compuestos de menor peso molecular como azúcares (xilosa, glucosa, manosa, arabinosa y galactosa), ácidos orgánicos (fórmico, levulínico y acético) y aldehídos (furfural y HMF) (Shuvashish *et al.,* 2014).

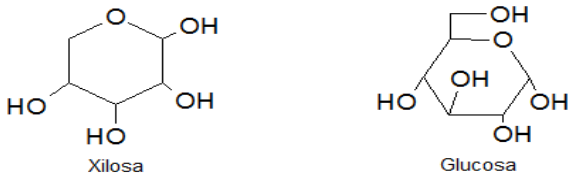


Figura 1.3. Estructura molecular de la xilosa y de la glucosa

Además de los azúcares monoméricos, en la hidrólisis ácida se producen algunos componentes tóxicos derivados del pretratamiento conocidos como inhibidores de crecimiento microbiano. Existen tres grupos de inhibidores: las sustancias relacionadas a la degradación de hemicelulosa (ácido acético, alcoholes, aromáticos), sustancias derivadas de la descomposición de azúcares (compuestos húmicos, furfural, hidroximetil furfural, ácido fórmico) y los productos generados por la despolimerización de la lignina, como lo son los anillos aromáticos y poli aromáticos (Kumar *et al.,* 2015; Paul & Dutta, 2018). Los tratamientos efectuados a altas temperaturas propician la deshidratación térmica de las hexosas y pentosas en moléculas de HMF y furfural, los cuales a su vez se descomponen generando ácido fórmico, levulínico y acético (Shuvashish *et al.,* 2014). La Figura 1.4 muestra la síntesis de inhibidores a partir de la descomposición térmica de los azúcares.

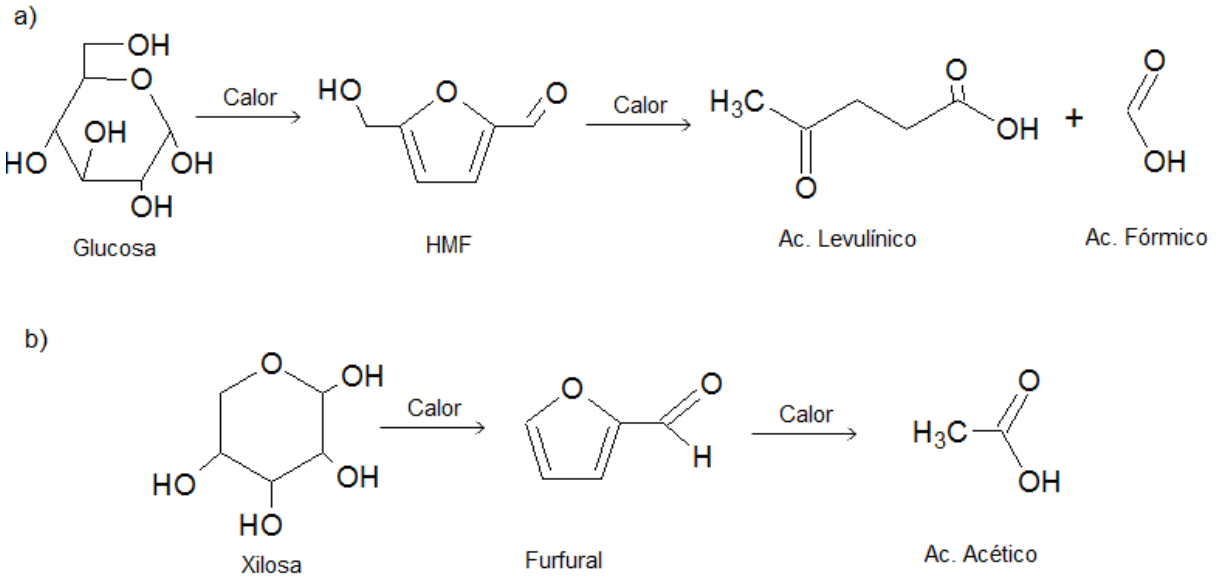


Figura 1.4. Producción de inhibidores a partir de a) hexosas y b) pentosas

Los compuestos inhibidores causan efectos tóxicos sobre el crecimiento bacteriano y su actividad metabólica. Los inhibidores más dañinos para la membrana celular de los microorganismos son los compuestos fenólicos derivados de la descomposición de la lignina, mientras que los aldehídos se encargan de alterar el funcionamiento de las enzimas involucradas en el procesamiento de los sustratos (Giraldeli *et al.,* 2019; Kumar *et al.,* 2015). El furfural es el compuesto inhibidor mayormente formado durante la hidrólisis ácida de la biomasa lignocelulósica, es menos tóxico en comparación con los compuestos fenólicos, sin embargo su concentración en los hidrolizados llega a inhibir los procesos fermentativos (Cieciura-Wloch *et al.,* 2019; Haroun *et al.,* 2016). De acuerdo con Muñoz-Páez *et al.* (2019), la eficiencia de los procesos fermentativos no se ve afectada cuando la concentración de furfural es menor a 1 g/L, sin embargo, los microorganismos resultan más sensibles a la presencia de HMF y a la mezcla furfural-HMF ya que concentraciones menores a 0.20 g/L de HMF disminuyen considerablemente el rendimiento. El furfural además de inhibir la síntesis de proteínas y enzimas, altera el crecimiento de la membrana celular permeando a través de ella y destruyendo el ADN de los microorganismos (Akobi *et al.,* 2017).

Con la finalidad de disminuir la concentración de compuestos inhibidores en el hidrolizado, diversos métodos de desintoxicación han sido propuestos, entre ellos se encuentran el carbón activado, compuestos alcalinos, hidróxido de calcio, enzimas como la lacasa y la peroxidasa así como la digestión microbiana (Woiciechowski *et al.,* 2020). Algunos tratamientos alternativos como la concentración del hidrolizado por evaporación, el uso de resinas de intercambio iónico y técnicas de ingeniería metabólica se han propuesto en los últimos años (Kumar *et al.,* 2015).

1.4.2 Factores que afectan a la hidrólisis ácida

Las principales variables que afectan a la hidrólisis ácida son: la temperatura de reacción, el tiempo de contacto, la concentración del ácido, la relación entre la biomasa y la solución y el tamaño de partícula (Shuvashish et al., 2014; Partida-Sedas *et al.,* 2016). De ellas, las variables más importantes son la temperatura, la

concentración del ácido y el tiempo de contacto. A fin de evaluar el efecto combinado de dichas variables se propuso el término *Factor de Severidad Combinado* (FSC), que está definido como una medida de la severidad de la hidrólisis ácida (Pappas *et al.,* 2014) y matemáticamente se expresa acorde a la Ecuación 1.1.

$$\boldsymbol{FSC = log\left[t * e^{\left(\frac{T-100}{14.75}\right)}\right] - pH} \qquad \text{Ec. 1.1}$$

En donde, t es el tiempo de contacto en minutos, T la temperatura de operación y pH el valor obtenido en el hidrolizado al término de la hidrólisis. Algunos trabajos como los realizados por Castro *et al.* (2014) y Pappas *et al.* (2014), muestran que el FSC es una medida del comportamiento de las variables de proceso en torno a un factor, sin embargo, no existe una relación directa entre este coeficiente y la producción de azúcares, ya que mismos valores del FSC corresponden a rendimientos de producción de azúcares diferentes.

Se han reportado en la literatura distintos trabajos relacionados al estudio de las 3 variables más importantes de la hidrólisis sobre la producción de azúcares, rendimiento de sacarificación y degradación de biomasa lignocelulósica, concluyendo en la mayoría de ellos que los efectos singulares y combinados de la temperatura y la concentración del ácido son las que mayor impacto tienen sobre el proceso (Cao *et al.,* 2018; Díaz-Blanco *et al.,* 2018; Saha *et al.,* 2018). Ambas variables están relacionadas también con la producción de aldehídos, ya que un aumentó en la temperatura de reacción favorece la descomposición de los azúcares obtenidos, la cual se incrementa aún más a altas concentraciones de ácido (Avci *et al.,* 2013; Zhao *et al.,* 2014). Lenihan *et al.* (2010), estudiaron el efecto de la temperatura y de la concentración de ácido fosfórico sobre la hidrólisis de cáscara de papa, concluyendo que un incremento de temperatura favorece a la producción de inhibidores, mientras que un incremento en la concentración de ácido propicia la producción de azúcares.

La importancia del tiempo de operación radica en conocer el comportamiento de la producción tanto de los azúcares como de los demás productos de hidrólisis a

determinadas condiciones de temperatura y concentración. Se ha reportado previamente que un aumento en el tiempo de contacto está relacionado directamente con un incremento en la concentración de aldehídos y ácidos orgánicos (Chen *et al.,* 2015; Na & Lee, 2015).

La relación entre la cantidad de biomasa y el volumen de solución ácida es otra variable que afecta directamente a la hidrólisis ácida. Estudios anteriores han reportado que un aumento en la cantidad inicial de lignocelulosa incrementa la producción de azúcares (Adeogun *et al.,* 2018; Rojas-Rejón & Sánchez, 2013), sin embargo, solo es hasta cierto punto ya que al saturar el sistema de materia sólida la resistencia a la transferencia de masa incrementa y en consecuencia el rendimiento del proceso disminuye debido a que el ácido no encuentra los sitios activos para comenzar la despolimerización de los carbohidratos.

La hidrólisis ácida es una reacción heterogénea que involucra a la biomasa lignocelulósica en estado sólido y un líquido ácido, por ello algunos fenómenos de carácter físico se llevan a cabo durante el proceso tales como la difusión del ácido, el cambio en la cristalinidad y la transferencia de masa (Xiang *et al.,* 2003). El módulo de Weisz es usualmente utilizado para determinar la resistencia a la transferencia de masa en reacciones heterogéneas con o sin catalizar, sin embargo, de acuerdo con Girisuta *et al.* (2007) y con Saeman (1945) la hidrólisis ácida puede asemejarse a una reacción homogénea cuando el tamaño de partícula es menor a los 840 µm considerando así la no resistencia a la transferencia de masa. Los procesos de hidrólisis ácida llevada a cabo con partículas menores a 840 µm tienen como principal barrera física el acomodo de las fibras de celulosa y su interacción por puentes de hidrógeno que le confiere una alta cristalinidad (Xiang *et al.,* 2003). Los tamaños de partícula más pequeños incrementan la eficiencia de la reacción de hidrólisis, sin embargo, entre más pequeña es la partícula menor es el efecto que tendrá sobre la producción de azúcares; < 4 mm (Chen *et al.,* 2015).

1.4.3 Mecanismo y cinética de la hidrólisis ácida

De acuerdo con Zhang *et al.* (2009), el rompimiento de la celulosa involucra dos procesos principales, el primero de ellos es una esterificación entre los grupos hidroxilo de la celulosa y el ácido fosfórico, formando así fosfato de celulosa, tal y como se muestra en la Ecuación 1.2.

$$\boldsymbol{H_3PO_4 + celulosa - OH \quad \rightarrow \quad celulosa - O - PO_3H_2} \qquad \text{Ec. 1.2}$$

El segundo paso corresponde tanto a la competencia en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos OH^{-1} de las cadenas lineales de celulosa como a los derivados de la unión entre OH^{-1} de la celulosa y las moléculas de agua. Por otro lado, Fan *et al.* (1987) describen a la hidrólisis ácida como un proceso que involucra la formación de complejos entre la celulosa y el ácido inorgánico, el cual se observa únicamente después de que la fracción cristalina de la celulosa ha sido destruida. El mecanismo de hidrólisis ácida comienza con una protonación atribuida al complejo ácido-agua sobre el oxígeno glucosídico y el oxígeno presente en el anillo cíclico de la glucosa (Brown *et al.,* 1979), sin embargo, se ha reportado que el mecanismo favorecido es la protonación del oxígeno glucosídico (Fan *et al.,* 1987). La Figura 1.5 muestra de manera simplificada el mecanismo de la hidrólisis en presencia de ácido fosfórico mediante la protonación del oxígeno glucosídico.

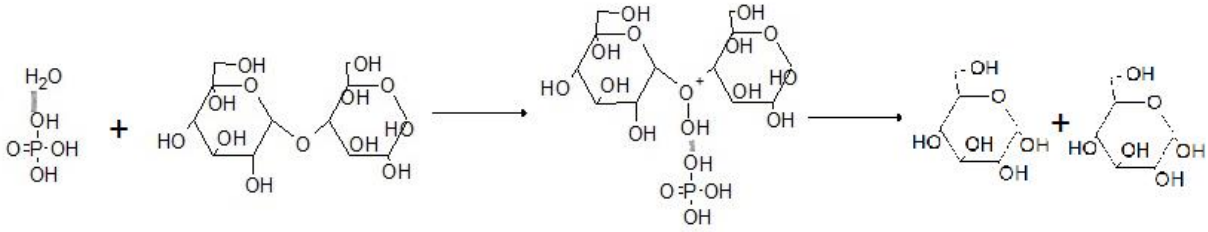


Figura 1.5. Mecanismo de la hidrólisis ácida

De acuerdo con Tizazu & Moholkar (2018) y Xiang *et al.* (2003), la hidrólisis ácida es una reacción compleja que se lleva a cabo en 4 etapas principales: La primera de ellas involucra una difusión de los protones del ácido a través de la matriz

lignocelulósica, la segunda corresponde a la protonación del enlace β1-4 glucosídico y del oxígeno del anillo aromático del carbohidrato así como a la ruptura de los enlaces, se ha reportado que el mecanismo favorecido es la ruptura del enlace glucosídico (Fan *et al.,* 1987)., la tercer etapa está asociada a la formación de un carbono catiónico intermediario que induce la formación de dos moléculas de azúcar con ayuda de las moléculas de agua presentes en la solución. La última etapa corresponde a la difusión de los productos generados a través de la matriz lignocelulósica. La formación del carbono catiónico intermediario ocurre mucho más rápido en los extremos de las cadenas de celulosa y hemicelulosa que en su parte intermedia, la adición de agua propicia que los rendimientos de producción de azúcar sean mayores a los calculados teóricamente en función de la cantidad inicial de carbohidrato (Guerra-Rodríguez *et al.,* 2012; Xiang *et al.,* 2003).

Los modelos cinéticos utilizados para estudiar la hidrólisis ácida de biomasa lignocelulósica generalmente asumen un comportamiento pseudo-homogéneo y de primer orden. Saeman (1945) propuso el primero modelo cinético durante la hidrólisis con ácido sulfúrico de la madera, considerando que el proceso involucra una serie de reacciones relacionadas con la producción de azúcares monoméricos y su transformación en aldehídos inhibidores (Ec. 1.3).

$$\boldsymbol{holocelulosa} \overset{\boldsymbol{k_1}}{\rightarrow} \boldsymbol{monosacáridos} \overset{\boldsymbol{k_2}}{\rightarrow} \boldsymbol{Inhibidores} \qquad \text{Ec. 1.3}$$

Considerando que las reacciones observadas en la Ecuación 1.3 son irreversibles y de primer orden, el modelo cinético propuesto por Saeman (1945) permite predecir la concentración de monosacáridos en función del tiempo de reacción, de acuerdo a la Ecuación 1.4.

$$\boldsymbol{M} = \left[\frac{\boldsymbol{k_1 P_0}}{\boldsymbol{k_2 - k_1}}\right]\left(\boldsymbol{e^{-tk_1} - e^{tk_2}}\right) \qquad \text{Ec. 1.4}$$

En donde M es la concentración de monosacáridos y P_0 la concentración inicial de holocelulosa expresadas en términos de g/L o g azúcar / g sustrato, mientras que k_1 y k_2 son respectivamente las constantes cinéticas asociadas a la producción y descomposición de los azúcares en min^{-1}, y t es el tiempo de reacción en minutos.

El modelo de Saeman se ha utilizado principalmente para estudiar la producción de xilosa y glucosa provenientes de la fracción de holocelulosa de distintos tipos de biomasa lignocelulósica (Guerra-Rodríguez *et al.,* 2012; Na & Lee, 2015; Rafiqul & Sakinah, 2012), sin embargo, algunos estudios también han reportado que dicho modelo predice adecuadamente el comportamiento de la cantidad total de azúcares reductores totales bajo diferentes condiciones de hidrólisis (Adeogun *et al.,* 2018; Arslan *et al.,* 2012). Por otro lado, cuando los datos experimentales no muestran la etapa de deshidratación térmica de los azúcares, el modelo de Saeman puede reducirse a la ecuación cinética de primer orden (Ajala *et al.,* 2020; Swati *et al.,* 2013), la cual se muestra en la Ecuación 1.5.

$$\boldsymbol{M = P_o(1 - e^{-k_1 t})} \qquad \text{Ec. 1.5}$$

Esteghlalian *et al.* (1997) propusieron un modelo modificado conocido como modelo bifásico o Saeman modificado el cual considera que la hidrólisis ácida se lleva a cabo a partir de dos reacciones paralelas pseudo-homogéneas de primer orden, en la cual una de ellas es mucho más rápida que la otra. La reacción rápida corresponde a la fracción fácilmente hidrolizable, mientras que la lenta se atribuye a la fracción difícilmente hidrolizable. Éste modelo ha sido utilizado en años recientes (Tizazu & Moholkar, 2018; Zhang *et al.,* 2011) y su ecuación general se muestra en la Ecuación 1.6.

$$\boldsymbol{M = \frac{\propto \cdot P_o \cdot k_f}{k_2 - k_f}\left[e^{-k_f \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t}\right] + \frac{(1-\propto)\cdot P_o \cdot k_s}{k_2 - k_s}\left[e^{-k_s \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t}\right]} \qquad \text{Ec. 1.6}$$

En done *M, P_o, k_2, y t* tienen el mismo significado y unidades a las descritas anteriormente, mientras que k_f y k_s representan las constantes de velocidad de la

fracción fácilmente y difícilmente hidrolizable respectivamente, ambas con unidades de min^{-1}. El símbolo α corresponde a la fracción fácilmente hidrolizable.

Algunos estudios recientes se han enfocado en el estudio de la transferencia de masa entre la solución ácida y la biomasa lignocelulósica. Chen *et al.* (2015), propusieron un modelo que combina la difusión del ácido en la parte interna de las partículas con el carácter químico de la hidrólisis ácida considerando algunos factores físicos como: tamaño de partícula, tortuosidad y porosidad de la misma y el coeficiente de difusión del ácido en agua.

1.5 Biohidrógeno

El hidrógeno (H_2) es un gas importante y fuente de energía promisoria que jugará un papel importante en la reducción de los gases de efecto invernadero, ya que en procesos de combustión genera vapor de agua y es considerado como un energético limpio con alto poder calorífico debido a que tiene aproximadamente 122 MJ/kg (De Souza *et al.,* 2019; Nissila *et al.,* 2014). El H_2 obtenido como subproducto de las reacciones bioquímicas efectuadas por microorganismos es conocido como Biohidrógeno (Pandey *et al.,* 2013).

1.5.1 Mecanismos para la producción de biohidrógeno

Estudios referidos a la producción de biohidrógeno han hecho énfasis en procesos de biofotólisis del agua utilizando cianobacterias y microalgas, la fotodescomposición de la materia orgánica a partir de bacterias fotosintéticas y fermentación anaerobia aprovechando el metabolismo de microorganismos anóxicos (Elbeshbishy *et al.,* 2017); sin embargo, la fermentación anaerobia se presenta como la opción más factible para la producción de biohidrógeno (Ya-Chieh *et al.,* 2012).

a) Fotofermentación. La fotofermentación se define como el proceso de producción de biohidrógeno a partir de sustratos orgánicos residuales llevado a cabo por organismos fotosintéticos en presencia de luz (Budiman & Wu, 2018). La fotofermentación es conocida como uno de los métodos más eficientes debido a

sus altos rendimientos, a la degradación completa de los ácidos orgánicos, su capacidad de usar un amplio rango de luz y a su potencial para usar distintos materiales orgánicos residuales como sustrato. Algunos parámetros como la relación carbono-nitrógeno, la temperatura, el pH y la intensidad de luz afectan el proceso, siendo éste último el que ha limitado su aplicación a nivel industrial (Hay *et al.,* 2013). Entre los microorganismos más estudiados para la producción de H_2 mediante fotofermentación se encuentran las bacterias púrpuras tales como *Rhodobacter, Rhodopseudomonas* y *Rhodospirillum*, las cuales debido a su estructura simple no tienen la capacidad de hidrolizar el agua, pero sí de producir biohidrógeno a partir de compuestos ricos en carbono y nitrógeno (Budiman & Wu, 2018; Show *et al.,* 2012). La ecuación general de la producción de biohidrógeno mediante fotofermentación se muestra en la ecuación 1.7.

$$\boldsymbol{CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2} \qquad \text{Ec. 1.7}$$

Seifert *et al.* (2018) diseñaron un experimento secuencial en el cual aprovecharon los ácidos orgánicos generados en un proceso de fermentación anaerobia para obtener H_2 en un reactor fotobiológico, el rendimiento al final del proceso fue de 6.7 L de hidrógeno / L de residuo no diluido de la industria del chicle. Estos resultados muestran que los procesos combinados de fermentación oscura – fotofermentación incrementan las tasas de producción de biohidrógeno y la degradación de los residuos.

b) Biofotólisis. La biofotólisis es el proceso mediante el cual el agua es separada en sus componentes individuales utilizando la capacidad fotosintética de algas y cianobacterias (Pandey *et al.,* 2013). El biohidrógeno se produce mediante la absorción directa de luz y transferencia de los electrones hacia las enzimas hidrogenasas y nitrogenasas, bajo condiciones anóxicas el exceso de electrones se asocia a los microorganismos convirtiendo iones H^+ en H_2 molecular (Show *et al.,* 2012). La biofotólisis puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos. El primero de ellos es la biofotólisis directa, la cual consiste en utilizar la energía

solar y los sistemas fotosintéticos de las algas para convertir agua en energía química, en cambio, la biofotólisis indirecta utiliza los electrones provenientes de las reservas de carbono de las algas obtenidos por la fijación del CO_2, los carbohidratos son oxidados para producir biohidrógeno (Das *et al.,* 2014; Prabakar *et al.,* 2018). Las reacciones involucradas en los procesos de biofotólisis se muestran en las Ecuaciones 1.8, 1.9 y 1.10.

a) Directa

$$\boldsymbol{2H_2O \overset{hv}{\rightarrow} 2H_2 + O_2} \qquad \text{Ec.1.8}$$

b) Indirecta

$$\boldsymbol{6H_2O + 6CO_2 \overset{hv}{\rightarrow} C_6H_{12}O_6 + 6O_2} \qquad \text{Ec. 1.9}$$

$$\boldsymbol{C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \overset{hv}{\rightarrow} 12H_2 + 6CO_2} \qquad \text{Ec. 1.10}$$

c) Fermentación oscura. La fermentación es un fenómeno encontrado de manera natural en ambientes con ausencia de oxígeno, es llevado a cabo por microorganismos productores de hidrógeno tales como las bacterias facultativas y los anaerobios obligados (Elbeshbishy *et al.,* 2017). La fermentación oscura tiene varias ventajas sobre la fotofermentación tales como la amplia gama de materiales orgánicos que puede utilizar, su alto rendimiento de producción de biohidrógeno, es independiente de las condiciones ambientales y los subproductos generados pueden ser utilizados para la síntesis de bioplásticos (Reddy *et al.,* 2014).

d) Bioelectrohidrogénesis. La Celda de Electrólisis Microbiana es una tecnología noble, innovadora y sustentable para la producción de H_2 a partir de materia orgánica. Esta tecnología es análoga a la Celda de Combustible Microbiana (CCM), con la diferencia de la atmósfera no oxidante utilizada en la CEM (Kadier *et al.,* 2016). Las bacterias eléctricamente activas oxidan a la materia orgánica y generan como principales productos CO_2, protones y electrones (Kadier *et al.,* 2014). Los electrones y los protones son reducidos dentro de una cámara catódica a H_2 molecular. Debido a que la bioelectrohidrogénesis es un proceso endotérmico, se requiere aplicar un pequeño voltaje externo para que la reducción

de los protones se lleve a cabo, dicho voltaje oscila entre 0.2 y 0.8 V, el cual en comparación con el requerido para llevar a cabo la hidrólisis del agua (1.8 – 3.5 V) resulta mucho menor (Lu *et al.,* 2016).

1.6 Producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura

La producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura involucra una serie de reacciones bioquímicas que concluyen en la generación de H_2 y ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Das *et al.,* 2014); actualmente es considerada como el mecanismo de producción más favorable, ya que puede hacer uso de una gran variedad de sustratos orgánicos y aguas residuales como fuente de carbono sin utilizar luz (Elbeshbishy *et al.,* 2017; Show *et al.,* 2012). La fermentación es un proceso metabólico, el cual ocurre bajo condiciones anóxicas y tiene la finalidad de regenerar la energía de las células mediante la síntesis de Tri-Fostato de Adenosina (ATP) (Das *et al.,* 2014). La glucosa considerada como el modelo de sustrato, es convertida inicialmente a piruvato mediante el mecanismo glicolítico produciendo ATP a partir de Di-Fosfato de Adenosina (ADP), posteriormente el piruvato es oxidado a acetil coenzima A, CO_2 y H_2 mediante la acción de las enzimas *piruvato ferrodixina*, *oxidoreductasa* e *hidrogenasa* (Ghimire *et al.,* 2015).

1.6.1 Rutas metabólicas dirigidas a la producción de biohidrógeno fermentativo

Para la producción de H_2, el piruvato puede involucrar tres mecanismos bioquímicos diferentes, dependiendo del tipo de microorganismo y de sus respectivas enzimas (Show *et al.,* 2012). En microorganismos anaerobios estrictos y bacterias termofílicas, el piruvato es oxidado a acetil coenzima A mediante la acción de la oxidoreductasa piruvato ferrodixina, posteriormente el acetil coenzima A es transformado a acetil fosfato, generando ATP y acetato (Das *et al.,* 2014), dichas reacciones se observan en las Ecuaciones 1.11 y 1.12.

$$\boldsymbol{Piruvato + CoA + 2Fd(ox) \rightarrow Acetil\ CoA + 2Fd(red) + CO_2} \qquad \text{Ec. 1.11}$$

$$\boldsymbol{2H^+ + Fd(red) \rightarrow H_2 + Fd(ox)} \qquad \text{Ec. 1.12}$$

De acuerdo con Pandey *et al.* (2013), el segundo tipo de reacciones productoras de H_2 involucra el metabolismo de microorganismos facultativos mediante la acción de la enzima formato piruvato liasa (PFL), ambas reacciones se muestran en las Ecuaciones 1.13 y 1.14.

$$\boldsymbol{Piruvato + CoA \rightarrow Acetil\,CoA + Formiato} \quad \text{Ec. 1.13}$$

$$\boldsymbol{Formiato \rightarrow H_2 + CO_2} \quad \text{Ec. 1.14}$$

Finalmente, la ruta más común de degradación de glucosa a piruvato es mediante la acción de la enzima NADH, la cual es oxidada a NAD^+. Dicho mecanismo es observado en microorganismos tanto anaerobios estrictos como facultativos (De Souza *et al.,* 2019; Show *et al.,* 2012). Las reacciones mostradas en las Ecuaciones 1.15, 1.16 y 1.17 muestran la producción de H_2 a partir de la enzima NADH.

$$\boldsymbol{C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ \rightarrow 2NADH + 2Piruvato + H^+} \quad \text{Ec. 1.15}$$

$$\boldsymbol{2NADH + 4Fd(ox) \rightarrow 4Fd(red) + 2NAD^+} \quad \text{Ec. 1.16}$$

$$\boldsymbol{4H^+ + 4Fd(red) \rightarrow 4Fd(ox) + 2H^2} \quad \text{Ec. 1.17}$$

Además del H_2, se generan ácidos orgánicos de bajo peso molecular como subproductos del metabolismo bacteriano (Ghimire *et al.,* 2015; Corona & Razo-Flores, 2018). 4 moles de H_2 por mol de glucosa son formados cuando el piruvato es oxidado a acetato como único producto final del metabolismo (Ec. 1.18), mientras que la oxidación del piruvato a butirato (Ec. 1.19) produce solamente 2 moles de H_2 (Das *et al.,* 2014). La fermentación con cultivos mixtos alcanza aproximadamente un rendimiento de 2.5 moles de H_2 y una relación de 3:2 entre el ácido butírico y el acético (Ghimire et al., 2015), la reacción involucrada se presenta en la Ec. 1.20.

$$\boldsymbol{C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2} \quad \text{Ec. 1.18}$$

$$\boldsymbol{C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2CO_2} \quad \text{Ec 1.19}$$

$$4C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 3CH_3CH_2CH_2COOH + 2CH_3COOH + 8CO_2 + 10H_2$$ Ec. 1.20

Diferentes tipos de hexosas, pentosas y carbohidratos producen diferentes cantidades de H_2, dependiendo de la vía metabólica y de los subproductos finales. En la práctica, altos rendimientos en la producción de biohidrógeno están asociados a una mezcla de acetato y butirato, mientras que los rendimientos bajos se asocian a la presencia de propionato y lactato (Gonzales *et al.,* 2016; Türker *et al.,* 2008).

1.6.2 Factores que afectan la producción de biohidrógeno fermentativo

La producción de biohidrógeno por fermentación anaerobia es un proceso muy complejo influenciado por varios factores tales como el inóculo, tipo de sustrato, configuración del biorreactor, concentración de nitrógeno, fósforo e iones metálicos, temperatura, pH y tiempo de retención hidráulico (Soares *et al.,* 2020). Para la generación de biohidrógeno, es necesaria la eliminación de los microorganismos productores de CH_4 y NH_3, ya que éstos consumen el H_2 que producen las bacterias acidogénicas (Muñoz-Páez *et al.,* 2019). Los principales factores que afectan la producción de H_2 son los siguientes:

a) Cultivos puros. Entre las bacterias más utilizadas para la producción de biohidrógeno se encuentran las del género *Clostridium*, las cuales son Gram positivo, anaerobias estrictas y formadoras de esporas. *Enterobacter* es otra especie que ha sido utilizada, la cual se caracteriza por ser Gram negativa y facultativa (Ingle *et al.,* 2020). Las bacterias facultativas producen un rendimiento máximo de 2 mol de H_2 / mol de glucosa, mientras que los anaerobios estrictos alcanzan 4 mol de H_2 / mol de hexosa. Las bacterias facultativas pueden consumir las pequeñas cantidades de oxígeno presente en el medio haciéndolo completamente anaerobio, debido a esta característica la fermentación con éste tipo de bacterias ha sido considerado económicamente viable (Soares *et al.,* 2020).

b) Cultivos mixtos. Las bacterias capaces de producir H_2 encontradas en ambientes naturales como el suelo, aguas residuales, compostas, lodos activados, residuos

de ganado y residuos agrícolas son consideradas como cultivos mixtos, los cuales son factibles para su uso en escala industrial debido a que no requieren tantos cuidados en comparación con los cultivos puros (Kumar *et al.,* 2018). Las ventajas de los cultivos mixtos son sus bajos costos de operación, simplicidad en el control del proceso y capacidad para fermentar distintos tipos de sustratos (Soares *et al.,* 2020). De acuerdo con Muñoz-Páez *et al.* (2019). los cultivos mixtos tienen la habilidad para degradar completamente al furfural y parcialmente al HMF durante la fermentación oscura, además el cultivo mixto proveniente de los lodos de un fermentador anaerobio está principalmente formado por bacterias *Clostridium*. Cuando se utilizan cultivos mixtos, el H_2 producido puede ser utilizado por las bacterias consumidoras de H_2, por lo cual, estos cultivos deben ser pre-tratados bajo ciertos métodos para suprimir las bacterias indeseables mientras se favorece la actividad de las bacterias hidrogénicas (Soares *et al.,* 2020). El tratamiento térmico a 105°C durante 2 horas resulta eficiente para la eliminación de las bacterias exceptuando las esporas del género *Clostridium* (Ávila, 2010; *Lu et al., 2019), por otra parte, el ajuste de pH por debajo de 6 inhibe la actividad* metabólica de los metanógenos, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos productores de H_2 (Ghimire *et al.,* 2015).

c) Cambio de la presión parcial de H_2 y CO_2 en el biorreactor. El incremento en la presión parcial de H_2 en el espacio gaseoso durante el proceso de fermentación puede asociarse a un decremento de la producción de H_2. Cuando la presión parcial de H_2 se incrementa, el cultivo microbiano comienza la generación de otros subproductos como el etanol, butanol, lactato y anilina (Soares *et al.,* 2020). El uso de gases como el N_2 y el CO_2, además del uso de membranas de separación y la aplicación de vacío han sido empleados recientemente como métodos alternativos para reducir la presión parcial de H_2 en el biorreactor (Lee *et al.,* 2012). La producción de etanol y ácido acético por los microorganismos productores de H_2 se muestra en la Ecuación 1.21.

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + 2H_2 + 2CO_2 + CH_3COOH \quad \text{Ec. 1.21}$$

Por otra parte, la presión parcial de CO_2 también afecta el rendimiento del proceso y la producción de biohidrógeno. Las células sintetizan formato y succinato a partir del CO_2, el cual actúa como un imán robando los electrones destinados a la producción de H_2 (Das *et al.,* 2014).

d) Tiempo de retención hidráulico. El tiempo de retención hidráulico es una medida del tiempo promedio, en el cual un sólido soluble se encuentra dentro de un biorreactor en operación (Das *et al.,* 2014), dicho tiempo puede afectar la hidrólisis de los sustratos, y a su vez la producción de metabolitos intermediarios y de biohidrógeno, es considerado como un parámetro de control de la actividad metanogénica (Ghimire *et al.,* 2015). Un tiempo de retención hidráulico corto se asocia a rendimientos altos en la producción de H_2 y a bajos costos de construcción, disminuyendo el tamaño del biorreactor, sin embargo, un tiempo de retención muy bajo puede disminuir la degradación del sustrato (Pandey *et al.,* 2013). La retención de sólidos óptima para la producción de biohidrógeno depende del tipo de sustrato utilizado, la velocidad de hidrólisis y la biodegradabilidad de la materia orgánica (Ghimire *et al.,* 2015). Lu *et al.* (2019), estudiaron la producción de biohidrógeno en un fermentador de 3 m^3 utilizando glucosa como única fuente de carbono. De acuerdo con ellos, el tiempo de retención hidráulico óptimo fue de 24 horas, a tiempos posteriores el mezclado entre la biomasa y el sustrato fue deficiente mientras que a las 12 horas la producción de ácidos orgánicos fue baja lo que disminuyó el rendimiento de producción de biohidrógeno.

e) Concentración de iones metálicos. Las altas concentraciones de iones metálicos pueden tener efectos inhibitorios sobre los microorganismos productores de biohidrógeno, sin embargo, cantidades traza de algunos metales pueden incrementar la eficiencia del proceso (Ghimire *et al.,* 2015). Los iones metálicos a nivel celular funcionan como cofactores enzimáticos, lo que favorece el crecimiento de la célula y los procesos de transporte (Chong *et al.,* 2009). Elementos como el sodio (Na), magnesio (Mg), zinc (Zn), níquel (Ni) y hierro (Fe)

son metales traza importantes que favorecen el metabolismo de los microorganismos productores de H_2 (Das *et al.,* 2014). La importancia del Fe radica en la formación de ferrodixina, la cual es requerida por las hidrogenasas, enzima clave en la producción de biohidrógeno (Chong *et al.,* 2009). Por otra parte, el Mg es un elemento que se encuentra presente en la pared y membrana celular, como micronutriente sirve como activador de las enzimas involucradas en el proceso de glucólisis, tales como las quinasas, hexoquinasas y fosfofructoquinasas (Das *et al.,* 2014). Algunos metales pesados como cadmio (Cd), cromo (Cr), zinc (Zn), cobre (Cu) y plomo (Pb) presentes en los RSU y residuos industriales pueden inhibir de manera total o parcial el crecimiento de los microorganismos (Ghimire *et al.,* 2015), siendo Cr, Cu y Zn los elementos que más efecto tienen sobre el metabolismo de los microorganismos acidogénicos (Das *et al.,* 2014). En años recientes se ha estudiado el uso de nano partículas metálicas y de óxidos metálicos como una alternativa para favorecer el funcionamiento de las enzimas e incrementar la producción de biohidrógeno (Kumar[b] *et al.,* 2019), los metales mayormente estudiados han sido el hierro, níquel, titanio, paladio y oro, siendo el hierro el más eficiente en su forma cero-valente y el níquel en su forma iónica (Taherdanak *et al.,* 2016).

f) Concentración de fósforo y nitrógeno. En los procesos de producción de biohidrógeno, las sales de fósforo (P) y nitrógeno (N) son suplementos necesarios que ayudan a obtener cultivos celulares óptimos (Show *et al.,* 2011). El N es un componente esencial de los aminoácidos y es requerido por los microorganismos para un crecimiento celular adecuado (Ghimire *et al.,* 2015). Estudios recientes han demostrado que el N orgánico resulta más favorable para la producción de H_2, que el inorgánico (Pandey *et al.,* 2013), de igual manera, se ha definido una relación óptima entre C:N la cual oscila entre 13 y 30 (Das *et al.,* 2014; Prabakar *et al.,* 2018). Por otro lado, el ión fosfato (PO_4^{-3}) es uno de los nutrientes inorgánicos más importantes requerido para la óptima producción de H_2, un exceso de fosfatos favorece la producción de biohidrógeno y de ácidos orgánicos volátiles (Show *et al.,* 2011).

g) Concentración de ácidos orgánicos volátiles. Además de la producción de H_2 mediante digestión anaerobia, se generan metabolitos secundarios como el etanol y los ácidos orgánicos volátiles los cuales afectan el metabolismo bacteriano (Pandey *et al.,* 2013). Altos rendimientos en la producción de biohidrógeno van acompañados por la presencia de ácido butírico y acético, mientras que los bajos rendimientos se asocian al metabolismo dirigido a ácido láctico y propiónico (Yasin *et al.,* 2013; Soares *et al.,* 2020). El incremento en la concentración de ácidos orgánicos volátiles aumenta la fuerza iónica del medio de cultivo causando que los protones permeen la membrana celular de las bacterias productoras de H_2, corrompiendo su balance fisiológico y provocando lisis celular (Pandey *et al.,* 2013). A temperatura ambiente, la degradación de residuos orgánicos es gobernada por las bacterias productoras de ácido láctico, pretratamientos como el térmico, químico y ajuste de pH se han utilizado para inhibir dichos microorganismos (Yasin *et al.,* 2013).

h) pH. El pH juega un papel importante, ya que tiene efectos significativos sobre la producción de biohidrógeno, velocidad de producción, rutas metabólicas y actividad enzimática (Yasin *et al.,* 2013). Un pH ácido afecta la actividad de la enzima hidrogenasa, la cual contiene Fe y juega un papel fundamental en la generación de H_2 (Ghimire *et al.,* 2015). El pH óptimo para la producción de biohidrógeno se encuentra en el rango de 5 a 7, alcanzando mejores rendimientos a un pH cercano de 5.5 (Soares *et al.,* 2020; Show *et al.,* 2011). A pH mayor a 8 y menor a 4 no se ha reportado producción de H_2 (Prabakar *et al.,* 2018; Yasin *et al.,* 2013). Reddy *et al.* (2017), evaluaron el efecto del pH sobre la producción de hidrógeno fermentativo en régimen mesofílico utilizando hidrolizados del bagazo de azúcar de caña como fuente de carbono, observando que el rendimiento aumentó considerablemente cuando el pH subió de 3 a 5, mientras que a pH de 8 la generación de hidrógeno fue muy baja.

i) Temperatura. La temperatura de incubación afecta dramáticamente la velocidad de las reacciones celulares y con ello al crecimiento de los microorganismos, al

mismo tiempo afecta los patrones metabólicos, requerimientos nutricionales y la composición de las células bacterianas (Das *et al.,* 2014). La digestión anaerobia puede llevarse a cabo en régimen mesofílico (25 – 40 ºC), termofílico (40 – 65 ºC), termofílico extremo (65 – 80 ºC) e hiper-termofílico (> 80 ºC), los rendimientos más altos de biohidrógeno se han observado en régimen termofílico mientras que la producción volumétrica se ve favorecida a condiciones mesofílicas (Soares *et al.,* 2020). Diversos trabajos han mostrado que el potencial de producción de biohidrógeno es mayor en condiciones termofílicas e hiper-termofílicas, lo cual está asociado a que en régimen mesofílico la caída de pH resulta mayor (Prabakar *et al.,* 2018; Sattar *et al.,* 2016).

1.6.3 Microorganismos y sustratos utilizados en la producción de biohidrógeno

Existe un gran número de microorganismos capaces de producir biohidrógeno a diferentes velocidades y rendimientos, dependiendo las condiciones de operación, rutas metabólicas y sustrato orgánico. De acuerdo con Pandey *et al.* (2013) y Das *et al.* (2014), los microorganismos productores de H_2 pueden clasificarse con base a su temperatura de crecimiento, sustrato utilizado, tolerancia al oxígeno y metabolitos finales.

Uno de los microorganismos productores de biohidrógeno más estudiados es la especie anaerobia estricta y formadora de esporas *Clostridium* (Ingle *et al.,* 2020), la cual *es* una bacteria acidogénica anaerobia estricta que tiene forma de pequeños bastoncillos de entre 0.6-1.2 µm de diámetro por 3-7 µm de largo, se pueden encontrar en pares, cadenas cortas y en ocasiones en filamentos largos (Buchanan, 1974). Tienen la capacidad de formar esporas (endoesporas) para protegerse de condiciones ambientales desfavorables, como temperaturas elevadas, pH extremo y antibióticos (Madigan *et al.,* 2003). Algunas bacterias pertenecientes a la especie *Clostridium* tienen la capacidad de producir xilanasas y celulasas (Leya *et al.,* 2014). Las bacterias *C. cellulovorans* y *C. cellulolyticum* han sido estudiadas debido a su capacidad para producir celulosomas, responsables de la depolimerización de celulosa con un metabolismo dirigido a H_2, CO_2, lactato, butirato, acetato y formato,

sin embargo, algunas técnicas de ingeniería metabólica como la mejora de la capacidad celulolítica han sido empleadas para incrementar la eficiencia de la fermentación (Bao *et al.,* 2019).

Además de *Clostridium,* otro género que presenta altos rendimientos para la producción de biohidrógeno es *Enterobacter sp.,* el cual puede fermentar carbohidratos en condiciones mesofílicas (De Souza *et al.,* 2019; Ávila, 2010). Estas bacterias no presentan inhibición a altas presiones parciales de H_2, sin embargo, presentan rendimientos más bajos que *Clostridium*, pues producen otros subproductos propios como el lactato, además poseen la capacidad de crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias. El rendimiento de producción de biohidrógeno de las bacterias *Enterobacter* puede incrementarse utilizando algunas técnicas como la mutación de bacterias asistida con radiación gamma (Cheng *et al.,* 2017).

La producción de H_2 utilizando bacterias termófílas e hiper-termófilas ha sido identificada como un proceso de cinética favorable, que disminuye la contaminación del sustrato e inhibe la proliferación de bacterias metanogénicas. Los cultivos termofílos puros juegan un papel importante en la comprensión del uso directo de la celulosa como materia prima (Jiang *et al.,* 2015). Los cultivos termófilos más estudiados han sido: *Anaerocellum, Caldicellulosiruptor, Clostridium, Dictyoglomus, Thermotoga, Spirocheta* y *Thermoanaerobacterium* (Elsharnouby *et al.,* 2013). La Tabla 1.3 resume algunos de los trabajos reportados en la literatura relacionados con la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura utilizando cultivos bacterianos puros.

Alrededor del 80% de los sustratos utilizados para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura corresponden a azúcares monoméricos, diméricos y polisacáridos, de ellos la glucosa, la sacarosa y la lactosa son los azúcares puros

Tabla 1.3 Producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura a partir de diferentes sustratos

SUSTRATO	MICROORGANISMO	TEMPERATURA	RENDIMIENTO	REFERENCIA
Residuos de frutas y verduras	*Clostridium butyricum* *Enterobacter cloacae*	37 ºC	2.74	Ávila, 2010
Glucosa	*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*	72 ºC	2.8	Mars *et al.,* 2010
Glucosa	*Thermotoga neapolitana*	75 ºC	3	Ngo *et al.,* 2012
Jugo de azúcar de caña	*Clostridium butyricum*	37 ºC	1.33	Plangklang *et al.,* 2012
Galactosa	*Enterobacter aerogenes*	37 ºC	2.80	Ren *et al.,* 2009
Glucosa	*Escherichia coli*	37 ºC	0.3	Rosales-Colunga *et al.,* 2012
Glucosa	*Clostridium beijerincki*	35 ºC	1.97	Zhao *et al.,* 2011

empleados comúnmente debido a su fácil biodegradación, su estructura simple y a su presencia en efluentes industriales (Show *et al.,* 2012). Sin embargo, dichos carbohidratos resultan costosos para la producción de biohidrógeno a escala industrial (Das *et al.,* 2014). Los sustratos más complejos como los residuos agrícolas, los productos lignocelulósicos, las plantas acuáticas, los residuos orgánicos municipales, las aguas residuales domésticas, las vinazas y los desechos agro-industriales muestran un alto potencial desde la perspectiva económica (Elsharnouby *et al.,* 2013). Los residuos orgánicos municipales están compuestos principalmente por residuos de comida, los cuales poseen un alto contenido de carbohidratos (85-95%) y de sólidos volátiles (75-85%) que pueden ser utilizados para la producción de biohidrógeno en procesos continuos o estacionarios (Chong *et al.,* 2009).

Las aguas residuales provenientes de las industrias alimenticias y agro-industriales tienen un alto potencial para la producción de biohidrógeno fermentativo debido a su

alto contenido de azúcares y almidones fácilmente fermentables por las bacterias productoras de hidrógeno (Ghimire *et al.,* 2015). El agua residual derivada de las industrias lácteas ha sido considerada como un sustrato importante, ya que está compuesta principalmente por lactosa (Chong *et al.,* 2009). Por otro lado, en comparación con otros sustratos los lodos de las plantas tratadoras de agua presentan algunas ventajas tales como: abundancia, factibilidad económica y la presencia de macro y micronutrientes (vitaminas y minerales) que favorecen el desarrollo celular (Pandey *et al.,* 2013). La principal desventaja de este sustrato es la presencia de microorganismos metanogénicos, lo cual incrementa el costo del proceso debido al pretratamiento térmico al que son sometidos los lodos (Ghimire *et al.,* 2015). Otro sustrato que ha sido estudiado recientemente es el estiércol de ganado, cuya producción anual rebasa los 1500 millones de toneladas, los cuales al no ser tratados adecuadamente pueden ocasionar afecciones en los cuerpos de agua (Ghimire *et al.,* 2017). Debido a su alto contenido de nitrógeno, el estiércol es utilizado en procesos de co-digestión junto a residuos agrícolas, a fin de mantener una relación C:N adecuada para la fermentación (Ghimire *et al.,* 2015).

Los residuos lignocelulósicos también conocidos como biomasa de segunda generación, son los residuos orgánicos más abundantes y económicos que pueden transformarse biológicamente para generar productos de valor agregado (Ingle *et al.,* 2020). El uso de este tipo de biomasa para la producción de biohidrógeno es considerada como sustentable y económicamente viable (Ghimire *et al.,* 2015). De todos los sustratos, la biomasa lignocelulósica es conocida como la materia prima más factible y desde el punto de vista económico más eficiente para su uso a gran escala (Paul & Dutta, 2018), sin embargo, sus principales limitaciones son su estructura compleja, su alto contenido de lignina y sus regiones cristalinas que limitan la actividad metabólica de los microorganismos (Raud *et al.,* 2016).

Previo a la digestión anaerobia, la biomasa lignocelulósica debe ser pretratada e hidrolizada a fin de incrementar su fermentación, área superficial y cantidad de azúcares monoméricos (Ghimire *et al.,* 2015). Los rendimientos de la producción de

biohidrógeno a partir de lignocelulosas se encuentran entre el 20% y el 80% del valor hipotético máximo (4 mol H_2 / mol hexosa) y dependen del tipo de biomasa, el pretratamiento empleado, la temperatura de fermentación y del microorganismo (Elsharnouby *et al.,* 2013). Debido a la eficiencia del tratamiento ácido, durante los últimos años se ha estudiado la producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados ácidos de biomasa lignocelulósica (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Rendimientos citados en la literatura para la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados ácidos

Sustrato	Hidrólisis	Microorganismo	Temperatura	mol H_2 / mol hexosa	Referencia
Tallo de haba	7%v H_3PO_4, 130°C, 2 horas.	*Clostridium butyricum* y *Enterobacter cloacae*	37°C	0.33	Gómora, 2016
Olote	7%v H_3PO_4, 130°C, 2 horas.	*Clostridium butyricum* y *Enterobacter cloacae*	37°C	0.52	Gómora, 2016
Paja de arroz	55%v H_2SO_4, 40°C y 20 minutos.	Lodos de fermentador	37°C	0.44	Liu *et al.,* 2013
Residuos de cultivo de hongos	55%v H_2SO_4, 40°C, 40 minutos y relación 1:5 entre sólido y líquido.	Lodos de fermentador	37°C	0.49	Li *et al.,* 2011

2. METODOLOGÍA

La metodología general del proyecto de investigación se presenta en la Figura 2.1.

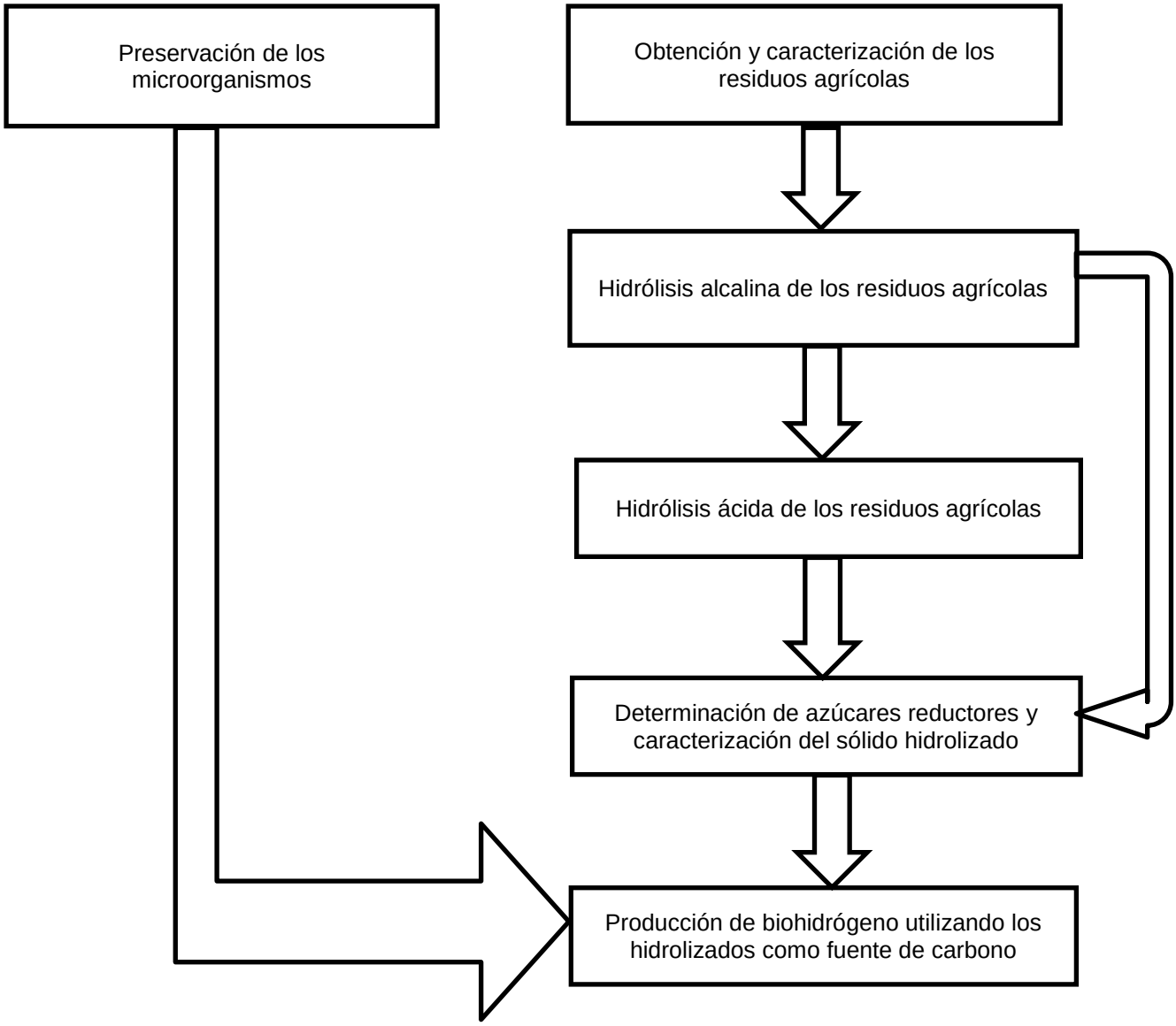


Figura 2.1. Metodología general del trabajo de investigación

2.1 Preservación de los microorganismos

Para la producción de biohidrógeno mediante fermentación se utilizaron las bacterias *Clostridium butyricum* y *Enterobacter cloacae*. Ambas bacterias se seleccionaron debido a su capacidad para producir hidrógeno con altos rendimientos y tasas de producción en régimen mesofílico (Ávila, 2010; Plangklang *et al.,* 2012). Los

microorganismos se preservaron en medio de cultivo hecho a base de tioglicolato con resarzurina mediante la técnica de Hungate modificado (Terry *et al.,* 1974), el cultivo de las bacterias se realizó cada dos meses a una temperatura de 37 ºC y un tiempo de incubación de 24 horas.

2.2 Obtención y caracterización de los residuos agrícolas

Debido a que los cultivos predominantes en el Estado de México son el haba y el maíz, los rastrojos de dichos cultivos se utilizaron como materia prima para la producción de azúcares monoméricos. Dichos rastrojos se obtuvieron de cultivos que no tuvieron contacto con fertilizantes químicos ni plaguicidas y se trasladaron al Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA) del Instituto Tecnológico de Toluca (ITT).

Los residuos agrícolas se secaron a temperatura ambiente, se trituraron, las partículas menores a 250 µm se recuperaron y se determinó su pH y su contenido de holocelulosa, lignina, humedad y Sólidos Volátiles Totales (SVT) (Anexo A). Previo a la determinación de holocelulosa y lignina, se sometieron a una extracción soxhlet utilizando como disolvente una mezcla 2:1 de etanol-tolueno, la cual tuvo como objetivo eliminar los compuestos extractivos interferentes tales como clorofila, terpenos y resinas.

2.3 Tratamiento alcalino de los residuos agrícolas

El tratamiento alcalino se llevó a cabo con la finalidad de remover parcialmente a la lignina presente tanto en el Tallo de Haba (TH) como en el Rastrojo de Maíz (RM). Para ello, se prepararon soluciones al 1, 2 y 3 % de NaOH y se mezclaron con los residuos agrícolas previamente triturados y secados dentro de viales de 25 mL en una proporción de 1 g de muestra por cada 15 mL de solución alcalina. La reacción se llevó a cabo dentro de una autoclave a 121°C durante 60 y 120 minutos. Al término de la reacción, los viales se sacaron de la autoclave y se enfriaron a temperatura ambiente, posteriormente las fases se separaron mediante filtración al vacío, el sólido residual se lavó con agua destilada caliente hasta pH neutro, se secó

a 45ºC y se determinó su contenido de lignina, así como los desplazamientos de sus principales grupos funcionales mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) (Anexo A7). Las condiciones de operación fueron seleccionadas con base a trabajos previamente reportados (Michalska *et al.,* 2015; Sambusiti *et al.,* 2013).

Las condiciones de operación que fueron eficientes para remover a la lignina sin alterar demasiado la hemicelulosa, fueron escaladas en un reactor de 200 mL y trabajadas acorde a lo descrito anteriormente. Posteriormente se pesaron muestras de 1 g en base seca del sólido tratado con NaOH y se mezclaron con 15 mL de una solución de H_3PO_4 0.96 M dentro de viales de 25 mL, las cuales se sellaron y se colocaron en un horno a una temperatura de 100 ºC durante distintos tiempos de operación a fin de evaluar la producción de azúcares monoméricos. Muestras de los residuos agrícolas sin tratamiento alcalino también se sometieron al tratamiento ácido. Los datos experimentales de la producción de azúcares reductores se ajustaron al modelo cinético de Saeman (Ec. 1.4) utilizando una regresión no lineal en el software Origin 8.6.

2.4 Hidrólisis ácida de los residuos agrícolas

La hidrólisis ácida se realizó con H_3PO_4 a las concentraciones de 0.58, 0.77, 0.96 y 1.34 M y a las temperaturas de 90, 100 y 110 °C, durante 300 minutos de tiempo de reacción, condiciones propuestas con base a lo reportado por Cao *et al.* (2009), Cao *et al.* (2018), Gómora (2016), Guerra-Rodríguez *et al.* (2012) y López-Linares *et al.* (2013). Cada una de las muestras se prepararon mezclando 1 g de residuo agrícola triturado y seco (con partículas inferiores a 250 mesh), con 15 mL de solución ácida a la concentración deseada dentro de viales de 25 mL, posteriormente los viales se homogenizaron y se sellaron con tapas de caucho y aluminio para evitar posibles fugas y se colocaron dentro de un horno a la temperatura de operación. Los viales se dejaron reaccionar durante distintos tiempos y se tomaron dos muestras cada 30 minutos hasta llegar a los 300 minutos. Al término de la hidrólisis los sistemas se dejaron enfriar a temperatura ambiente, las fases se separaron mediante filtración y

en la fase líquida también conocida como *hidrolizado* se determinó el pH, el FSC (Ec. 1.1), el contenido de azúcares reductores y la concentración de furfural tal y como se describe en el Anexo B. Tanto el tratamiento alcalino como la hidrólisis ácida se llevaron a cabo de acuerdo al diagrama mostrado en la Figura 2.2.

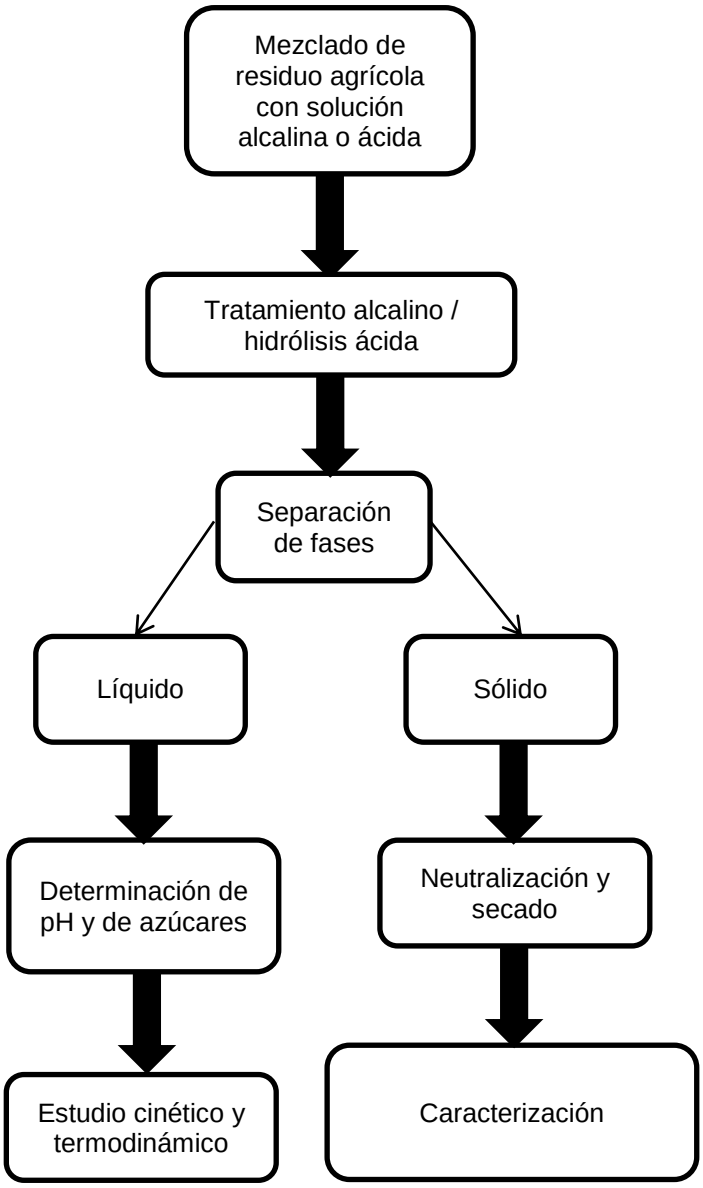


Figura 2.2. Metodología empleada para el tratamiento alcalino e hidrólisis ácida de los residuos agrícolas

Los hidrolizados con el mayor contenido de azúcares se caracterizaron mediante Cromatografía Líquida de Intercambio Aniónico de Alta Eficiencia acoplada a un Detector de Pulso Amperométrico (HPAEC-PAD) tal y como fue reportado por Mellado-Mojica *et al.* (2016), esto con la finalidad de identificar los tipos de azúcares presentes en el hidrolizado. La cantidad total de azúcares reductores, la concentración de furfural y el FSC se estudiaron estadísticamente utilizando el análisis de Varianza (ANOVA) y la metodología por superficie de respuesta a fin de conocer el efecto de las principales variables de hidrólisis sobre la eficiencia del tratamiento ácido. El análisis estadístico se llevó a cabo en Minitab.

La fase sólida remanente se lavó con agua destilada caliente hasta pH neutro para remover el exceso de iones atribuidos al ácido, posteriormente se secaron durante 2 días a 45°C, se trituraron y se caracterizaron mediante las técnicas de FTIR, Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) (Anexos A7 – A8).

2.4.1 Análisis cinético y termodinámico de la hidrólisis ácida

La cantidad de azúcares reductores se determinó en cada uno de los hidrolizados mediante el método del ácido 3-5 dinitro salicílico (DNS) (Anexo B2). Los datos de la producción de azúcares reductores se ajustaron al modelo cinético de Saeman (Ec. 1.4) y al de primer orden (Ec. 1.5) utilizando una regresión no lineal en el software Origin 8.6.

Las constantes de velocidad obtenidas con ambos modelos se utilizaron para el cálculo de los parámetros termodinámicos tales como la Energía de activación (*Ea*), Factor de frecuencia (*A*), cambio en la Entalpía (ΔH), cambio en la Entropía (ΔS) y Energía libre de Gibbs (ΔG), los cuales se calcularon a fin de conocer los cambios energéticos a nivel molecular y comprender la naturaleza de la hidrólisis de los residuos agrícolas con ácido diluido. Para el cálculo de la *Ea* y del *A* se utilizó la ecuación de Arrhenius, cuya forma lineal se muestra en la Ecuación 2.1.

$$\boldsymbol{lnk = lnA - \frac{E_a}{RT}} \qquad \text{Ec. 2.1}$$

En donde *k* es la constante cinética (min^{-1}), *A* el factor de frecuencia (min^{-1}), E_a la energía de activación (J mol^{-1}), *R* la constante de los gases ideales (8.3144 J mol^{-1} K^{-1}) y *T* la temperatura absoluta (K). Un gráfico que correlaciona a T^{-1} en el eje de las ordenadas y a *ln k* en el eje de las abscisas permite calcular los parámetros termodinámicos a partir de la pendiente; E_a / R y de la ordenada al origen; *Ln (A)*.

El cálculo de *ΔH* y de *ΔS* se realizó con ayuda de la ecuación de Eyring, cuya forma lineal se muestra en la Ecuación 2.2.

$$\boldsymbol{\ln\left(\frac{k}{T}\right) = ln\frac{k_B}{h_p} + \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}} \qquad \text{Ec. 2.2}$$

En donde *R* y *T* tienen el mismo significado y unidades que en la ecuación de Arrhenius, *k* es la constante cinética (seg^{-1}), K_B la constante de Boltzmann ($1.3807X10^{-23}$ J K^{-1}), h_p la constante de Planck ($6.6261X10^{-34}$ J seg), *ΔS* el cambio en la entropía (J mol^{-1} K^{-1}) y *ΔH* el cambio en la entalpía (J mol^{-1}). La gráfica de *Ln (k/T)* en función de *1/(RT)* permite calcular los valores de *ΔS* y de *ΔH* a partir de la ordenada al origen y de la pendiente de la línea recta respectivamente. Finalmente, *ΔG* se calculó a partir de la relación termodinámica mostrada en la Ecuación 2.3.

$$\boldsymbol{\Delta G = \Delta H - T\Delta S} \qquad \text{Ec. 2.3}$$

2.5 Producción de biohidrógeno mediante fermentación

La producción de biohidrógeno se llevó a cabo en viales de 20 mL similares a los empleados para la preservación de los microorganismos. Las bacterias utilizadas fueron *C. butyricum* y *E. cloacae*, ambos microorganismos han sido reportados por Ávila (2010) y Plangklang *et al.* (2012) como opciones viables para la producción de biohidrógeno en régimen mesofílico.

El medio de cultivo utilizado en las fermentaciones se muestra en la Tabla 2.1, el cual se preparó agregando sales de fosfato y amonio que además de brindar nutrientes a las bacterias, funcionan como solución amortiguadora. La resarzurina se utilizó como indicador de oxígeno, ya que en medio aerobio presenta un color rosa y en medio anaerobio un color amarillo

Tabla 2.1 Composición del medio de cultivo utilizado en las fermentaciones

REACTIVO	g / L
$(NH_4)_2SO_4$	1
KH_2PO_4	4.5
K_2HPO_4	10.5
Resarzurina	0.1

La fuente de carbono utilizada en cada una de las fermentaciones fue el hidrolizado con la mayor cantidad de azúcares producido con ambos residuos agrícolas. A fin de obtener la cantidad suficiente de hidrolizado para las fermentaciones, la hidrólisis ácida se escaló en un frasco GL55 de 500 mL, en donde se hicieron reaccionar 15 g de residuo con 225 mL de solución ácida a la concentración deseada y a la temperatura de reacción óptima. El hidrolizado obtenido se trató con hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$) bio-Ultra (Sigma-Aldrich), a fin de ajustar el pH del licor precipitando el exceso de iones PO_4 en forma de fosfato de magnesio ($Mg_3(PO_4)$) (Ec. 2.4) y de remover parcialmente a los compuestos inhibidores.

$$\mathbf{2H_3PO_4 + 3Mg(OH)_2 \rightarrow Mg_3(PO_4)_2 + 6H_2O} \qquad \text{Ec. 2.4}$$

El $Mg_3(PO_4)_2$ generado durante la neutralización con $Mg(OH)_2$ es un compuesto insoluble en agua y puede ser utilizado como regulador metabólico así como suplemento alimenticio (López-Linares *et al.,* 2013). Una vez precipitado el $Mg_3(PO_4)_2$, las fases se separaron mediante filtración y se determinó el volumen final del hidrolizado, el pH, el contenido total de azúcares reductores y la concentración de aldehídos.

En cada uno de los viales empleados para la fermentación se mezcló el medio de cultivo con hidrolizado neutro utilizando diferentes proporciones, posteriormente los viales se pusieron en condiciones anaerobias, se sellaron con ayuda de una pinza y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y a una presión de 1.1 kg/cm^2. Cada uno de los viales se inocularon con 100 µL de *C. butyricum* y 100 µL de *E. cloacae* y se colocaron en incubación a 37 ºC sin agitación.

La concentración de hidrógeno en el *headspace* se determinó mediante cromatografía de gases (Anexo C), mientras que la cantidad de microorganismos por mL y el pH de la solución se determinaron mediante la cuenta directa al microscopio en una cámara de Petroff-Hausser (Anexo B5) y con un potenciómetro (Anexo B1) respectivamente. La cinética de crecimiento bacteriano y de producción de biohidrógeno, se determinó con el modelo de Gompertz modificado (Ec. 2.5), determinando así el tiempo de latencia, la velocidad máxima de producción y/o crecimiento, y el crecimiento y/o producción máxima potencial (Gonzales *et al.,* 2016; Liu *et al.,* 2013).

$$\mathbf{H(t) = P \cdot exp[-exp\left[\frac{R_m e}{P}(\gamma - t) + 1\right]]} \qquad \text{Ec. 2.5}$$

En donde, *H(t)* es la producción acumulada de biohidrógeno (mL) o el crecimiento celular (célula / mL), R_m la velocidad máxima de producción (mL / hr) o de crecimiento (célula / mL h), *P* la producción máxima potencial (mL) o el crecimiento máximo esperado (célula / mL), ϒ y *t* son respectivamente el tiempo de latencia y el tiempo de operación dados en horas mientras que ***e*** equivale a 2.718.

Para la producción de biohidrógeno fermentativo se hicieron 3 experimentos:

a) El primer experimento se realizó mezclando 8.5 mL de medio de cultivo (Tabla 2.1) con 1.5 mL de hidrolizado neutro ajustando el pH inicial a un valor de 7.0 con una solución de KOH 0.1 M, en viales de 20 mL. Los viales se colocaron en condiciones anaerobias utilizando el método de Hungate modificado, se dejaron

incubar a 37^{O}C y cada 2 horas se tomaron 2 muestras y se determinó el pH, la cantidad de bacterias y la producción de biohidrógeno. Los hidrolizados tanto del olote como del TH se utilizaron como única fuente de carbono para la producción de H_2.

b) En ésta serie de experimentos se agregaron diferentes cantidades de hidrolizado comenzando con 300 µL hasta 1800 µL en viales de 20 mL completando hasta un volumen final de 10 mL con el medio de cultivo. La variable de estudio fue el pH inicial de la solución, ya que algunos viales se ajustaron a un valor de 7 con KOH 0.1 M mientras que a otros no se les adicionó la solución de potasio. Los viales se prepararon con el método de Hungate modificado y se incubaron durante 20 horas, el tiempo se seleccionó con base a lo reportado en la literatura (Gómora-Hernández *et al.,* 2016).

c) El medio de cultivo utilizado en éste tercer experimento fue propuesto por Miller (1972) y se conoce como *medio mínimo*, su composición es la misma a la mostrada en la Tabla 2.1, con la diferencia de que a éste medio se le agregó 1 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M, preesteriliado por cada litro de solución. A fin de evaluar el efecto de la cantidad inicial de azúcares sobre la producción de biohidrógeno, se mezclaron 9 mL de medio mínimo con distintos volumenes de hidrolizado neutro; 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 mL en viales de 20 mL, se determinó el pH inicial de la solución, posteriormente los viales se sellaron y se esterilizaron en una autoclave a 121ºC, se inocularon con 100 µL de *E. cloacae* y 100 µL de *C. butyricum* y se incubaron a 37 ± 1 ºC durante 20 horas. La preparación de los viales se llevó a cabo dentro de una cámara de guantes con atmósfera de nitrógeno, utilizando una lámpara UV para asegurar la esterilidad de los materiales, del medio mínimo y del los hidrolizados.

Con la finalidad de preservar los lixiviados obtenidos durante la fermentación para su posterior análisis de ácidos orgánicos volátiles por cromatografía, se tomaron 0.9 mL de lixiviado y se mezclaron con 0.1 mL de ácido fórmico, la mezcla se refrigeró a una temperatura de 4ºC (Ávila, 2010).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se discute la caracterización de los residuos agrícolas antes y después de los tratamientos químicos, la producción de azúcares reductores mediante hidrólisis con ácido fosfórico a baja concentración, así como la determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de los procesos de hidrólisis del olote y del tallo de haba.

3.1 Caracterización de los residuos agrícolas

La Tabla 3.1 resume la caracterización de los residuos agrícolas antes de los tratamientos.

Tabla 3.1Caracterización de los residuos agrícolas

ANÁLISIS	OLOTE	TALLO DE HABA
Humedad	4.52 ± 0.15%	3.27 ± 0.11%
SVT's	96.96 ± 0.07%	92.18 ± 0.18%
Cenizas	3.04 ± 0.07%	7.82 ± 0.18%
Holocelulosa	65.38 ± 0.11%	61.48 ± 0.30%
Lignina	7.11 ± 0.47	12.16 ± 0.66%
pH	5.63 ± 0.005	5.60 ± 0.013

Los pH's determinados en el olote y en el tallo de haba resultaron similares entre sí, variando únicamente en un 0.03%. El mayor contenido de holocelulosa se observó en el olote, con un promedio de 65.38%. El tallo de haba con 61.48% de holocelulosa fue el de menor porcentaje, aunque comparado con lo reportado por Petersson *et al.,* (2007) el valor es mayor, ya que ellos encontraron un porcentaje de en base seca de 48.8%. Por otra parte, la lignina contenida en el tallo de haba fue de 12.16%, similar al 14.4% determinado también por Petersson *et al.* (2007).

Por otra parte, la composición del olote caracterizado por Li *et al.* (2016) resultó similar a lo determinado en el presente trabajo, ya que Li y colaboradores encontraron porcentajes de 68.2% y 15.4% para la holocelulosa y la lignina respectivamente. La diferencia en el porcentaje de lignina con el reportado en el presente trabajo puede atribuirse tanto a la naturaleza del rastrojo como al tipo de

lignina predominante en el material. Finalmente, el porcentaje de SVT's de cada uno de los residuos fue superior a 92 %, sugiriendo un alto potencial para su aprovechamiento, la cantidad de minerales en forma de óxidos fue de aproximadamente 3 % para el olote y casi del 8 % para el tallo de haba.

De acuerdo con Chen *et al.* (2015) y con Guerra-Rodríguez *et al.* (2012), la máxima producción esperada de azúcares puede calcularse a partir de la ecuación 3.1.

$$C_m = \frac{f * C_c}{R_{ls}} \qquad \text{Ec. 3.1}$$

En donde C_m es la máxima concentración esperada de azúcares, R_{ls} la relación entre la fase líquida y la sólida (mL / g), f el factor estequiométrico debido a la hidratación de los sacáridos siendo 180/162 para el caso de las hexosas y 150/132 para las pentosas, y C_C la concentración inicial del polisacárido.

Asumiendo el factor estequiométrico para hexosas y la fracción másica inicial de holocelulosa, la máxima producción esperada de azúcares es de 72.64 g azúcar / 100 g olote, y 68.31 g azúcar / 100 g tallo de haba.

3.2 Hidrólisis ácida del olote

Debido a que el olote tuvo el mayor contenido de holocelulosa y el menor porcentaje de lignina (65.38% y 7.11% respectivamente), dicho residuo fue empleado para la producción de azúcares reductores mediante hidrólisis con ácido fosfórico diluido sin un tratamiento alcalino previo.

3.2.1 Producción de azúcares reductores con olote y factor de severidad

La producción de azúcares reductores a partir de olote se evaluó utilizando 4 concentraciones y 3 temperaturas; 0.58, 0.77, 0.96 y 1.34 M H_3PO_4 y 90, 100 y 110 ºC respectivamente. La máxima producción de azúcares fue de 54.31 g de azúcar / 100 g olote, obtenido después de 300 minutos en el experimento con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC. La producción de azúcares más baja corresponde al experimento realizado

con 0.58 M H_3PO_4 y 90 ºC, alcanzando un rendimiento de 14.85 g azúcar / 100 g olote después de 300 minutos. La Figura 3.1 muestra la producción de azúcares reductores y la conversión de holocelulosa a sacárido para cada uno de los experimentos realizados.

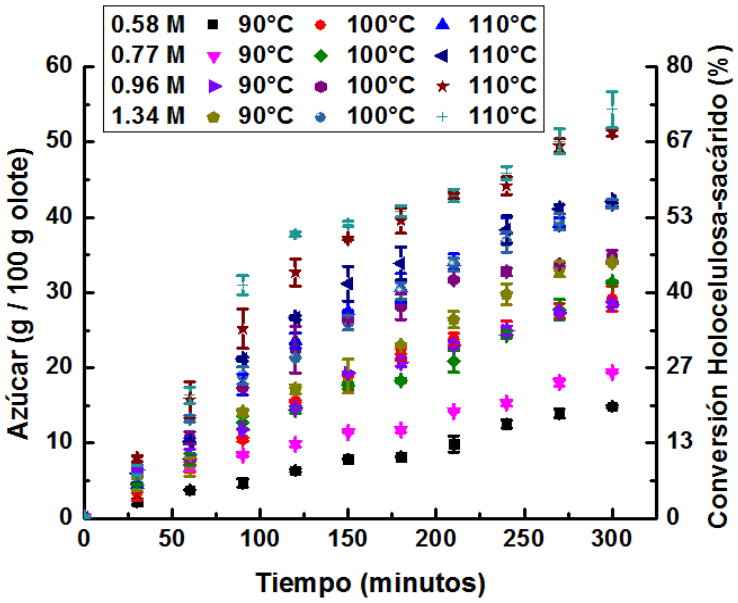


Figura 3.1. Producción de azúcares reductores a partir de olote

El porcentaje de conversión holocelulosa-sacárido más alto fue de 74.77% calculado en el experimento realizado en 1.34 M H_3PO_4, 110 ºC y 300 minutos de reacción, por otra parte, los porcentajes más bajos de conversión correspondieron a todos los tiempos del experimento en 0.58 M H_3PO_4 y 90ºC.

A temperatura constante, un incremento en la concentración del ácido propició un aumento en la producción de azúcares reductores (Figura 3.2), este efecto resultó mayor a 90 ºC la temperatura más baja de hidrólisis. A 110 ºC, la concentración del ácido tuvo un efecto menor sobre la producción de azúcares (Figura 3.2b), sin embargo, a ambas temperaturas los experimentos realizados con 0.58 y 0.77 M, así como con 0.96 y 1.34 M H_3PO_4 mostraron comportamientos muy similares entre sí. Esto se observa en la Figura 3.2, donde el efecto del ácido sobre la producción de azúcares disminuyó al aumentar la temperatura de hidrólisis.

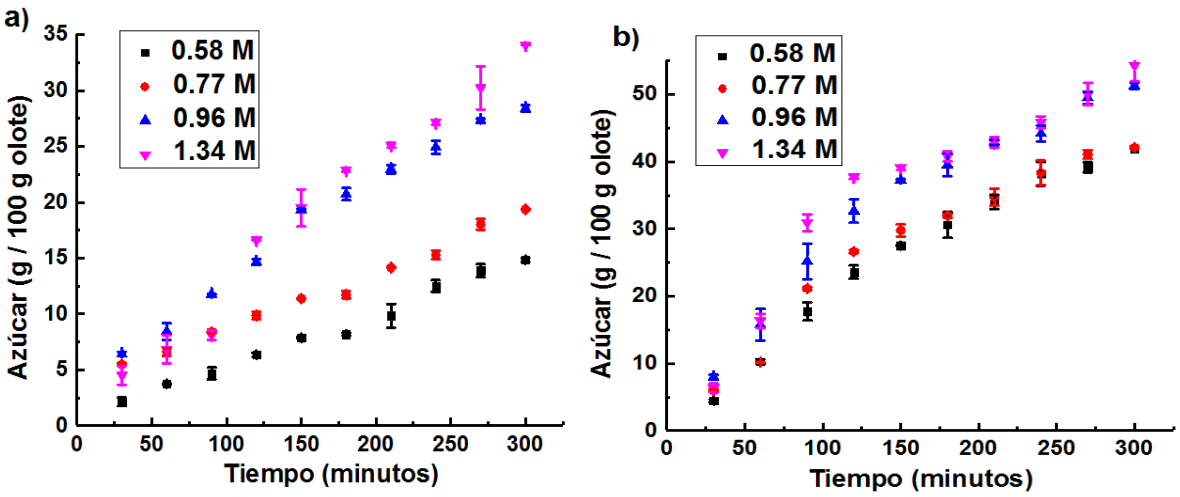


Figura 3.2. Efecto de la concentración del ácido sobre la producción de azúcares reductores a a) 90 ºC y a b) 110 ºC utilizando olote

Las hidrólisis realizadas a la misma concentración de ácido pero diferentes temperaturas, mostraron un efecto muy importante de ésta en la producción de azúcares reductores, la cual incrementó al aumentar la temperatura de operación. De acuerdo con este comportamiento se puede inferir que la temperatura tiene un efecto mayor sobre la producción de azúcares en comparación con la concentración del ácido. La Figura 3.3 muestra la producción de azúcares a las concentraciones de 0.96 y 1.34 M H_3PO_4 a diferentes temperaturas.

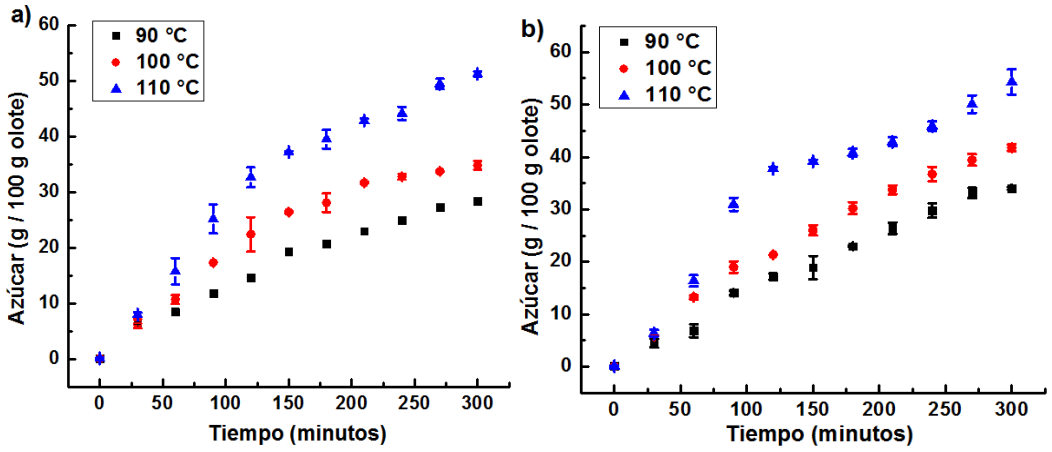


Figura 3.3. Efecto de la temperatura sobre la producción de azúcares reductores a con una solución a) 0.96 y a b) 1.34 M H_3PO_4 utilizando olote

Con la finalidad de evaluar estadísticamente el efecto de las variables temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción, así como las combinaciones de dichas variables, se llevó a cabo un análisis ANOVA utilizando una significancia de 0.05 y de 0.01. La hipótesis nula sugerida para el análisis fue que las variables del proceso de hidrólisis no afectan el rendimiento de la producción de azúcares. La Tabla 3.2 resume los parámetros estadísticos calculados con el ANOVA.

Tabla 3.2. Efecto de las variables sobre la producción de azúcares a partir de la hidrólisis del olote

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_{calc}	$F_{0.95}$	$F_{0.99}$	Conclusión
A	1044,34881	2	522,174	153,818	4,459	8,649	Rechazado
B	529,45743	2	264,729	77,982	4,459	8,649	Rechazado
C	4813,78961	2	2406,895	709,004	4,459	8,649	Rechazado
AB	12,6785037	4	3,170	0,934	3,838	7,006	Aceptado
AC	398,518526	4	99,630	29,348	3,838	7,006	Rechazado
BC	164,97417	4	41,244	12,149	3,838	7,006	Rechazado
Error	27,1580296	8	3,394				
Total	6990,92507	26					

A: Temperatura, B: %v H_3PO_4, C: Tiempo de reacción

Las variables temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción, así como las combinaciones temperatura – tiempo de reacción y concentración de ácido – tiempo de reacción mostraron un efecto significativo sobre el proceso. Desde el punto de vista estadístico la interacción entre la temperatura y la concentración de ácido no tiene un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores. De acuerdo con los valores F mostrados en la Tabla 3.2, las variables que más afectaron al proceso fueron: Tiempo de reacción > temperatura > concentración de ácido > temperatura – tiempo de reacción > concentración de ácido – tiempo de reacción.

El pH y el FSC se determinaron en cada uno de los hidrolizados. El experimento con los valores más altos del FSC fue el que se hizo con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC, mientras que los coeficientes más bajos fueron obtenidos en la hidrólisis con 0.58 M

H_3PO_4 y 90 ºC, comportamiento que va acorde con la mayor y menor producción de azúcares reductores. Los valores del FSC se ajustaron a un modelo logarítmico en función del tiempo de contacto para cada uno de los experimentos, los coeficientes de correlación R^2 en cada uno de los casos fue mayor a 0.99 (Figura 3.4).

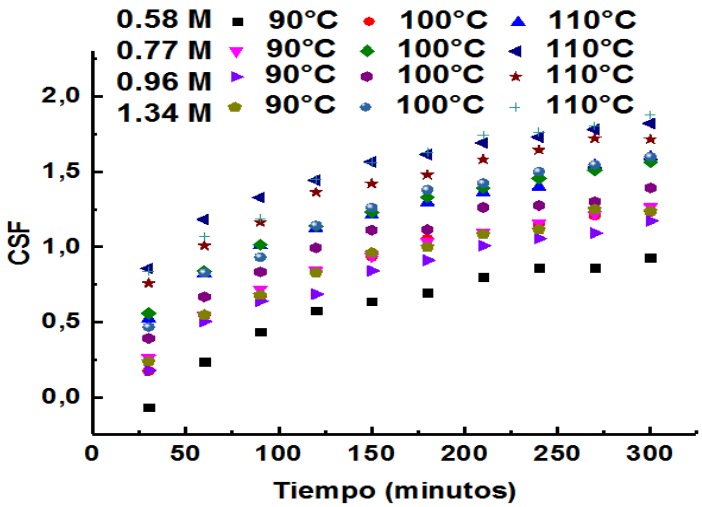


Figura 3.4. FSC calculados para cada una de las hidrólisis del olote

La producción de azúcares reductores se ajustó a un modelo cuadrático en función del FSC (Figura 3.5). Los valores más grandes del FSC están asociados con la mayor cantidad de azúcar producida, este comportamiento se atribuye a que la fase de degradación térmica de sacáridos a furfural y 5HMF no se observó bajo las condiciones experimentales propuestas en el presente trabajo. Pappas *et al.* (2014), estudiaron la relación existente entre el FSC y la producción de azúcares en la hidrólisis con ácido sulfúrico diluido de la especie *Phalaris aquatica*, encontrando un ajuste cuadrático negativo. La diferencia entre el presente trabajo y lo reportado por Pappas *et al.,* puede ser atribuido a las condiciones de hidrólisis, a la naturaleza y concentración del ácido y al tipo de biomasa estudiada.

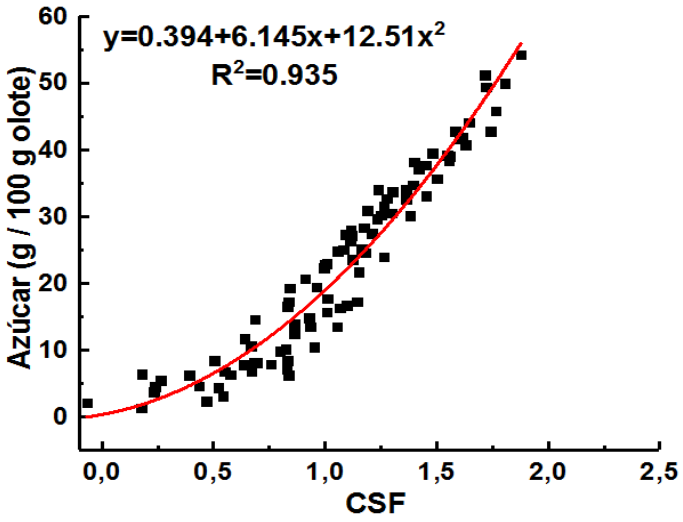


Figura 3.5. Producción de azúcares reductores a partir del olote en función del FSC

3.2.2. Parámetros cinéticos y termodinámicos de la hidrólisis ácida del olote

Debido a que el tamaño de partícula empleada para la hidrólisis fue menor a 250 µm, el análisis cinético se llevó a cabo sin considerar la influencia de la transferencia de masa en el proceso (Girisuta *et al.,* 2007; Saeman, 1945).

El modelo cinético de Saeman (Ec. 1.4) ha sido utilizado para estudiar la producción de azúcares a partir de biomasa lignocelulósica. Dicho modelo involucra el uso de dos constantes cinéticas, la primera asociada a la formación de hexosas y pentosas a partir de la celulosa y la hemicelulosa, mientras que la segunda hace referencia a la descomposición térmica de los azúcares a aldehídos y a ácidos orgánicos de bajo peso molecular. La Figura 3.6 muestra el mecanismo de hidrólisis de la celulosa con ácido fosfórico.

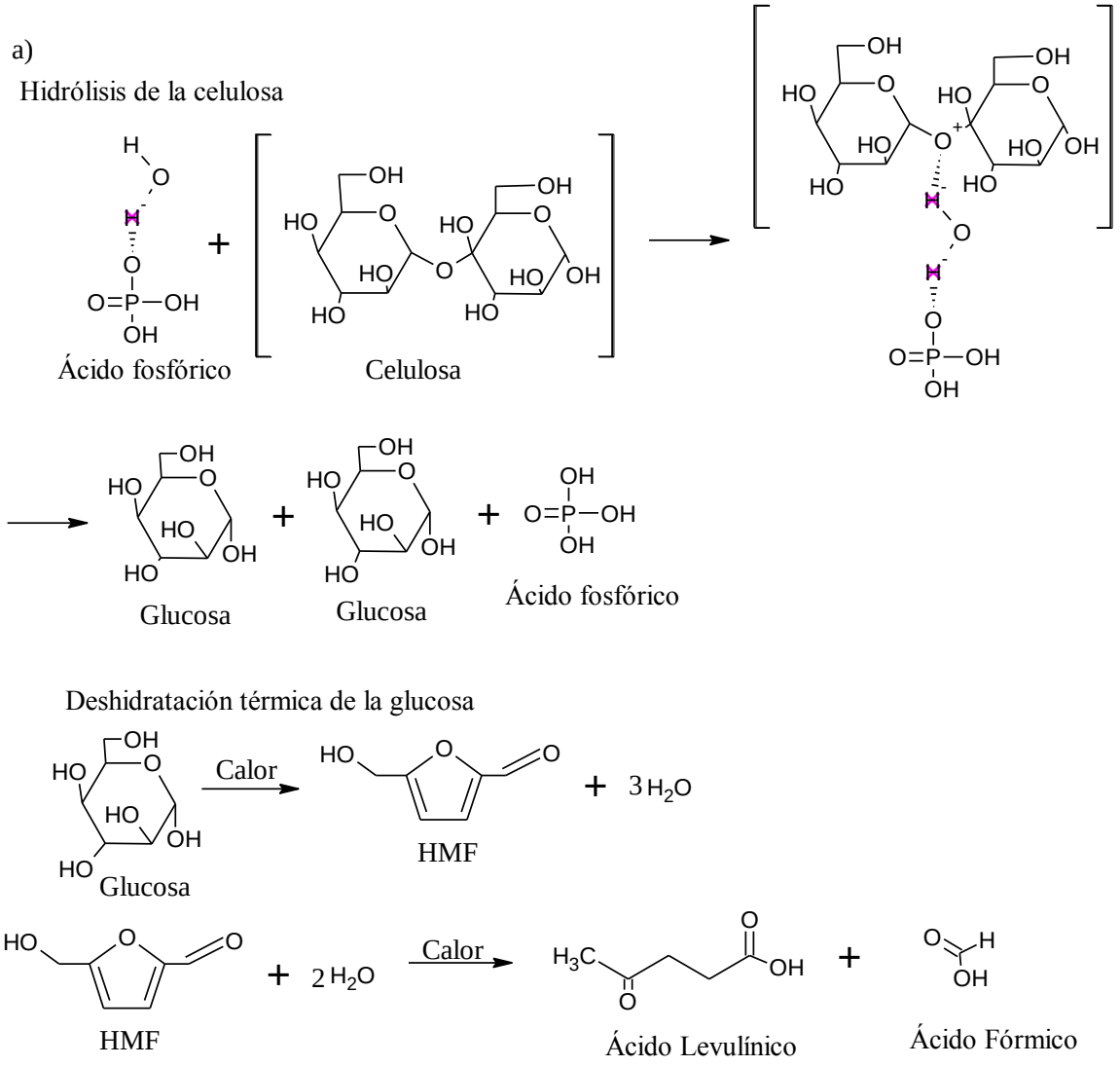


Figura 3.6. Transformación de a) la celulosa a glucosa mediante hidrólisis ácida y b) deshidratación térmica de la glucosa a aldehídos y ácidos orgánicos

Los datos de la producción de azúcares obtenidos en cada uno de los experimentos se ajustaron a los modelos cinéticos de Saeman y de primer orden, utilizando una regresión no lineal en el software Origin 8.6. De acuerdo con Saeman (1945) y con Ranganathan *et al.* (1985), las constantes cinéticas calculadas a partir del modelo de Saeman pueden ser usadas para calcular la relación entre ambas (*kr*), la cual muestra el efecto de la temperatura y de la concentración del ácido, posteriormente dicha relación puede utilizarse para determinar el tiempo óptimo de reacción para la producción de azúcares (Ec. 3.2).

$$t_{opt} = \frac{1}{k_2(k_r - 1)} ln(k_r) \qquad \text{Ec. 3.2}$$

Los parámetros cinéticos y estadísticos, así como los tiempos óptimos de reacción de cada una de las hidrólisis del olote obtenidos con el modelo de Saeman se resumen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos y estadísticos determinados a partir del modelo de Saeman para la hidrólisis del olote

Condiciones de hidrólisis	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	R^2	k_r	t_{opt} (min)
0.58 M y 90°C	$8.60X10^{-4}$	$1.34X10^{-4}$	0.992	6.417	1033.31
0.58 M y 100°C	$2.20X10^{-3}$	$1.56X10^{-4}$	0.994	14.102	1294.69
0.58 M y 110°C	$3.69X10^{-3}$	$2.43X10^{-4}$	0.999	15.185	789.18
0.77 M y 90°C	$1.37X10^{-3}$	$9.14X10^{-4}$	0.978	1.498	887.13
0.77 M y 100°C	$2.33X10^{-3}$	$4.33X10^{-4}$	0.993	5.381	887.13
0.77 M y 110°C	$4.26X10^{-3}$	$5.37X10^{-4}$	0.976	7.933	556.28
0.96 M y 90°C	$2.3X10^{-3}$	$6.51X10^{-4}$	0.991	3.533	765.41
0.96 M y 100°C	$3.66X10^{-3}$	$1.16X10^{-3}$	0.998	3.155	459.62
0.96 M y 110°C	$5.67X10^{-3}$	$2.53X10^{-3}$	0.999	2.2411	574.04
1.34 M y 90°C	$2.47X10^{-3}$	$3.83X10^{-5}$	0.999	64.829	1715.43
1.34 M y 100°C	$3.52X10^{-3}$	$1.20X10^{-4}$	0.998	29.333	993.74
1.34 M y 110°C	$6.08X10^{-3}$	$2.79X10^{-4}$	0.970	21.792	531.21

Los valores de la constante cinética k_1 incrementaron en función de la temperatura y de la concentración del ácido, mostrando el valor más bajo de $8.60X10^{-4}$ min^{-1} para el experimento menos severo; 0.58 M H_3PO_4 y 90 ºC, y la velocidad mayor ($6.08X10^{-3}$ min^{-1}) en la hidrólisis más severa; 1.34 M y 110 ºC. El tiempo óptimo de reacción más

bajo fue de 460 minutos calculado en el experimento con 0.96 M y 100ºC. Dicho experimento, pese a no alcanzar el rendimiento más alto, mostró el tiempo de reacción más corto, esto se asocia con el valor de las constantes cinéticas k_1 y k_2, las cuales para dicho experimento resultaron similares entre sí. La Figura 3.7 muestra los datos experimentales de producción de azúcares ajustados al modelo de Saeman.

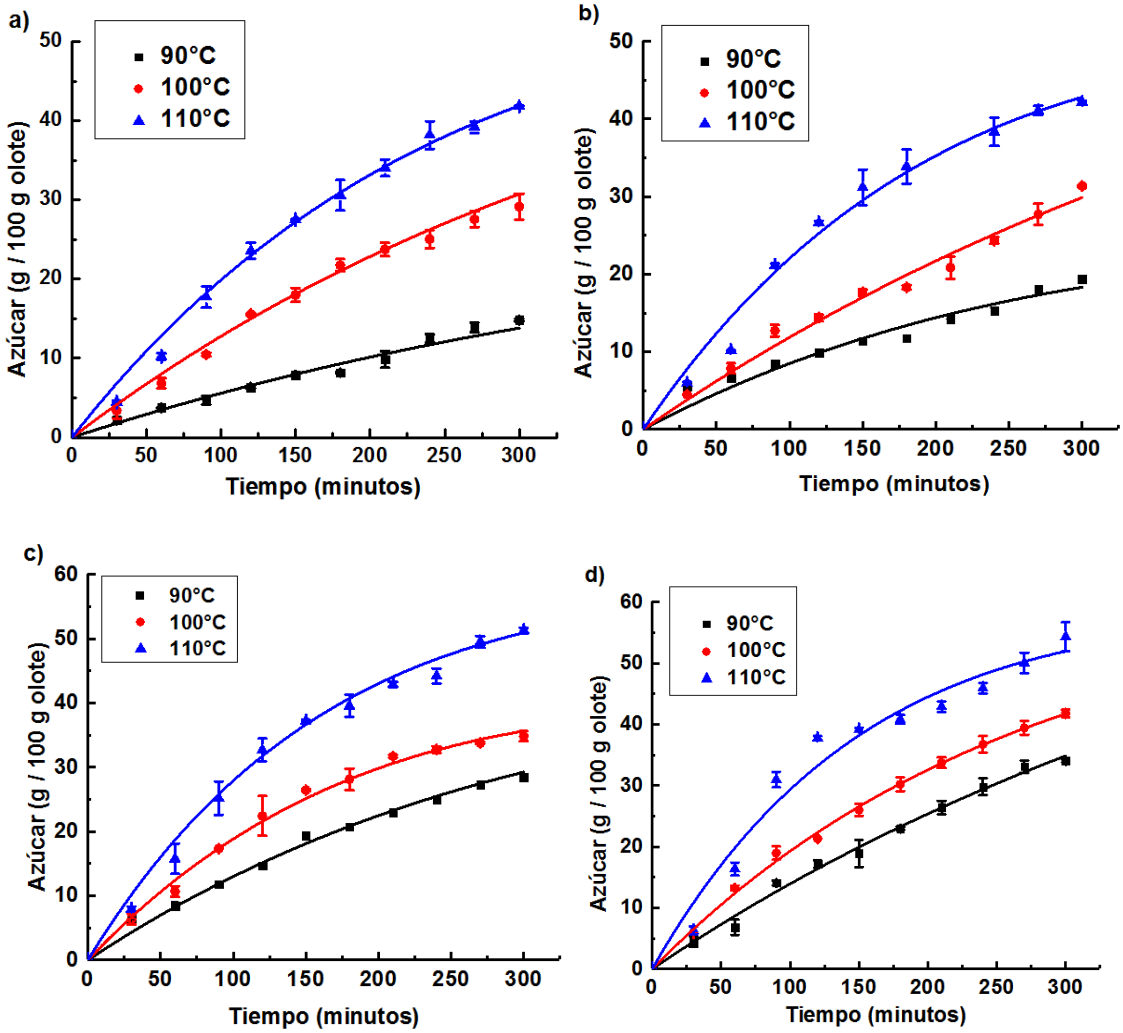


Figura 3.7. Datos experimentales de la producción de azúcares a partir de olote mediante hidrólisis con a) 0.58 M, b) 0.77 M, c) 0.96 M y d) 1.34 M H_3PO_4 ajustados al modelo cinético de Saeman

Debido a que ningún experimento mostró la fase de degradación térmica de los azúcares, los datos se ajustaron también al modelo cinético de primer orden, los cuales se muestran en la Figura 3.8.

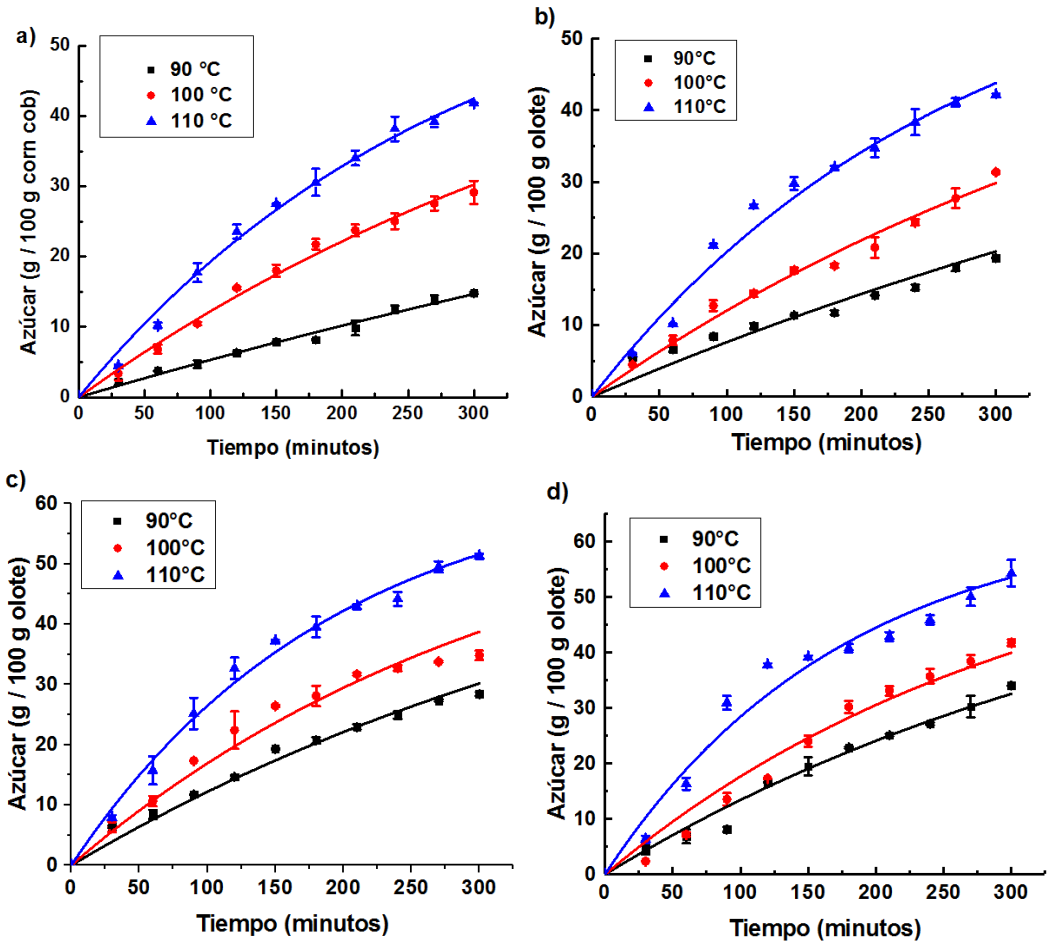


Figura 3.8. Datos experimentales de la producción de azúcares a partir de olote mediante hidrólisis con a) 0.58 M, b) 0.77 M, c) 0.96 M y d) 1.34 M H_3PO_4 ajustados al modelo cinético de primer orden

Como se observa en la Tabla 3.4, el valor de las constantes de velocidad aumentó en función de la concentración del ácido para cada una de las temperaturas, a 90ºC la constante cinética aumentó de $8.6X10^{-4}$ con 0.58 M a $2.47X10^{-3}$ con 1.34 M. La relación entre la concentración del ácido y la constante cinética de producción de azúcares fue estudiada por Zhang *et al*. (2011) y por Sarkar *et al.* (2013), quienes

observaron que a una temperatura constante, un incremento en la concentración del ácido aumenta el valor de la constante cinética. Guerra-Rodríguez *et al.* (2012), estudiaron la hidrólisis de la paja de trigo con ácido sulfúrico diluido y observaron un incremento potencial de la constante de velocidad en función de la concentración del ácido. Este mismo comportamiento se observó en el presente trabajo utilizando las constantes cinéticas calculadas a partir del modelo de Saeman y de primer orden (Figura 3.9).

Tabla 3.4 Parámetros cinéticos y estadísticos de la producción de azúcares a partir del olote determinados con el modelo de primer orden

Condiciones de hidrólisis	k (min^{-1})	R^2	Condiciones de hidrólisis	k (min^{-1})	R^2
0.58 M y 90°C	$8.60X10^{-4}$	0.973	0.96 M y 90°C	$2.06X10^{-3}$	0.982
0.58 M y 100°C	$2.07X10^{-3}$	0.993	0.96 M y 100°C	$2.99X10^{-3}$	0.970
0.58 M y 110°C	$3.50X10^{-3}$	0.994	0.96 M y 110°C	$5.19X10^{-3}$	0.993
0.77 M y 90°C	$1.20X10^{-3}$	0.971	1.34 M y 90°C	$2.47X10^{-3}$	0.982
0.77 M y 100°C	$2.22X10^{-3}$	0.995	1.34 M y 100°C	$3.20X10^{-3}$	0.974
0.77 M y 110°C	$3.85X10^{-3}$	0.993	1.34 M y 110°C	$5.71X10^{-3}$	0.971

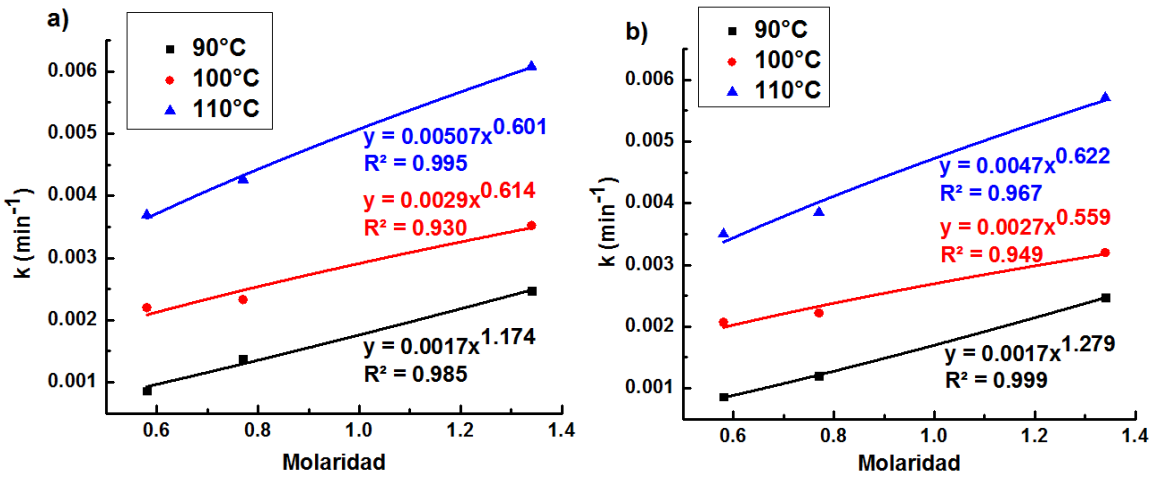


Figura 3.9. Efecto de la concentración del ácido sobre las constantes cinéticas de producción de azúcares calculadas a partir del a) Modelo de Saeman y del b) Modelo de primer orden

Como se observa en la Figura 3.9, los ajustes al modelo potencial de las constantes de velocidad calculadas con ambos modelos resultaron similares entre sí. Este comportamiento sugiere que el cálculo de dichas constantes puede realizarse de manera adecuada utilizando cualquiera de los dos modelos, siempre y cuando no se observe la fase de degradación térmica de los azúcares.

Las constantes cinéticas obtenidas con ambos modelos se utilizaron para el cálculo de los parámetros termodinámicos. La Figura 3.10 muestra los ajustes de las constantes cinéticas calculadas con el modelo de Saeman a las ecuaciones lineales de Arrhenius y de Eyring.

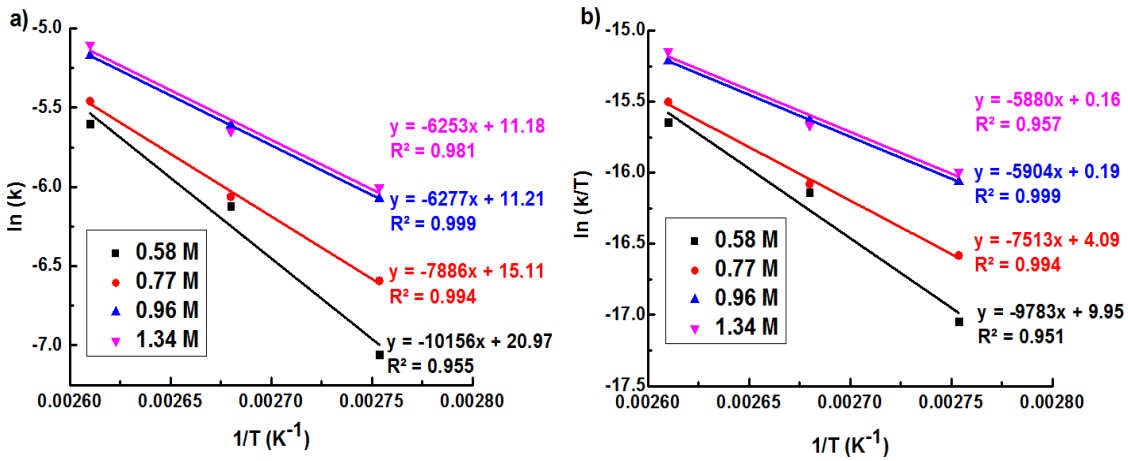


Figura 3.10. Constantes cinéticas k_1 del modelo de Saeman ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y b) Eyring

Los experimentos realizados con 0.96 y con 1.34 M H_3PO_4 mostraron un comportamiento similar tanto en el ajuste de la ecuación de Arrhenius como en la de Eyring, en consecuencia los valores obtenidos de los parámetros termodinámicos resultaron similares para ambas concentraciones.

Como se observa en la Tabla 3.5, las *Ea* calculadas para los experimentos con 0.96 y 1.34 M H_3PO_4 resultaron similares entre sí, lo que sugiere que la *Ea* de la producción de azúcares mediante hidrólisis con ácido fosfórico diluido del olote tiene un valor cercano a los 52 KJ mol^{-1}. Con base a los valores positivos calculados de

ΔH y de *ΔG*, la hidrólisis ácida del olote resultó un proceso endotérmico y no espontáneo. De acuerdo con la teoría del complejo activado, los valores positivos de *ΔS* hacen referencia a una mayor cantidad de energía dentro del complejo, sin embargo, el *ΔS* calculado para cada una de las concentraciones dio valores negativos, lo cual sugiere que a nivel molecular la mayor cantidad de energía se encuentra en los reactivos antes de la formación del complejo ácido-celulosa (Figura 3.6). La teoría de las colisiones moleculares sugiere un incremento en el número de colisiones a causa de un aumento en la concentración de los reactantes, por ello, el factor de frecuencia (*A*) debería incrementar en función de la molaridad del ácido. Este comportamiento fue reportado primeramente por Ranganathan *et al. (*1985), quienes estudiando la hidrólisis ácida de la paja de trigo observaron un incremento potencial del factor *A* en función de la molaridad del ácido. Años más tarde, algunos autores reportaron el mismo comportamiento durante la hidrólisis con ácido diluido de diferentes materiales lignocelulósicos (Arslan *et al.,* 2012; Chen *et al.,* 2015).

Tabla 3.5 Parámetros termodinámicos de la producción de azúcares mediante hidrólisis ácida del olote calculados con las constantes cinéticas del modelo de Saeman

H_3PO_4 (M)	Ea (KJ mol^{-1})	A (min^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	K	ΔG (KJ mol^{-1})
0.58	84.44	$1.28X10^9$	78.25	-123.39	363.15	123.06
					373.15	124.29
					383.15	125.53
0.77	65.57	$3.63X10^6$	62.47	-163.54	363.15	121.86
					373.15	123.49
					383.15	125.13
0.96	52.19	$7.4X10^4$	49.09	-195.93	363.15	120.24
					373.15	122.20
					383.15	124.16
1.34	51.99	$7.2X10^4$	48.89	-196.18	363.15	120.13
					373.15	122.09
					383.15	124.06

De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 3.5, el factor A disminuyó al aumentar la concentración del ácido, este comportamiento resultó diferente a lo esperado y puede ser atribuido al tipo y concentración del ácido, ya que en el presente trabajo se utilizó H_3PO_4 en un rango de concentración de 0.58 a 1.34 M, mientras que en investigaciones previas se evaluó el H_2SO_4 a concentraciones menores a 0.5 M. A fin de entender el comportamiento del factor A en concentraciones mayores a 0.5 M, es necesario evaluar diferentes materiales lignocelulósicos utilizando H_2SO_4 y H_3PO_4.

Las constantes de velocidad calculadas con el modelo de primer orden también se utilizaron para determinar los parámetros termodinámicos de la producción de azúcares por hidrólisis ácida del olote. Los ajustes a las ecuaciones lineales de Arrhenius y Eyring resultaron similares a los obtenidos con las constantes k_1 del modelo de Saeman (Figura 3.11), además, el comportamiento de la *Ea, A, ΔH, ΔS* y *ΔG* resultó parecido al observado con las contantes del modelo de Saeman. La Figura 3.12 muestra una disminución de la *Ea, ΔH* y *ΔS* en función de la concentración del ácido.

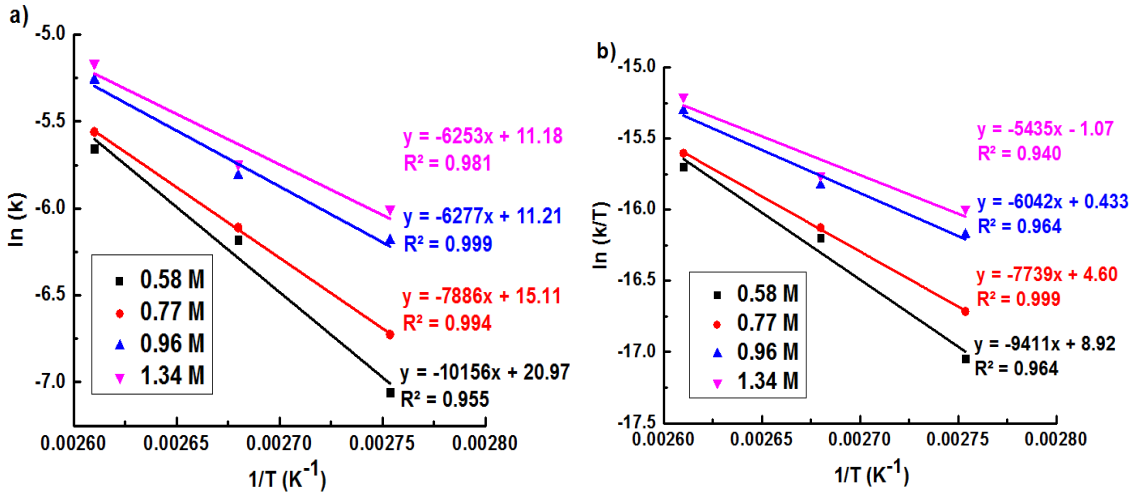


Figura 3.11. Constantes cinéticas obtenidas con el modelo de primer orden ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y b) Eyring

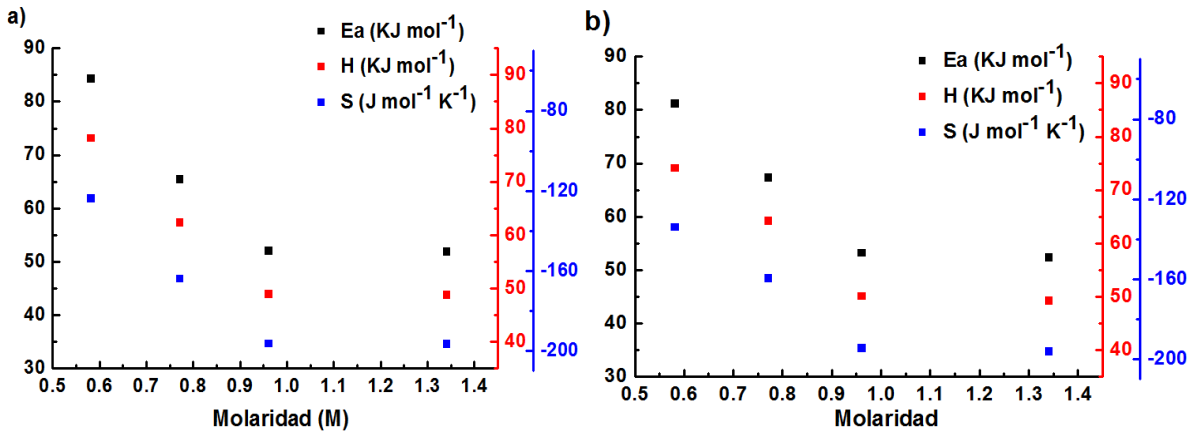


Figura 3.12. Comportamiento de los parámetros termodinámicos de la producción de azúcares calculados con el modelo cinético de a) Saeman y de b) Primer orden en función de la concentración del ácido

Los valores promedio de cada uno de los parámetros termodinámicos calculados con ambos modelos cinéticos resultaron muy cercanos entre sí. El factor A mostró la mayor discrepancia arrojando un valor promedio de $9.05X10^5$ min^{-1}, mientras que la *Ea*, *ΔH*, *ΔS* y *ΔG* mostraron prácticamente el mismo valor. De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 3.6, el cálculo de los parámetros termodinámicos de la producción de azúcares a partir de la hidrólisis ácida del olote puede realizarse utilizando las constantes de velocidad obtenidas con cualquiera de los dos modelos cinéticos estudiados: Saeman y Primer orden.

Tabla 3.6 Parámetros termodinámicos de la producción de azúcares a partir de olote calculados con los modelos cinéticos de Saeman y de Primer orden

Modelo cinético	Ea (KJ mol^{-1})	A (min^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
Saeman	63.55	$3.21X10^8$	59.68	-169.76	122.59
Primer orden	63.64	$1.15X10^8$	60.54	-168.07	122.13

Las constantes de velocidad k_2 obtenidas con el modelo de Saeman para los experimentos con 0.96 y 1.34 M H_3PO_4, se utilizaron para determinar los parámetros termodinámicos de la descomposición térmica de los azúcares. La Figura 3.13

muestra los ajustes de las constantes cinéticas a las ecuaciones lineales de Arrhenius y de Eyring.

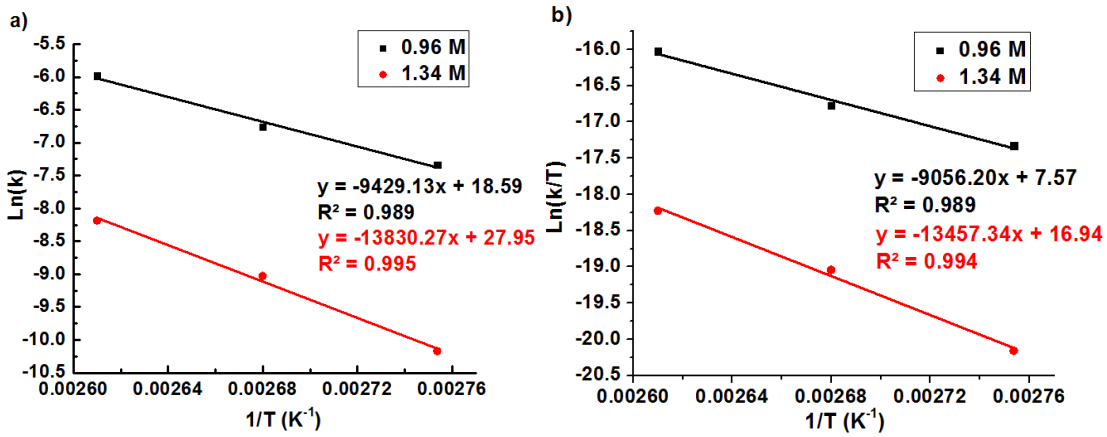


Figura 3.13. Constantes cinéticas k_2 del modelo de Saeman ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y b) Eyring

Los parámetros termodinámicos de la deshidratación de azúcares calculados para los experimentos con 0.96 M y 1.34 M H_3PO_4 resultaron diferentes entre sí (Tabla 3.7), sin embargo, para ambas concentraciones los valores de *Ea, ΔH* y *ΔG* resultaron mayores a los calculados para la producción de azúcares (k_1). Por otra parte, el *ΔS* disminuyó en la fase de deshidratación térmica, pese a esto a nivel molecular la mayor cantidad de energía sigue correspondiendo a los reactivos antes de la formación del complejo ácido-agua-azúcar reductor. Desde el punto de vista termodinámico el producto más estable generado durante la hidrólisis ácida del olote fueron los azúcares reductores ya que los valores de ΔS calculados para k_1 fueron menores en comparación con los determinados con k_2 (Tizazu & Moholkar, 2018).

Tabla 3.7 Parámetros termodinámicos de la deshidratación térmica de los azúcares calculados para la hidrólisis de olote con 0.96 y 1.34 M H_3PO_4

Concentración de ácido (M)	Ea (KJ mol^{-1})	A (min^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
0.96	78.39	$1.18X10^{8}$	75.30	-134.58	125.52
1.34	114.99	$1.38X10^{12}$	111.89	-56.72	133.05

La diferencia en los valores de los parámetros termodinámicos observados entre la producción y la descomposición de azúcares fue reportada previamente. Algunos trabajos como los de Chen *et al.* (1996), Eken *et al.* (1998), Lu *et al.* (2008) y Chen *et al.* (2015), observaron que la *Ea* fue mayor para la deshidratación en comparación con la producción de azúcares; comportamiento observado en éste trabajo. Sin embargo, Arslan *et al.* (2012), quienes calcularon los parámetros termodinámicos de la producción y descomposición de los azúcares reductores totales en la hidrólisis con ácido sulfúrico de la cáscara de avellana observaron que la *Ea* mayor corresponde a la fase de producción de azúcares, comportamiento que había sido previamente reportado por Ranganathan *et al.* (1985), durante la hidrólisis con ácido sulfúrico de la paja de trigo.

El cálculo de los parámetros ΔH, ΔS y ΔG utilizando la ecuación de Eyring ha sido escasamente estudiado. Swati *et al.* (2013), calculó dichos parámetros para la producción de xilosa a partir de la especie *Parthenium hysterophorus L*., a diferentes condiciones de hidrólisis, observando que ante un incremento en la molaridad del ácido, el valor de dichos parámetros aumenta. Años más tarde, Tizazu & Moholkar (2018), determinaron los parámetros termodinámicos para la hidrólisis con ácido sulfúrico diluido del bagazo de caña de azúcar. Tanto la *Ea* como el ΔH y el ΔG aumentaron para la fase de degradación térmica de los azúcares, mientras que el valor de ΔS disminuyó en esta etapa. Este comportamiento resultó parecido al observado en el presente trabajo, en donde los parámetros termodinámicos incrementaron su valor para la fase de degradación térmica de los sacáridos con excepción del ΔS. Sin embargo, el comparativo debe tomarse con precaución, ya que el tipo y la concentración del ácido, así como la biomasa lignocelulósica, la relación sólido-líquido y el tiempo de hidrólisis fueron diferentes.

La *Ea* y el factor *A* determinados en el presente trabajo a partir de los valores de k_1 resultaron similares a los reportados por Arslan *et al.* (2012), quienes estudiaron dichos parámetros en la hidrólisis de la cáscara de avellana con ácido sulfúrico 0.5 M. Los valores similares pueden asociarse con el tipo de azúcar estudiado en ambos

trabajos; Azúcares reductores. Por otra parte, Tizazu & Moholkar (2018), calcularon los parámetros termodinámicos de la hidrólisis con ácido sulfúrico del bagazo de caña de azúcar, la *Ea*, el *A* y el *ΔH* tanto para la producción como para la deshidratación de los azúcares determinados por ellos resultaron similares a los reportados en el presente trabajo, sin embargo, el tipo de azúcar estudiado fue diferente, ya que ellos únicamente reportaron la producción y descomposición de la xilosa.

3.2.3 Caracterización de los residuos del olote hidrolizado

En todos los espectros FTIR mostrados en el presente trabajo, las letras H, C y L corresponden a hemicelulosa, celulosa y lignina respectivamente, mientras que el símbolo β hace referencia al enlace β glucosídico propio de la celulosa y de la hemicelulosa. Todos los espectros FTIR se normalizaron en un rango de 2000 a 600 cm^{-1}, las bandas de vibración se determinaron con base a los trabajos de Li *et al.* (2016), Xu *et al.* (2013), Zhu *et al*. (2016) y Gómora (2016). El enlace β1-4 glucosídico se observó en cada uno de los espectros de la Figura 3.14 correspondiente al experimento con 0.58 M H_3PO_4 y 100 ºC a un número de onda de 897 cm^{-1} (Sahoo *et al.,* 2018), las vibraciones observadas a 983, 1036, 1102 y 1156 cm^{-1} hacen referencia a los enlaces C-O y C-C de la celulosa, por otra parte, la hemicelulosa se observó a 1244 y 1726 cm^{-1}, esta última vibración corresponde a la absorción del enlace C=O propio de los grupos acetil. Finalmente, la lignina presentó sus bandas características del anillo aromático en 1511 y 1596 cm^{-1}, mientras que los enlaces C-H correspondientes a la parte alifática se observaron en 1425 y 1460 cm^{-1}. De acuerdo con Li *et al.,* 2016, el valor de 832 cm^{-1} se asocia al hidroxi-fenil de la lignina, sin embargo, también ha sido asociado al enlace P-O-C derivado del contacto entre el H_3PO_4 y el olote, dicha vibración aumentó a medida que el tiempo de contacto con el ácido se incrementó. Al mismo tiempo, la intensidad y la amplitud de las vibraciones características de la celulosa (980 – 1150 cm^{-1}) disminuyeron con el paso del tiempo, haciendo más delgada y definida dicha región.

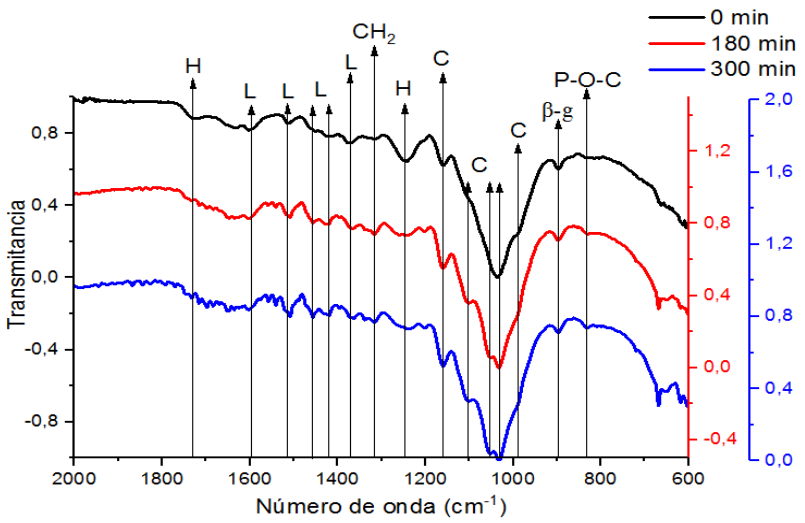


Figura 3.14. Espectros FTIR de las muestras de olote tomadas antes y después de 180 y 300 minutos de hidrólisis con 0.58 M H_3PO_4 y 100 ºC

Los espectros FTIR de las muestras tomadas después de 180 y 300 minutos de tiempo de contacto con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC se muestran en la Figura 3.15. Tanto la intensidad como la amplitud de las bandas características de hemicelulosa y celulosa disminuyeron al incrementar el tiempo de contacto con el ácido, además las vibraciones situadas en la región de 950 a 1200 cm^{-1} se hicieron más definidas. De acuerdo con Hsu *et al.*, la vibración ubicada a 1064 cm^{-1} corresponde a los alcoholes primarios y secundarios (enlace C-O-H) que están presentes en la estructura de la lignina y son traslapados debido a la predominancia de los enlaces C-C y C-O-C de la celulosa y hemicelulosa. La aparición de la banda a 1064 cm^{-1} va de la mano con el incremento en la intensidad de las vibraciones características de la lignina observadas en 1510, 1425 y en 832 cm^{-1} (Tabla 3.8). Este comportamiento sugiere que la fracción másica de la lignina se incrementó como resultado de la monomerización de la holocelulosa, es decir, el contacto entre el olote y el ácido fosfórico diluido resultó eficiente para recuperar azúcares a partir de la celulosa y hemicelulosa, mientras que la estructura de la lignina permaneció casi inalterada.

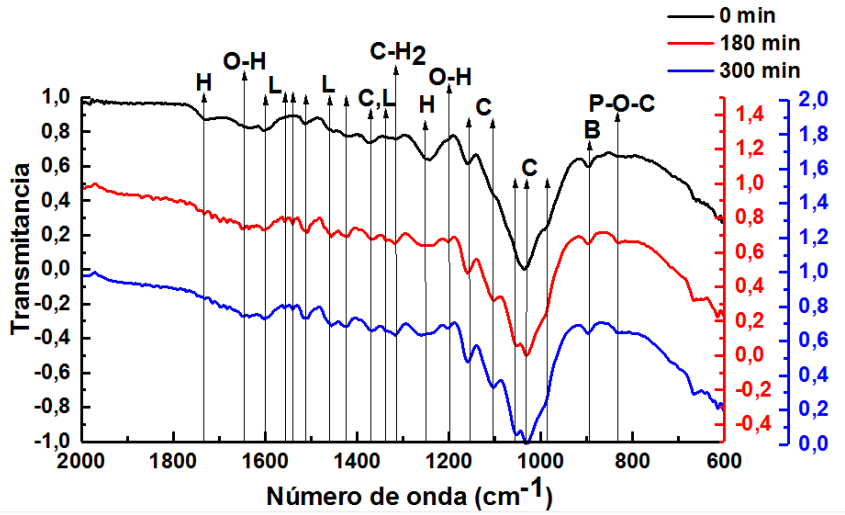


Figura 3.15. Espectros FTIR de las muestras de olote tomadas antes y después de 180 y 300 minutos de hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC

Tabla 3.8 Principales vibraciones del olote con y sin hidrolizar observadas en los espectros FTIR

Número de onda (cm^{-1})	Compuesto / Enlace químico	Número de onda (cm^{-1})	Compuesto / Enlace químico
832	P-O-C y lignina (C-H)	1315	Celulosa y hemicelulosa (C-H_2)
896	B-glucosídico	1336	Lignina (O-H), celulosa y hemicelulosa (C-H)
986	Celulosa (C-O)	1370	Lignina (O-H), celulosa y hemicelulosa (C-H)
1031	Celulosa (C-C y C-C-O)	1422	Lignina (CH_3-O)
1056	Celulosa y lignina (C-O-H)	1460	Lignina (CH_3-O)
1104	Celulosa (C-O-C and C-O)	1511	Lignina (Anillo aromático)
1156	Celulosa (C-O-C)	1599	Lignina (Anillo aromático)
1199	Hemicelulosa y celulosa (O-H)	1645	Agua (O-H)
1244	Hemicelulosa (C-O)	1735	Hemicelulosa (C=O)

El análisis de cristalinidad en el olote antes y después de 300 minutos de hidrólisis ácida se llevó a cabo mediante la técnica de DRX. Los picos más importantes se observaron a los ángulos 2θ de 16º y 22º, y corresponden respectivamente a las regiones amorfas y cristalinas de la celulosa (Figura 3.16).

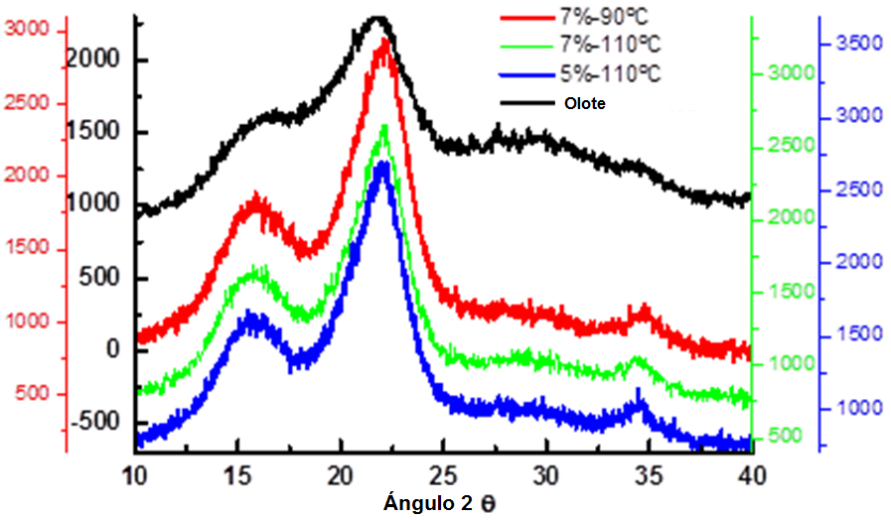


Figura 3.16. Patrones de difracción de rayos X del olote antes y después de la hidrólisis ácida a diferentes condiciones de operación

El olote sin hidrolizar mostró dos picos de baja intensidad asociados a la hemicelulosa a los ángulos 2θ de 26º y 28º, los cuales desaparecieron después de la hidrólisis ácida. De acuerdo con Li *et al.* (2016), el ángulo de 28º puede ser atribuido también a la presencia de SiO_2 presente en la fracción inorgánica del olote. Con la finalidad de cuantificar el cambio en la cristalinidad del biomaterial, el índice de cristalinidad (ICr) se determinó de acuerdo con la Ecuación 3.3 (Gaur *et al.,* 2016).

$$ICr = \left[\frac{I_{22} - I_{16}}{I_{22}}\right] * 100 \qquad \text{Ec. 3.3}$$

En donde I_{22} y I_{16} son respectivamente las intensidades de los picos a 22º y 16º. El ICr del olote sin hidrolizar fue de 28.97%, valor que incrementó después del tratamiento ácido, lo cual puede ser atribuido a la descomposición de la hemicelulosa y a la transformación de la celulosa amorfa en glucosas. El valor más grande del ICr fue de 38.59% calculado para el experimento con 0.96 M H_3PO_4 y 110 °C, a estas condiciones el rendimiento de producción de azúcares fue de 51.26 g de azúcar / 100 g de olote. El rendimiento más alto de producción de azúcares se observó en el experimento realizado a 110 °C y 1.34 M H_3PO_4 (54.31 g de azúcar / 100 g olote), el

ICr calculado para dicho experimento fue de 37.46%. Como se observa en la Tabla 3.9 tanto los valores del ICr como los rendimientos de producción de azúcares determinados con 0.96 M y 1.34 M H_3PO_4 a 110ºC resultaron similares entre sí. El ICr aumentó después del tratamiento químico sugiriendo que la hidrólisis ácida fue eficiente para transformar la celulosa amorfa y la fracción hemicelulósica en azúcares reductores. Un comportamiento similar fue reportado anteriormente para la hidrólisis de distintos materiales lignocelulósicos (Gaur *et al.,* 2016; Lee *et al.,* 2015; Sahoo *et al.,* 2018).

Tabla 3.9 Producción de azúcares e ICr del olote hidrolizado con ácido fosfórico a diferentes condiciones de operación

Condiciones de hidrólisis	pH	FSC	Azúcar (g / 100 g)	Holocelulosa - azúcar (%)	ICR (%)
Olote sin hidrolizar	-	-	-	-	28.97
1.34 M H_3PO_4, 90ºC y 300 min	0.95	1.24	34.09	46.94	36.82
1.34 M H_3PO_4, 110ºC y 300 min	0.89	1.88	54.31	74.77	37.46
0.96 M H_3PO_4, 110ºC y 300 min	1.05	1.72	51.26	70.57	38.59

Las muestras tomadas antes y después de 300 minutos de hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 a las temperaturas de 90 y 110 ºC, así como del experimento con 0.96 M H_3PO_4 y 110 ºC se analizaron mediante MEB y Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (EDS). Las micrografías observadas en la Figura 3.17 mostraron cambios en las estructuras de las microfibrillas, así como un incremento en la porosidad del olote después del tratamiento. En las micrografías mostradas en las Figuras 3.17c y 3.17d se observó la aparición de partículas blanquecinas las cuales se asocian con la parte inorgánica del material, además en ambas micrografías se observó un incremento en el número de poros a lo largo de la estructura del olote, lo cual puede atribuirse a la descomposición de la fracción holocelulósica.

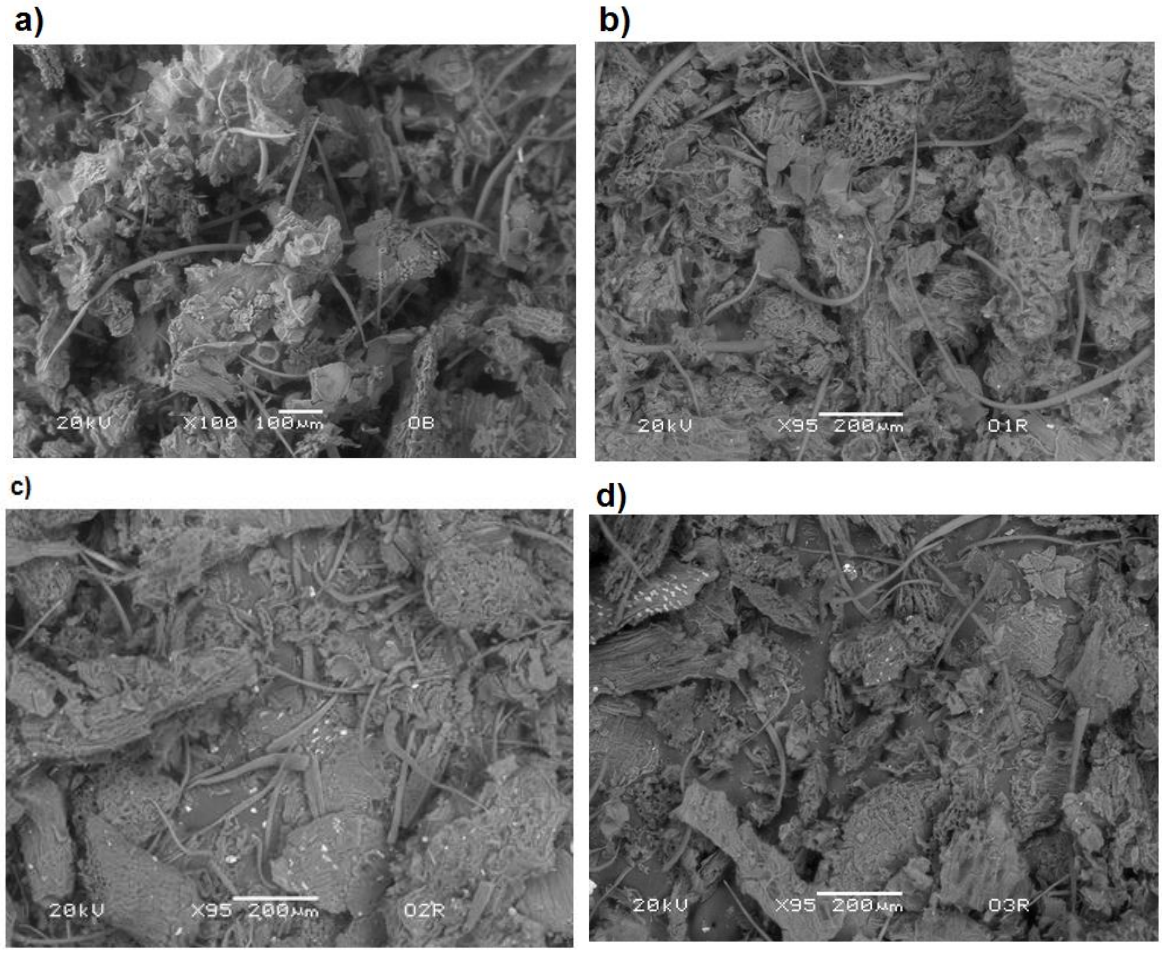


Figura 3.17. Micrografías del olote a) antes y después de la hidrólisis durante 300 minutos con H_3PO_4 b) 1.34 M y 90 ºC, c) 0.96 M y 110 ºC, y d) 1.34 M y 110 ºC a 95 aumentos

Los cambios morfológicos y estructurales mostrados en las micrografías de la Figura 3.17 fueron similares a los reportados previamente por Boontum *et al*. (2019), Li *et al.* (2016), Sahoo *et al.* (2018) y Sun *et al.* (2015), quienes observaron la ruptura y el reordenamiento de las microfibrillas de carbohidratos debido a una hidrólisis ácida o alcalina, además de un aumento tanto en el volumen del poro como en el área superficial del material, lo cual favorece a la subsecuente hidrólisis enzimática y a la fermentación.

La Figura 3.18 muestra las micrografías tomadas a 500 aumentos del olote antes y después de la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC, en esta última micrografía se

aprecia de manera clara la formación de poros a lo largo de las microfibrillas, así como las partículas blanquecinas asociadas con la parte inorgánica del olote, las cuales de acuerdo con Li *et al.* (2016) corresponden a partículas de silicio en forma de SiO_2.

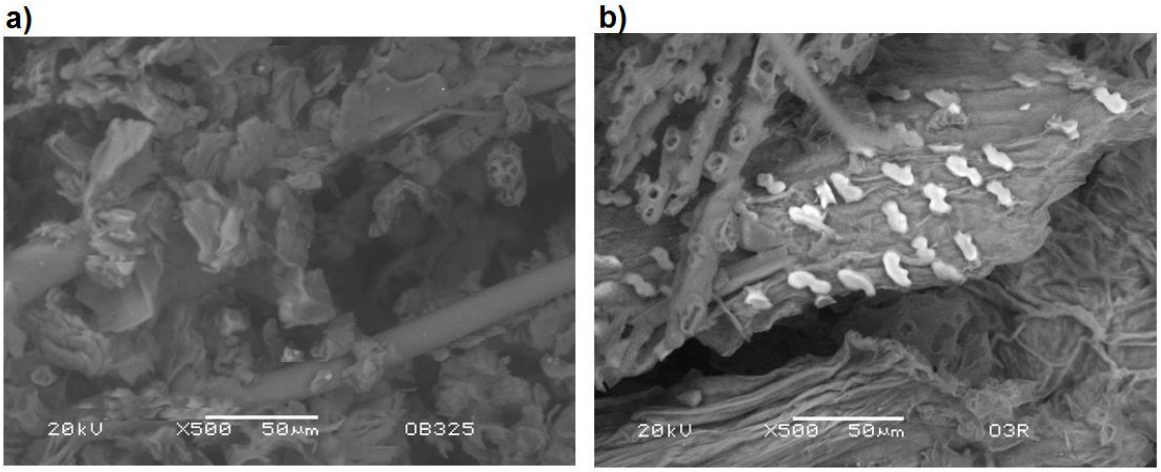


Figura 3.18. Micrografías del olote a) antes y después de la hidrólisis durante 300 minutos con H_3PO_4 b) 1.34 M y 110 ºC, a 500 aumentos

Las zonas observadas en las Figuras 3.17 y 3.18 fueron utilizadas para determinar la composición elemental por EDS. En la Tabla 3.10, se presenta el porcentaje atómico del carbono y oxígeno, el porcentaje de ambos elementos disminuyó después de la hidrólisis ácida a consecuencia de la transformación de la holocelulosa en azúcares reductores, mientras que el contenido de silicio y azufre aumentó en las muestras tratadas con mayor severidad. La presencia de potasio solo se observó en el olote sin hidrolizar lo que significa que pasa al hidrolizado, y el porcentaje de oxígeno más bajo fue determinado en la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC, condiciones a las cuales se obtuvo el mayor rendimiento de producción de azúcares reductores. El análisis elemental de la micrografía mostrada en la Figura 3.18 b) mostró el mayor porcentaje atómico de silicio y el menor porcentaje de carbono alcanzando valores respectivos de 8.47% y 49.92%, pese a la disminución en el contenido de carbono, el oxígeno alcanzó un porcentaje de 34.88%, lo cual indica que las partículas blanquecinas están compuestas principalmente por SiO_2. Finalmente el calcio se observó en todas las micrografías con excepción del olote sin hidrolizar.

Tabla 3.10 Análisis elemental del olote antes y de los residuos, después de la hidrólisis con ácido fosfórico a diferentes condiciones

Muestra	Olote sin hidrolizar	1.34 M y 90 ºC	0.96 M y 110 ºC	1.34 M y110 ºC	1.34 M y 110 ºC (partículas)
Elemento	% Atómico				
C	60.17	54.45	56.56	56.16	49.92
O	38.99	37.35	35.37	33.62	34.88
Si	0.21	0.12	0.41	0.30	8.47
S	-	0.031	0.022	0.039	0.029
K	0.55	-	-	-	-
Ca	-	0.10	0.074	0.092	0.036

3.2.4 Análisis factorial de la hidrólisis ácida del olote

Para el análisis factorial se utilizaron 3 variables con 3 niveles cada una. Las variables fueron la temperatura de hidrólisis (90, 100 y 110 ºC), la concentración del ácido fosfórico (3, 4 y 5 %v) y el tiempo de contacto (30, 60 y 90 minutos). El número total de experimentos fue de 27, valor obtenido a partir de las interacciones de cada uno de los niveles de cada una de las variables. Cada experimento se realizó por duplicado y la cantidad de azúcares reductores (Anexo B2), la concentración de furfural (Anexo B3) y el FSC fueron seleccionados como variables dependientes o respuestas. Los valores codificados de las variables independientes se determinaron con ayuda de la Ec. 3.4 (Cao *et al.,* 2018), siendo el valor más alto +1 y el valor menor -1.

$$x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta X} \qquad \text{(Ec. 3.4)}$$

En donde x_i es el valor codificado de la variable independiente, mientras que X_i, X_o y ΔX son respectivamente el valor real, el valor real en el punto central y el incremento de la variable independiente.

Con el fin de modelar el comportamiento de las respuestas, las variables independientes se ajustaron a un modelo matemático cuadrático. De acuerdo con Cao *et al.* (2018), y Timung *et a*l. (2015) el modelo matemático cuadrático predice

adecuadamente las respuestas a partir de las variables independientes y de las interacciones entre ellas. La forma general de dicho modelo se representa en la Ec. 3.5.

$$\boldsymbol{Y = B_o + \sum_{i=1}^{k} B_i x_i + \sum_{i=1}^{k} B_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=i\neq 1}^{k} B_{ij} x_i x_j + \in} \qquad \text{(Ec. 3.5)}$$

Donde *Y* es la variable dependiente o la respuesta, *Bo* un coeficiente constante, *Bi, Bii* y *Bij* son los coeficientes de los efectos lineales, cuadráticos y de las interacciones de las variables independientes respectivamente, y ϵ la desviación. Los valores codificados de cada una de las variables calculados a partir de la ecuación 3.4 se resumen en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Valores codificados y reales de las variables de la hidrólisis del olote

Nivel	Variable codificada	Temperatura (°C)	Concentración de ácido (%v)	Tiempo de contacto (min)
Bajo	-1	90	3	30
Medio	0	100	4	60
Alto	1	110	5	90

El experimento realizado con el nivel más alto de cada una de las variables; 110 ºC, 5 %v y 90 minutos, mostró la mayor producción tanto de azúcares reductores como de furfural con rendimientos de 25.17 y de 1.01 g / 100 g de olote respectivamente. Los experimentos realizados con el nivel más bajo de la concentración de ácido y de tiempo de contacto tuvieron los rendimientos menores; 2.16, 1.39 y 1.49 g de azúcar / 100 g de olote para las temperaturas de 90, 100 y 110 ºC respectivamente. El valor más pequeño del FSC (-0.067) se observó con el nivel más bajo de cada una de las variables, sin embargo, el FSC más grande (1.329) se determinó en el experimento con 4 %v H_3PO_4, 110 ºC y 90 minutos, a dichas condiciones se observaron los rendimientos de 21.14 g de azúcar y de 0.773 g de furfural por cada 100 g de olote. La relación más grande entre los azúcares reductores y el furfural fue de 35.65 calculado en el experimento con 4 %v H_3PO_4, 90 ºC y 30 minutos. La conversión de azucares a furfural (%) mostrada en la Tabla 3.12 está asociada con la cantidad de

holocelulosa que fue transformada en azúcares reductores durante la hidrólisis ácida, dicho porcentaje incrementó a medida que la producción de azúcares aumentó.

Tabla 3.12. Resultados experimentales de la hidrólisis de olote en H_3PO_4 diluido

No. Exp	No. Std	Temp. (°C)	Conc. (%v)	Tiempo (minutos)	Azúcar Exp (g/100g)	Conv. (%)	Furfural Exp (mg/100g)	FSC
1	4	-1	0	-1	5.50	8.41	154.28	0.263
2	8	-1	+1	0	8.44	12.91	288.18	0.504
3	14	0	0	0	7.87	12.04	341.24	0.838
4	3	-1	-1	+1	4.67	7.15	183.42	0.435
5	6	-1	0	+1	8.89	13.61	342.37	0.719
6	24	+1	0	+1	21.14	32.35	773.52	1.329
7	18	0	+1	+1	17.33	26.52	633.59	0.834
8	27	+1	+1	+1	25.17	38.52	1010.89	1.164
9	12	0	-1	+1	4.03	6.17	475.04	0.669
10	1	-1	-1	-1	2.16	3.31	99.76	-0.067
11	16	0	+1	-1	6.33	9.69	221.79	0.392
12	20	+1	-1	0	10.24	15.67	434.08	0.823
13	26	+1	+1	0	15.75	24.10	644.90	1.008
14	11	0	-1	0	3.14	4.81	351.031	0.542
15	13	0	0	-1	4.46	6.83	175.60	0.557
16	9	-1	+1	+1	11.77	18.01	462.49	0.639
17	5	-1	0	0	6.61	10.12	220.67	0.544
18	22	+1	0	-1	5.96	9.12	273.56	0.857
19	17	0	+1	0	10.67	16.33	433.34	0.668
20	15	0	0	+1	12.72	19.47	569.50	1.014
21	21	+1	-1	+1	17.75	27.17	728.68	1.009
22	10	0	-1	-1	1.39	2.13	93.34	0.175
23	23	+1	0	0	10.17	15.56	448.82	1.183
24	25	+1	+1	-1	7.94	12.15	374.32	0.757
25	2	-1	-1	0	3.75	5.74	174.53	0.234
26	7	-1	+1	-1	6.42	9.82	234.28	0.178
27	19	+1	-1	-1	1.49	2.28	228.32	0.522

Tomando como base los datos experimentales se desarrollaron modelos matemáticos cuadráticos a fin de predecir la producción de azúcares, la concentración de furfural y los valores del FSC utilizando cada uno de los factores y la interacción entre ellos. La Tabla 3.13 resume el ANOVA obtenido para el modelo matemático de la producción de azúcares, en donde de acuerdo con los valores-p se observó que la temperatura de hidrólisis (A), la concentración del ácido (B), el tiempo de contacto (C), la variable A^2 y las interacciones AC y BC resultaron significativas (valor-p < 0.05), mientras que las variables B^2, C^2 y la interacción AB resultaron estadísticamente insignificantes ya que mostraron un valor-p > 0.05.

Tabla 3.13 ANOVA obtenido para el modelo matemático cuadrático de los azúcares

Variable	Coeficiente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor-p
Modelo		9	923.49	102.61	50.13	<0.0001
Temp. (A)		1	183.04	183.042	89.42	<0.001
Conc. (B)		1	208.08	208.08	101.66	<0.001
Tiempo (C)		1	371.92	371.92	181.70	<0.001
A^2		1	26.66	26.66	13.02	0.002
B^2		1	1.25	1.25	0.61	0.446
C^2		1	2.60	2.60	1.27	0.276
AB		1	0.93	0.93	0.45	0.511
AC		1	116.69	116.69	57.01	<0.001
BC		1	12.34	12.34	6.03	0.025
Residual		17	34.79	2.047		

El modelo matemático mostrado en la Ec. 3.6 tuvo un valor-p < 0.0001 lo cual sugiere que dicho modelo resulta altamente significativo y puede predecir de una manera confiable la producción de azúcares a partir de las variables de la hidrólisis.

$$\boldsymbol{Az\acute{u}car}\left(\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{100\ g}}\right) = \boldsymbol{240.53 - 4.63A + 2.24B - 1.11C}$$

$$\boldsymbol{+0.021A^2 - 0.46B^2 + 0.0007C^2 + 0.028AB + 0.01AC + 0.03BC}$$

R^2=0.964 (Ec. 3.6)

En el caso del furfural todas las variables cuadráticas; A^2 (p=0.121), B^2 (p=0.133) y C^2 (p=0.244), así como la interacción AB (p=0.439) mostraron un valor p > 0.05, lo cual sugiere que dichas variables no tienen significancia estadística en el proceso de hidrólisis. El ANOVA obtenido a partir de los datos experimentales del FSC mostró que la interacción de las variables no fue estadísticamente significativa ya que su valor-p resultó > 0.05 en todos los casos; AB (p=0.130), AC (p=0.566) y BC (p=0.073). El modelo matemático obtenido tanto para el furfural (Ec. 3.7) como para el FSC (Ec. 3.8) mostró un valor-p < 0.0001, lo cual se asocia a una alta confiabilidad de los modelos para predecir la concentración de furfural y los valores del FSC a partir de la temperatura, concentración de ácido y tiempo de hidrólisis.

$$furfural\left(\frac{mg}{100\ g}\right) = 3779.84 - 61.59A - 269.84B - 31.55C$$
$$+0.2711A^2 + 26.27B^2 + 0.0222C^2 + 0.932AB + 0.316AC + 0.863BC$$

R^2=0.979 (Ec. 3.7)

$$FSC = -3.53 - 0.045A + 2.08B + 0.020C + 0.0004A^2 - 0.229B^2 - 0.00007C^2$$
$$- 0.0012AB - 0.000015AC - 0.00048BC$$

R^2=0.996 (Ec. 3.8)

La Figura 3.19 muestra el comportamiento de los datos calculados con los modelos cuadráticos en función de los valores experimentales. En todos los casos, los datos se ajustaron satisfactoriamente a un modelo lineal alcanzado coeficientes de correlación R^2 mayores a 0.96, lo que comprueba que la desviación entre los valores experimentales y los calculados es baja. Esta tendencia fue reportada previamente por Cao *et al.* (2018) y por Saha *et al.* (2018) quienes estudiaron respectivamente la hidrólisis de la madera de pino con ácido fosfórico y la hidrólisis de residuos de frutas con ácido acético.

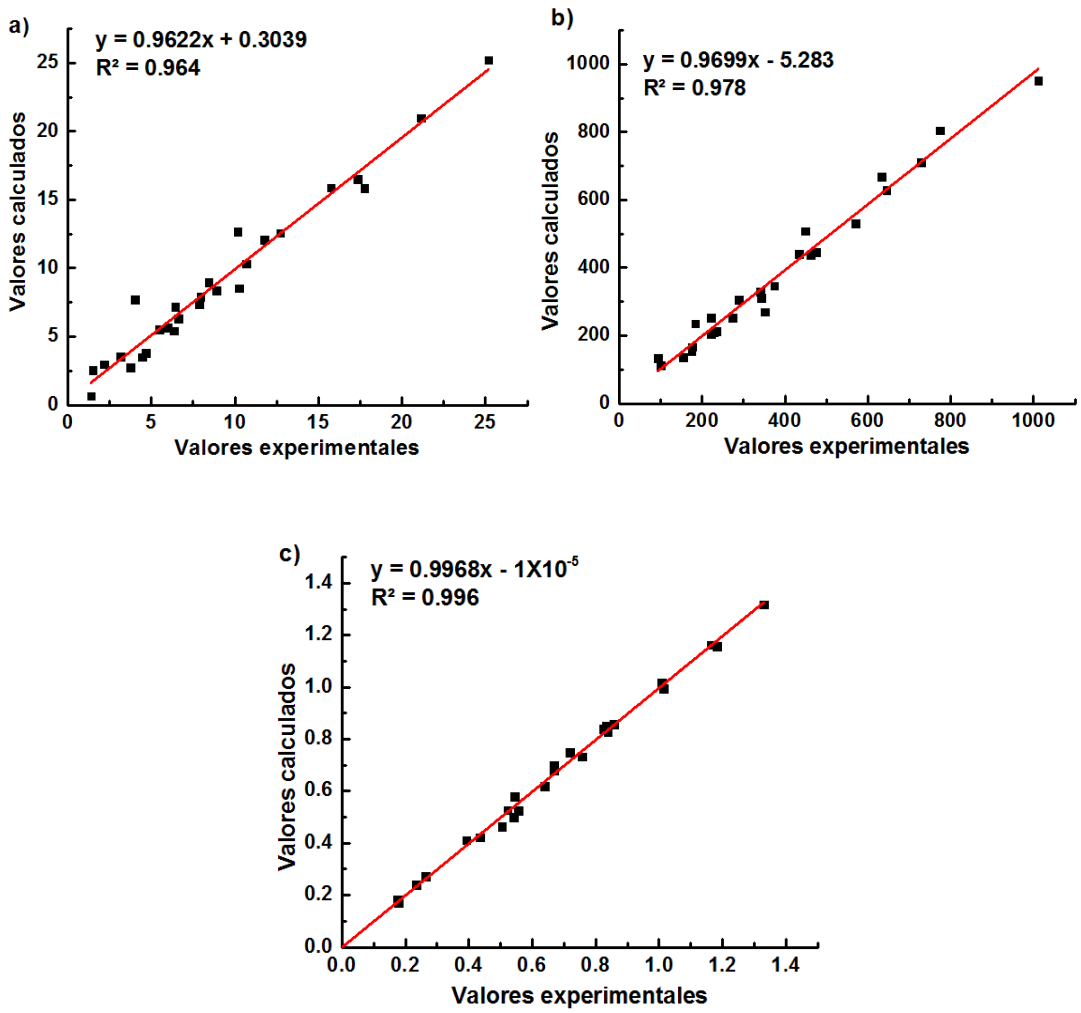


Figura 3.19. Comportamiento de los valores calculados con los modelos cuadráticos en función de los valores experimentales para los a) azúcares reductores, b) furfural y c) FSC

Las superficies de respuesta obtenidas para los azúcares reductores se muestran en las Figuras 3.20a, 3.20b y 3.20c. La producción de azúcares incrementó al aumentar la temperatura de hidrólisis, la concentración del ácido y el tiempo de contacto, siendo los niveles más altos de cada una de las variables en donde se encontró la máxima producción; 25.17 g de azúcar / 100 g de olote. La temperatura fue la variable que más afectó el rendimiento de azúcares, incrementando la producción de 11 a 25 g de azúcar / 100 de olote cuando la temperatura aumentó de 90 a 110 ºC, utilizando una concentración de ácido del 5%v y un tiempo de reacción de 90 minutos (Figs. 3.20a y 3.20b), Avci *et al.* (2013[a]), obtuvieron un comportamiento

similar durante la hidrólisis con ácido fosfórico diluido del rastrojo de maíz, ya que la producción de azúcares se duplicó cuando se aumentó la temperatura de 140ºC a 180 ºC.

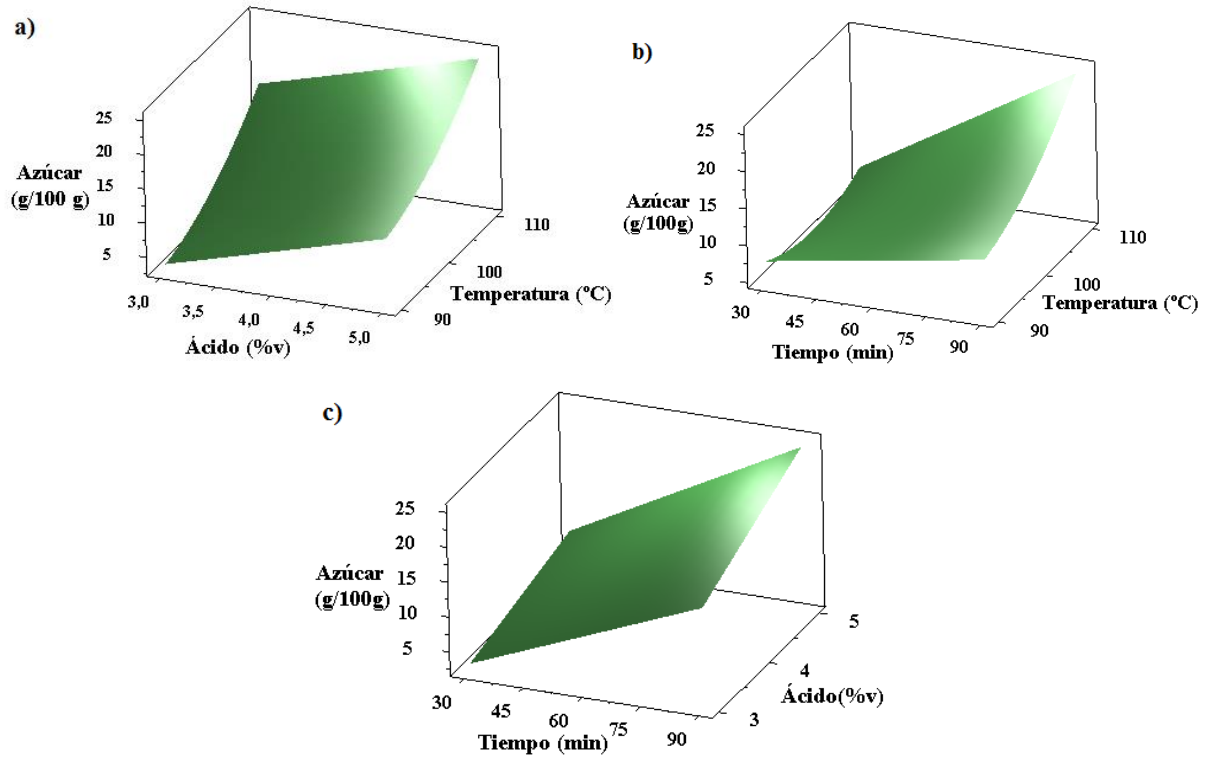
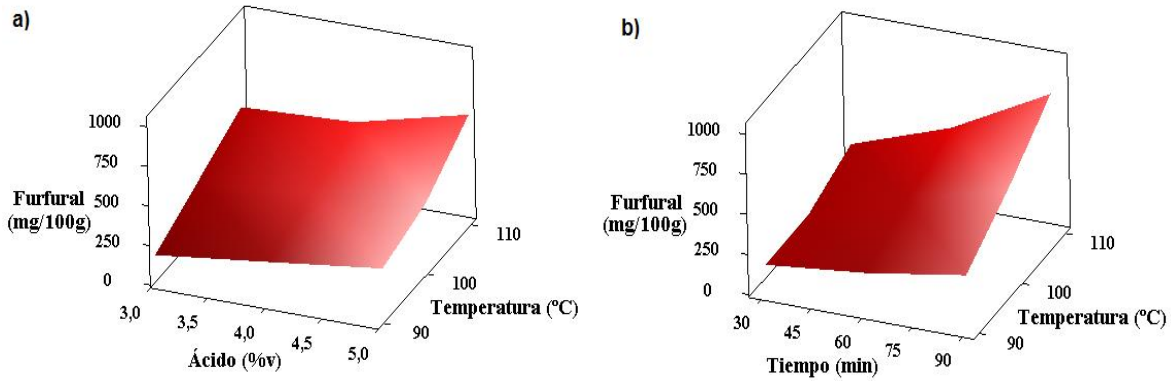


Figura 3.20. Superficies de respuesta obtenidas para la producción de azúcares; a) Temperatura y concentración a 90 minutos, b) Temperatura y tiempo con 5 %v H_3PO_4 y c) concentración y tiempo a 110 °C

Díaz-Blanco *et al.* (2018), observaron que la producción de azúcares aumentó al incrementar la concentración del ácido y al disminuir la temperatura, en la hidrólisis del Agave lechuguilla con ácido sulfúrico diluido, este comportamiento resultó similar a lo reportado por Cao *et al.* (2018), quienes observaron la misma tendencia a una temperatura de 120ºC, sin embargo, en éste último trabajo el rendimiento de producción de azúcares disminuyó al modificar la temperatura. En la producción de azúcares mediante hidrólisis con ácido acético de los residuos de frutas se observó que el rendimiento incrementó al utilizar los niveles más bajos de la temperatura (62.5ºC), tiempo de contacto (30 minutos) y concentración de ácido (0.2 M) (Saha *et al.,* 2018), mientras que en la hidrólisis de la especie *Eucalyptus benthamii* con ácido

fosfórico la mayor producción de azúcares se obtuvo empleando la temperatura más alta (200 ºC) y el nivel medio de la concentración del ácido (0.75 %p) (Castro *et al.,* 2014). La producción de azúcares reductores a partir del bambú y del bagazo de caña de azúcar mediante hidrólisis con ácido sulfúrico diluido se estudió a través de superficie de respuesta (Timung *et al.,* 2015), ambos biomateriales mostraron el mayor rendimiento a los niveles más altos tanto de la temperatura como del tiempo de reacción, comportamiento observado en el presente trabajo. Jung *et al.* (2013), evaluaron la producción de azúcares por hidrólisis con ácido sulfúrico de racimos de frutas, concluyendo que un incremento tanto de la concentración del ácido como de la temperatura asociado a un decremento en los tiempos de operación favorece el rendimiento. Las diferencias en la producción de azúcares observadas entre las investigaciones antes mencionadas y el presente estudio pueden atribuirse principalmente a la naturaleza de la biomasa, al tipo de ácido, y a las condiciones y a la severidad de la hidrólisis.

La mayor producción de furfural fue de 1.01 g / 100 g de olote obtenido en el experimento con los valores más altos de cada una de las variables, las concentraciones más bajas se observaron cuando se utilizaron los niveles más bajos de las variables de hidrólisis. Como se observa en las Figuras 3.21a, 3.21b y 3.21c, un incremento de la temperatura, concentración del ácido y del tiempo de contacto propició un aumento en la producción de furfural, que resultó similar al observado en las superficies de respuesta de los azúcares reductores y a lo reportado previamente por Avci *et al.* (2013[a]), durante la hidrólisis del rastrojo de maíz con ácido fosfórico.



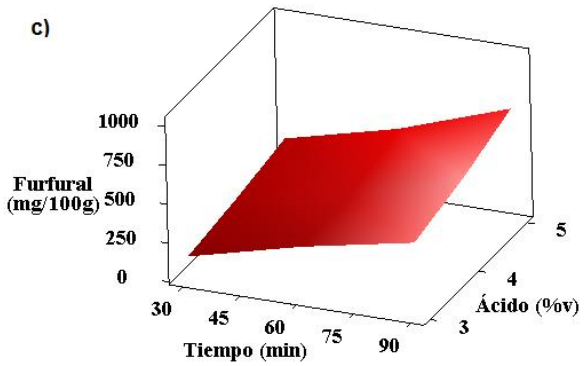


Figura 3.21. Superficies de respuesta obtenidas para la producción de furfural; a) Temperatura y concentración a 90 minutos, b) Temperatura y tiempo con 5 %v H_3PO_4 y c) concentración y tiempo a 110 ºC

De acuerdo con las Figuras 3.21a y 3.21b, la temperatura fue la variable que más efecto tuvo sobre la producción de furfural, lo cual puede atribuirse a que el furfural es un aldehído que se produce a partir de la deshidratación de los azúcares (pentosas) en presencia de calor (Ruíz *et al.,* 2013; Na & Lee, 2015). Avci *et al.* (2013[b]), observaron durante la hidrólisis con ácido fosfórico del rastrojo de maíz que un incremento tanto de la temperatura como de la concentración del ácido aumentó la concentración de furfural en el hidrolizado, mientras que Vázquez *et al.* (2007), demostraron que un incremento en la concentración del ácido asociado a un aumento en el tiempo de contacto favoreció la producción de furfural a partir de paja de sorgo, la máxima producción encontrada por ellos fue de 0.57 g de furfural por cada g de pentosa, valor que equivale a un rendimiento de 13.36 g de furfural / 100 g de paja de sorgo en una hidrólisis con 6 %p ácido fosfórico, 134 °C y 300 minutos de tiempo de contacto.

Los valores más grandes del FSC se observaron en un rango de concentración de ácido de 4 a 4.5 %v y a los tiempos y temperaturas más altas. La Figura 3.22a muestra un aumento del FSC en función de la concentración del ácido y de la temperatura, sin embargo ésta última variable mostró un efecto más importante, ya el FSC incrementó de 0.640 a 1.164 al aumentar la temperatura de 90 °C a 110 °C,

utilizando una concentración de ácido de 5 %v y un tiempo de contacto de 90 minutos.

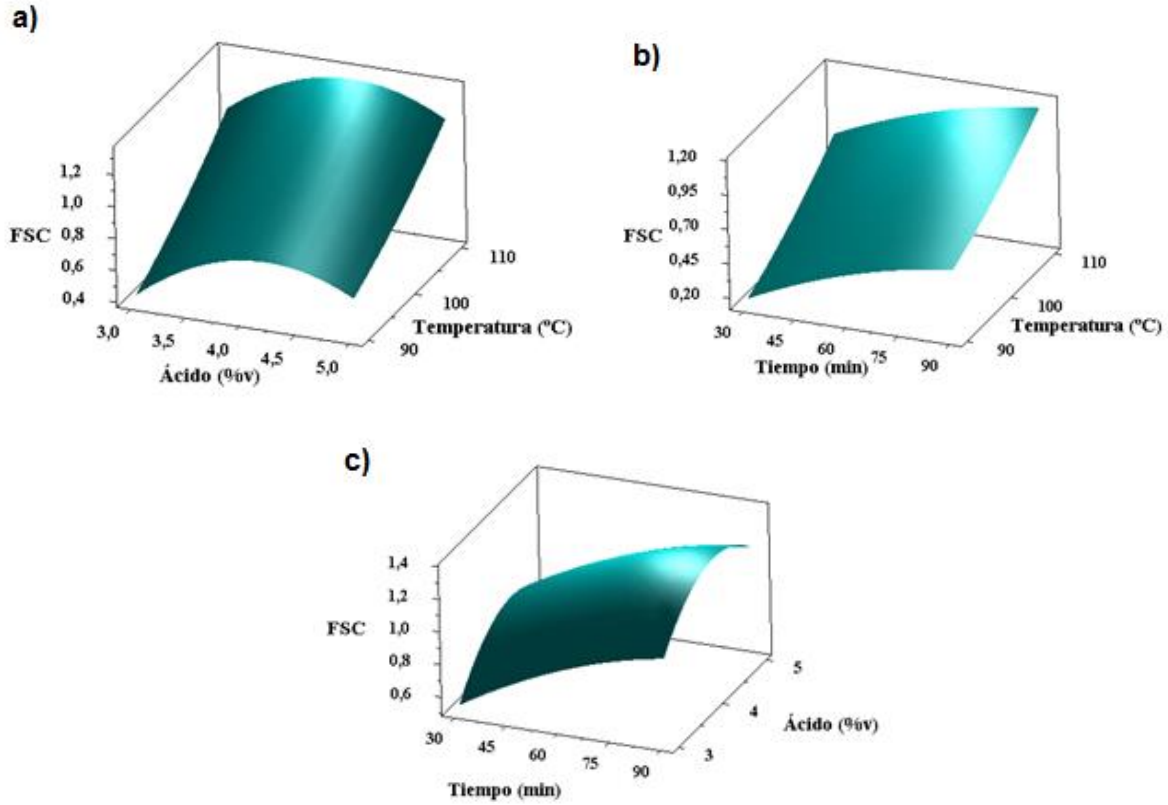


Figura 3.22. Superficies de respuesta obtenidas para el FSC; a) Temperatura y concentración a 90 minutos, b) Temperatura y tiempo con 5 %v H_3PO_4 y c) concentración y tiempo a 110 ºC

A las temperaturas y tiempos de reacción más bajos se determinaron los FSC más pequeños, mientras que a las temperaturas y tiempos de contacto más altos se observaron los valores más grandes. Este comportamiento sugiere que tanto el tiempo de contacto como la temperatura afectan drásticamente la severidad de la hidrólisis ácida del olote (Fig. 3.22b). En la Figura 3.22c se observa que el FSC incrementó al aumentar tanto el tiempo de contacto como la concentración del ácido, siendo ésta última variable la que menos afectó al FSC. De acuerdo con las superficies de repuesta, el FSC se estabilizó y disminuyó al aumentar la concentración del ácido por encima de 4.5 %v.

En la Figura 3.23 se observa que un mismo valor del FSC puede relacionarse con diferentes rendimientos, es decir, diferentes condiciones de hidrólisis pueden tener una misma severidad pero diferente producción de azúcares y de furfural. Los rendimientos más bajos de producción de azúcares; 1.39 y 1.49 g / 100 g olote están asociados a los FSC de 0.175 y de 0.522 respectivamente, mientras que la mayor producción tanto de azúcares como de furfural se observó a un valor del FSC de 1.164.

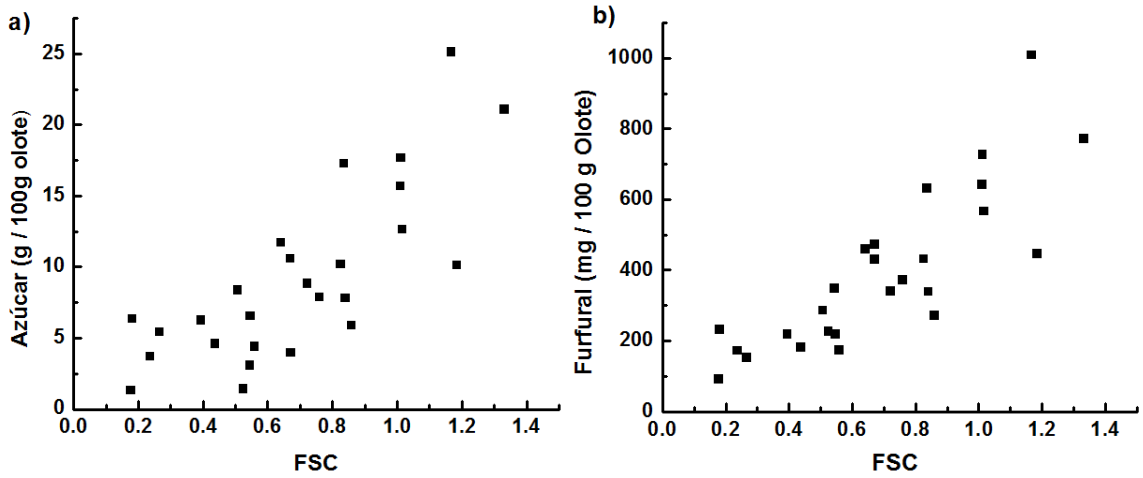


Figura 3.23. Producción de a) azúcares y de b) furfural en función del FSC

Las concentraciones de azúcares reductores y de furfural incrementaron al aumentar el FSC (Díaz-Blanco *et al.,* 2018; Park *et al.,* 2013; Pappas *et al.,* 2014), sin embargo, FSC mayores a 1.164 mostraron una disminución en dichas concentraciones. Comportamiento similar fue reportado por Ruiz *et al.* (2013), quienes estudiaron la hidrólisis de los tallos de girasol con ácido sulfúrico diluido observando que a FSC mayores a 2.32 la concentración de furfural disminuyó. Esta tendencia puede ser atribuida a que las condiciones de hidrólisis resultaron severas para la biomasa pero poco eficientes para la producción de azúcares reductores y de furfural, propiciando la formación de algunos subproductos tales como los monolignoles y los ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Algunos trabajos reportados previamente han mostrado tendencias similares a las obtenidas en el

presente trabajo utilizando diferentes condiciones de hidrólisis y tipos de biomasa (Pappas *et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2013). En trabajos anteriores (Gómora *et al.,* 2016) se reportó la hidrólisis ácida del tallo de haba y del olote, observando que los datos de producción de azúcares se ajustaron a un modelo exponencial en función del FSC ($R^2 > 0.90$), dicha tendencia puede observarse ligeramente en el presente trabajo.

La temperatura tuvo un efecto importante sobre la severidad de la hidrólisis, ya que al aumentar dicha variable tanto el FSC como la producción de azúcares se incrementaron, como se ve claramente en la Figura 3.24 a). Esta tendencia fue diferente a la reportada por Hsu *et al.* (2010), quienes observaron que al aumentar la temperatura de operación de 160°C a 190°C, el FSC no cambió, sin embargo, la producción de xilosa disminuyó aproximadamente en un 30%, lo cual puede atribuirse a la alta temperatura de operación que favoreció la producción de furfural. La concentración del ácido no mostró un efecto importante sobre el FSC (Figura 3.24 b), pero si sobre la producción de azúcares reductores, ya que FSC cercanos a 1.0 presentan diferentes concentraciones de azúcar con distintas concentraciones de ácido. Los valores más grandes del FSC se obtuvieron con una concentración del ácido de 4 %v, sin embargo, la mayor producción de azúcares se observó utilizando ácido fosfórico al 5 %v.

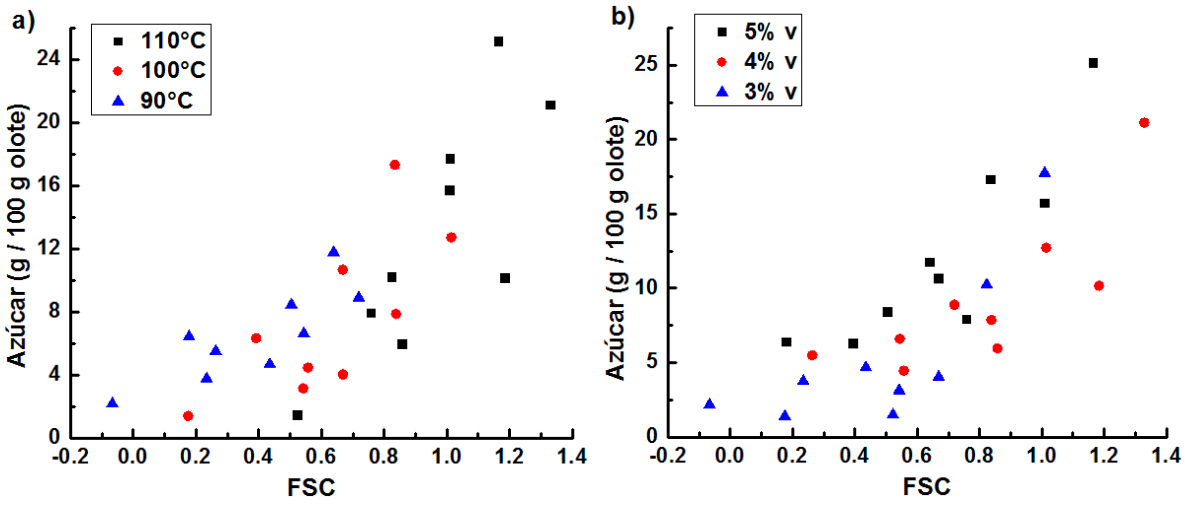


Figura 3.24. Efecto de la a) temperatura y de la b) concentración del ácido sobre la producción de azúcares reductores a diferentes valores del FSC

La producción de furfural incrementó linealmente en función de la cantidad de azúcares, mostrando un coeficiente de correlación R^2=0.975 y una pendiente m=0.0389 (Figura 3.25). Este último valor significa que se producen 0.0389 g de furfural por cada g de azúcar reductor, es decir, se requieren 25.71 g de azúcar para producir 1 g de furfural. Ésta relación calculada a partir de la pendiente de la línea recta resultó muy similar a los datos empíricos, ya que el experimento realizado con 5 %v H_3PO_4, 110 °C y 90 minutos (niveles altos de cada variable para este análisis) mostró una producción de azúcares reductores y de furfural de 25.17 y de 1.01 g / 100 g de olote respectivamente, valores que equivalen a una relación de 24.92 g de azúcar / g de furfural. La relación más grande entre el azúcar y el furfural fue de 35.65 observada en el experimento con 4 %v H_3PO_4, 90 °C y 30 minutos de tiempo de reacción, a éstas condiciones la producción de azúcares fue de 5.5 g / 100 g de olote. Los experimentos realizados a 90°C mostraron rendimientos de producción de azúcar bajos (< 9 g de azúcar / 100 g de olote), sin embargo, a ésta temperatura también se observaron las relaciones azúcar-furfural más grandes, lo que sugiere que a temperaturas mayores a 90 ºC la producción de azúcares y de furfural aumenta, siendo la producción de furfural la reacción más favorecida.

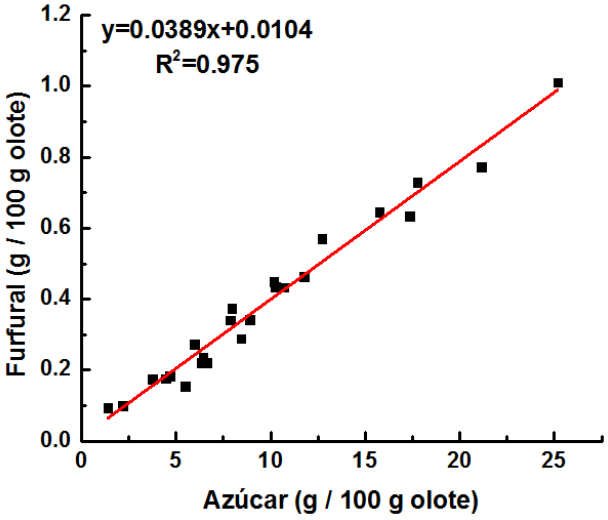


Figura 3.25. Comportamiento de la concentración de furfural en función de la cantidad de azúcares reductores

Se seleccionaron muestras de olote hidrolizado con diferentes severidades y se caracterizaron mediante la técnica de FTIR con la finalidad de determinar los cambios en los grupos funcionales debidos al contacto con el ácido. Las bandas de vibración características de la celulosa, hemicelulosa y lignina se representaron con las letras C, H y L respectivamente, mientras que el enlace β-glucosídico propio de la celulosa y la hemicelulosa se identificó con la letra B (Figura 3.26).

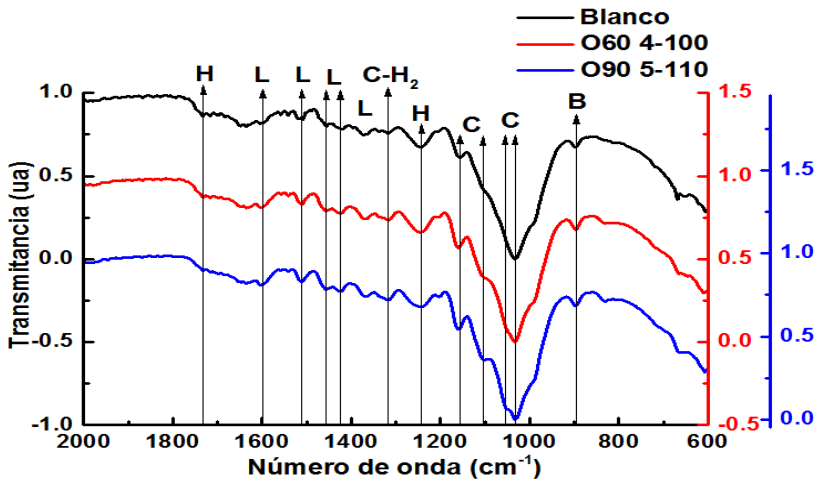


Figura 3.26. Espectros FTIR de las muestras tomadas antes (línea negra) y después de la hidrólisis ácida con diferentes severidades; FSC=0.838 (línea roja) y FSC=1.164 (línea azul)

Las bandas características de la hemicelulosa se observaron a 1243 y 1732 cm^{-1}, ésta última vibración ha sido asociada con el enlace C=O propio de los grupos acetil (Gaur *et al.,* 2016; Sewsynker-Sukai *et al.,* 2018). La identificación de las principales bandas de vibración observadas en los espectros del olote con y sin hidrolizar se discutió en el apartado 3.2.3. La intensidad de las bandas de vibración características de la hemicelulosa disminuyó en función del FSC, mientras que la región característica de la celulosa (950 -1200 cm^{-1}) mostró la aparición de una banda a 1064 cm^{-1} después de la hidrólisis ácida. La aparición de dicha banda aunada al incremento en la intensidad de la vibración observada en 1510 cm^{-1} sugiere que la fracción másica de la lignina aumentó a consecuencia de la despolimerización de la holocelulosa.

Pappas *et al.* (2014) utilizaron el concepto de absorbancia relativa para definir la relación existente entre la banda de vibración ubicada en 1732 cm^{-1} correspondiente a la hemicelulosa y la situada en 1510 cm^{-1} asociada con el anillo aromático de la lignina, observando una relación lineal negativa entre dicha absorbancia relativa y la eficiencia de obtención de azucares. Una tendencia similar se observó en el presente trabajo, en donde los azúcares reductores, la concentración de furfural y el FSC mostraron un comportamiento lineal negativo en función de la transmitancia relativa (Figura 3.27).

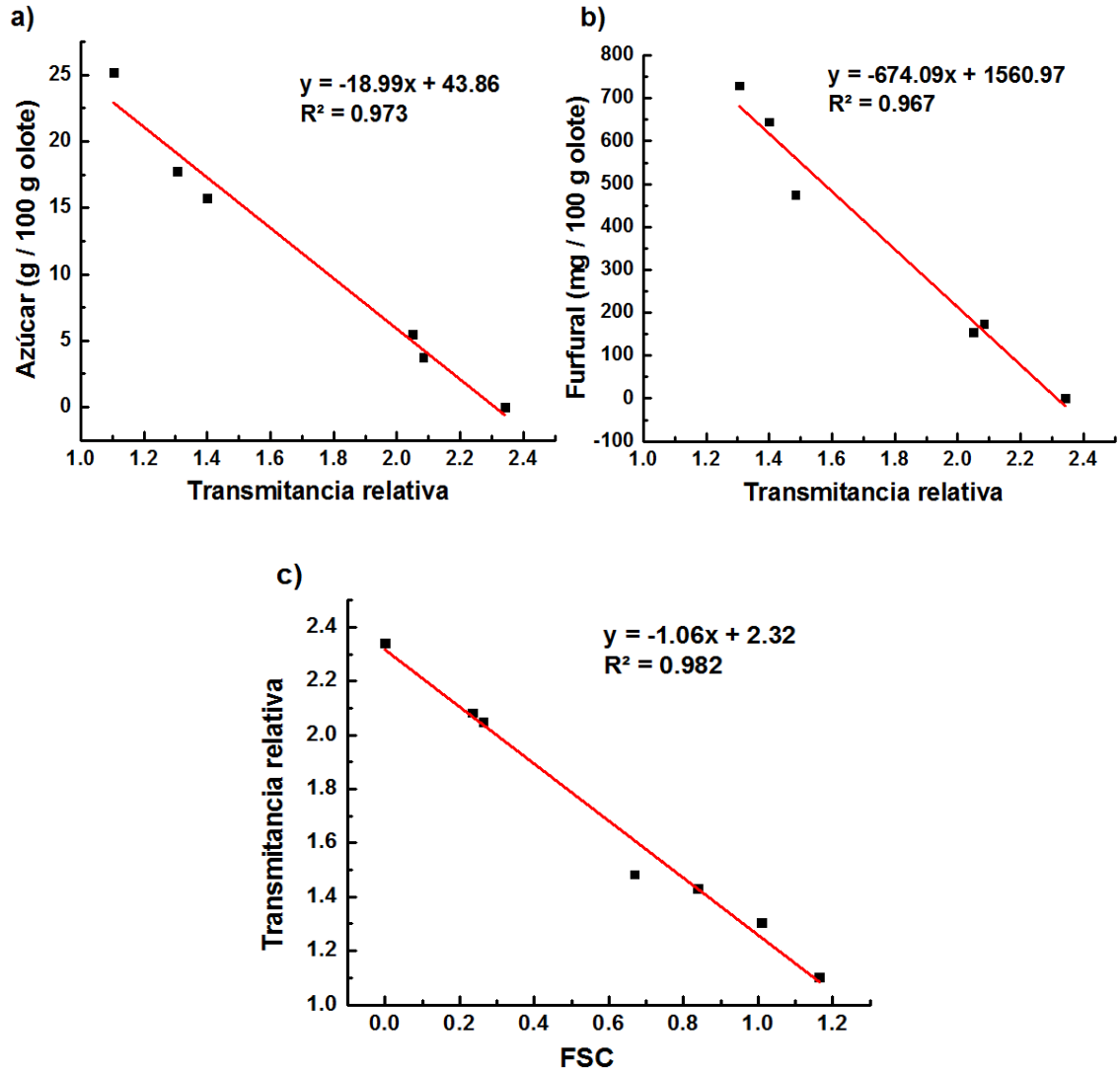


Figura 3.27. Comportamiento lineal observado entre a) producción de azúcares y transmitancia relativa, b) producción de furfural y transmitancia relativa, y c) FSC y transmitancia relativa.

La transmitancia al ser una función complementaria de la absorbancias se rige por la ley de Lambert-Beer dentro del rango Uv-Vis-Ir cercano y por ello puede utilizarse. El valor más grande de la transmitancia relativa correspondió al olote sin hidrolizar, además un decremento en la transmitancia relativa está asociado a un incremento tanto de la producción de azúcares como de furfural, lo cual se relaciona directamente con la disminución en la intensidad de la banda de vibración ubicada a 1732 cm^{-1} y al incremento en la intensidad de la vibración propia del anillo aromático de la lignina (1510 cm^{-1}), éste último hecho puede ser atribuido a la baja solubilización o re-polimerización parcial de la lignina.

3.2.5 Hidrólisis del olote con ácido sulfúrico

Debido a que el experimento realizado con 1.34 M ácido fosfórico y 110 °C mostró el mayor rendimiento de producción de azúcares, se propuso utilizar dichas condiciones de operación con ácido sulfúrico a fin de evaluar el efecto del tipo de ácido sobre la eficiencia de hidrólisis. En éste caso, la máxima producción de azúcares fue de 51.03 g de azúcar / 100 g olote observado a los 150 minutos del experimento realizado a 110 ºC, mientras que los rendimientos más altos alcanzados a las temperaturas de 90 y 100 °C se observaron después de 300 minutos de tiempo de reacción (Figura 3.28a). El comportamiento de producción de azúcares observado con ambos ácidos fue diferente, ya que en el caso del ácido fosfórico la degradación de los azúcares no se observó en los datos experimentales, lo cual puede atribuirse a la naturaleza del mismo ácido, ya que el fosfórico tienen un poder catabólico y un grado de ionización menor en comparación con el sulfúrico (Láinez *et al.,* 2018).

El máximo rendimiento de azúcares determinado con el ácido fosfórico fue de 54.31 g de azúcar / 100 g de olote, el cual resultó ligeramente superior al determinado con el ácido sulfúrico, sin embargo, la producción de azúcares a 90 y 100 °C resultó mayor utilizando ácido sulfúrico ya que los rendimientos después de 300 minutos de tiempo de reacción fueron de 37.97 y 45.86 g / 100 g de olote respectivamente. En el caso del ácido fosfórico se alcanzaron los rendimientos de 34.02 y 41.77 g / 100 g de olote para las temperaturas de 90 y 100 °C respectivamente. Este comportamiento

sugiere que la producción de azúcares se ve favorecida al utilizar ácido sulfúrico a bajas temperaturas, sin embargo, al aumentar la temperatura a 110 °C el efecto combinado de la temperatura y de la concentración del ácido sulfúrico propicia la descomposición térmica de los azúcares disminuyendo los rendimientos.

La Figura 3.28 b) muestra la producción de furfural durante la hidrólisis del olote con ácido sulfúrico 1.34 M. Como se observa en dicha Figura, un incremento tanto de la temperatura como del tiempo de reacción favorece la producción de furfural, siendo 2178.77 mg / 100 g de olote la máxima producción determinada a 110 °C y 300 minutos. Los comportamientos de la producción de furfural a 90 y 100 °C resultaron similares entre sí, sin embargo, a 110 °C la concentración de furfural incrementó considerablemente a partir de los 150 minutos, lo cual está asociado con la disminución en la producción de azúcares observada en la Figura 3.28a.

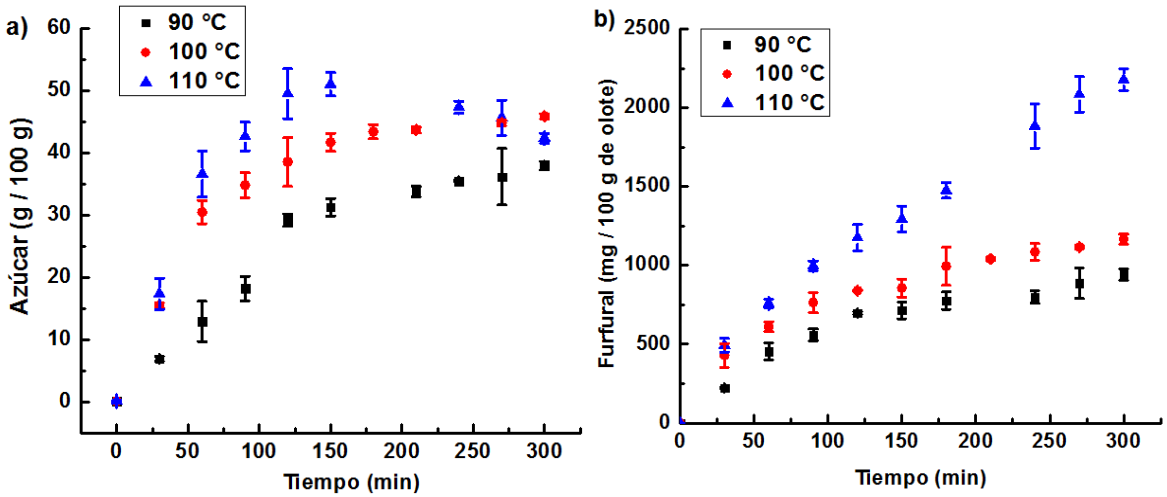


Figura 3.28. Comportamiento de la producción de a) azúcares reductores y de b) furfural durante la hidrólisis del olote con ácido sulfúrico 1.34 M

La Figura 3.29 muestra el espectro Uv-Vis del hidrolizado de olote obtenido con ácido sulfúrico 1.34 M, 110 ºC y 300 minutos de tiempo de reacción. La banda de máxima absorbancia se observó a 277 nm, la cual corresponde al furfural grado reactivo (Anexo B3). Por otro lado, el hidrolizado obtenido con ácido fosfórico a las mismas condiciones de operación mostró un desfasamiento en su pico de máxima

absorbancia, sugiriendo la presencia tanto de furfural como de hidroximetil-furfural (HMF), ya que la banda de máxima absorbancia de éste último compuesto se encuentra en 284 nm. Tomando como base la curva de calibración del furfural mostrada en el Anexo B3, se determinó la concentración de aldehídos en ambos hidrolizados obteniendo 1405.36 ± 47.15 ppm para el caso del ácido sulfúrico y 949.39 ± 34.88 ppm para el ácido fosfórico. Debido a que la banda de máxima absorbancia para el hidrolizado con ácido sulfúrico es 277 nm, se asume que la concentración total de aldehídos corresponde al furfural. Las concentraciones de furfural y de HMF en el hidrolizado obtenido con ácido fosfórico fueron de 332.29 y 617.11 ppm respectivamente, determinadas con ayuda de las curvas de calibración del furfural, HMF (Anexo B4) y de las mezclas de ambos compuestos. La concentración de ambas especies se validó también mediante la deconvolución del espectro Uv-Vis.

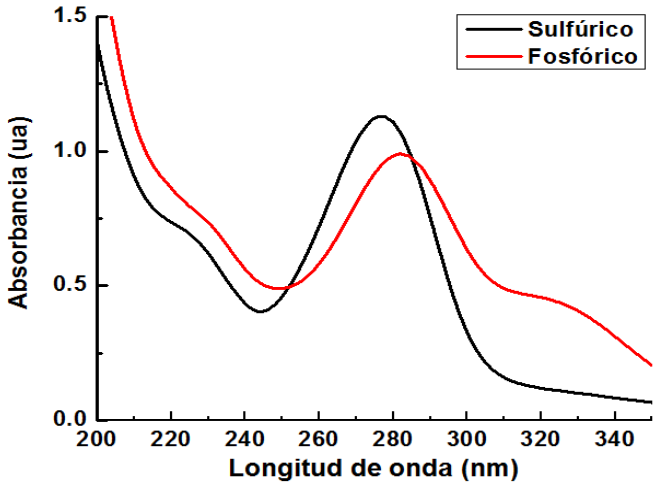


Figura 3.29. Espectros Uv-Vis de los hidrolizados de olote a obtenidos a 110 ºC y 300 minutos utilizando ácido sulfúrico y fosfórico 1.34 M

Los rendimientos de producción de azúcares obtenidos tanto con el ácido sulfúrico como con el fosfórico resultaron similares entre sí, sin embargo, la concentración de aldehídos fue mayor en un 40% utilizando ácido sulfúrico, lo cual sugiere que el ácido fosfórico tiene un mayor potencial para hidrolizar el olote, disminuyendo la

descomposición de los azúcares producidos y favoreciendo la subsecuente fermentación.

El pH y el FSC se determinaron en cada uno de los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico. Como se observa en la Figura 3.30, un incremento en el valor del FSC está relacionado con un aumento en la concentración de azúcares reductores, mostrando los rendimientos más altos en un rango del FSC de 2.4 a 2.6. Valores mayores a 2.6 muestran una disminución en la concentración de azúcares atribuida principalmente a la degradación de los sacáridos. Los valores del FSC determinados con el ácido sulfúrico fueron más altos en comparación con los calculados con el ácido fosfórico, lo cual puede deberse a la naturaleza fuerte del ácido sulfúrico que le permite disociarse mejor en fase acuosa y aumentar más los gradientes de pH.

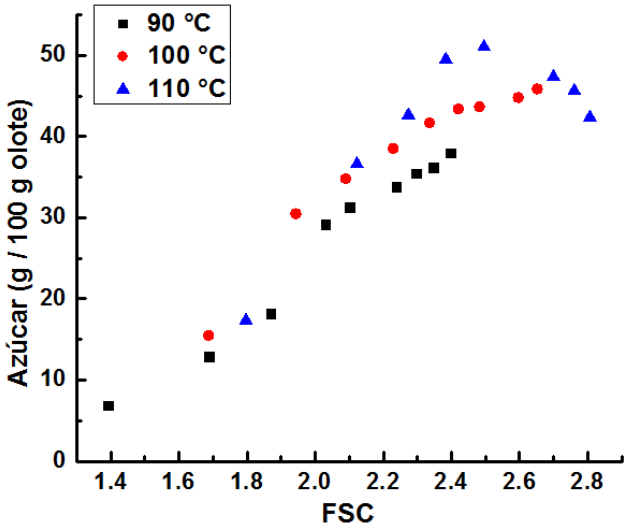


Figura 3.30. Comportamiento de la producción de azúcares en función del FSC durante la hidrólisis del olote con ácido sulfúrico

Los datos de producción de azúcares se ajustaron adecuadamente al modelo cinético de Saeman (Ec. 1.4) como se observa en la Figura 3.31. Las constantes de velocidad obedecen la ley de Arrhenius, ya que un incremento en la temperatura de hidrólisis aumentó el valor de las constantes k_1 y k_2. Los valores más altos de las constantes cinéticas se observaron a la temperatura de 110 ºC, y para cada una de

las temperaturas la constante k_1 fue mayor en comparación con la constante k_2, este comportamiento sugiere que las condiciones de hidrólisis propuestas favorecen la producción de azúcares por encima de la descomposición de los mismos.

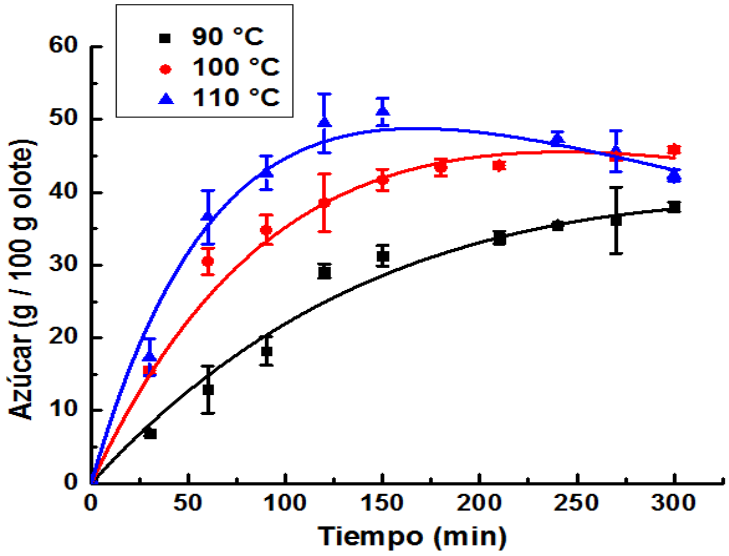


Figura 3.31. Datos experimentales de la producción de azúcares mediante hidrólisis con 1.34 M ácido sulfúrico del olote ajustados al modelo cinético de Saeman

La Tabla 3.14, presenta el ajuste de los datos experimentales al modelo cinético de Saeman, éste fue satisfactorio con valores $R^2 > 0.99$ para cada una de las temperaturas. El tiempo óptimo de reacción calculado va acorde a lo observado en la Figura 3.28 a), ya que la máxima producción de azúcares a 110 ºC se alcanzó a los 150 minutos y el tiempo óptimo determinado a dicha temperatura fue de 167 min.

Tabla 3.14 Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis con ácido sulfúrico del olote determinados con el modelo de Saeman

Condiciones de hidrólisis	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	R^2	k_r	t_{opt} (min)
90°C	$4.49X10^{-3}$	$1.4X10^{-3}$	0.999	3.207	377.15
100°C	$8.81X10^{-3}$	$1.49X10^{-3}$	0.998	5.912	242.75
110°C	$1.43X10^{-2}$	$1.75X10^{-3}$	0.999	8.171	167.38

Los parámetros termodinámicos de la hidrólisis del olote con ácido sulfúrico se resumen en la Tabla 3.15. De acuerdo a los valores positivos de ΔH y de ΔG, las reacciones de producción y de descomposición de azúcares son endotérmicas y no espontáneas, mientras que el valor negativo de ΔS sugiere que la mayor cantidad de energía se encuentra en el lado de los reactivos previo a la formación del complejo que propicia la reacción. El valor de ΔS determinado para k_2 fue menor en comparación con el calculado para k_1, esto significa que desde el punto de vista termodinámico los productos formados durante la reacción de descomposición de los azúcares son más estables (Tizazu & Moholkar, 2018). La Ea calculada para la constante k_1 fue de 66.93 kJ mol^{-1}, la cual fue mayor que la determinada con ácido fosfórico (51.99 kJ mol^{-1}). Comportamiento opuesto se observó con las constantes k_2, ya que la Ea determinada con el ácido fosfórico (114.99 kJ mol^{-1}) fue mucho mayor a la mostrada en la Tabla 3.15 para el ácido sulfúrico. Esta tendencia sugiere que el ácido fosfórico favoreció la producción de azúcares reductores disminuyendo la descomposición de los mismos, mientras que con el ácido sulfúrico la reacción favorecida fue la descomposición de los azúcares reductores.

Tabla 3.15 Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida del olote

Ácido Sulfúrico	Ea (KJ mol^{-1})	A (min^{-1})	R^2	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	R^2	ΔG (KJ mol^{-1})
k_1	66.93	$1.95X10^7$	0.994	63.83	-149.57	0.993	118.15
							119.64
							121.14
k_2	12.85	0.097	0.931	9.75	-308.53	0.888	121.79
							124.88
							127.96

3.3 Tratamiento alcalino del tallo de haba y del rastrojo de maíz

El tratamiento alcalino tiene como finalidad remover parcial o totalmente a la lignina, dejando inalterada la fracción holocelulósica de la biomasa.

3.3.1 Delignificado del tallo de haba y del rastrojo de maíz

Como se observa en la Tabla 3.16, el porcentaje de lignina incrementó después del tratamiento alcalino. Los porcentajes más altos de lignina se observaron en los experimentos con 1 %p NaOH, mientras que los porcentajes más bajos de lignina se determinaron en los experimentos con 3 %p NaOH con excepción del realizado en el TH durante 120 minutos. De acuerdo con Michalska *et al.* (2015), el incremento en el porcentaje de lignina puede atribuirse a la solubilización parcial o total de la hemicelulosa, la cual ocurre de manera previa a la remoción de la lignina.

Tabla 3.16 Porcentajes de lignina determinados en el TH y en el RM antes y después de la hidrólisis alcalina a 121 ºC

TH		RM	
CONDICIONES	LIGNINA (%)	CONDICIONES	LIGNINA (%)
Materia prima	12.16 ± 0.66	Materia prima	16.33 ± 0.11%
1%p NaOH, 60 min	26.17 ± 2.5	1%p NaOH, 60 min	19.91 ± 2.2
2%p NaOH, 60 min	25.20 ± 3.2	2%p NaOH, 60 min	17.6 ± 2.35
3%p NaOH, 60 min	23.71 ± 2.2	3%p NaOH, 60 min	16.35 ± 3.01
1%p NaOH, 120 min	25.02 ± 3.8	1%p NaOH, 120 min	20.67 ± 1.9
2%p NaOH, 120 min	21.85 ± 1.1	2%p NaOH, 120 min	19.97 ± 0.67
3%p NaOH, 120 min	23.12 ± 3.1	3%p NaOH, 120 min	14.6 ± 0.25

La hidrólisis alcalina del RM con 3 %p NaOH durante 120 minutos mostró una ligera disminución en el contenido de lignina con respecto al porcentaje inicial, disminuyendo de 16.33% antes del tratamiento a 14.6% después de 2 horas, lo cual corresponde a un delignificado del 10.59%, valor que resultó menor en comparación con el 14.78% obtenido por Zhao *et al.* (2008) quienes estudiaron el tratamiento alcalino del abeto con 40 %p NaOH a 24ºC durante 24 horas de tiempo de contacto.

Comportamiento similar al observado en la Tabla 3.16 se reportó previamente por Michalska *et al*. (2015), y por Liang *et al.* (2014), quienes estudiaron respectivamente la remoción de la lignina mediante hidrólisis alcalina de la especie *Sida acuta* durante 30 minutos con NaOH 5 %p a 121 ºC y de la paja de arroz con $Ca(OH)_2$ durante 5

días a temperatura ambiente. Al término del tratamiento los porcentajes de lignina y de celulosa incrementaron, mientras que el contenido de hemicelulosa fue cercano a cero.

La Figura 3.32 muestra los espectros FTIR del TH sin hidrolizar e hidrolizado con NaOH al 1 %p y 2 %p durante 60 minutos. Las bandas características de la hemicelulosa (1740 cm^{-1} y 1240 cm^{-1}) desaparecieron después del tratamiento alcalino con 2 %p NaOH, mientras que las bandas de vibración de la lignina ubicadas en 1590, 1510 y 1423 cm^{-1} incrementaron ligeramente su intensidad. Este comportamiento va acorde con los porcentajes de lignina mostrados en la Tabla 3.16 y corrobora el incremento de la fracción másica de la lignina a causa de la remoción parcial de la hemicelulosa. La banda de vibración observada a 1370 cm^{-1} corresponde al enlace C-H de la celulosa, hemicelulosa y lignina. Dicha banda disminuyó su intensidad en función de la concentración del álcali. Las bandas características de la celulosa se hicieron más definidas en el espectro de la muestra de TH tratada con 2 %p NaOH, lo cual sugiere una ligera disminución en el contenido de celulosa.

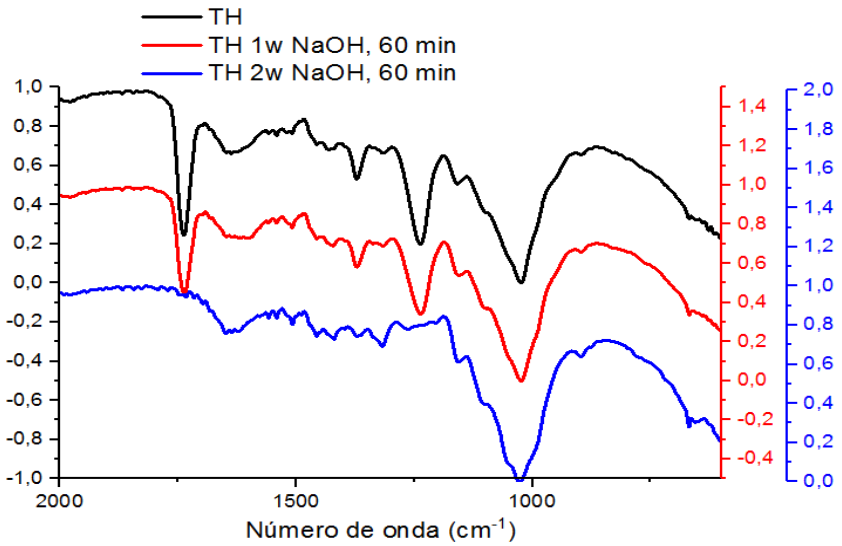


Figura 3.32. Espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después de 60 minutos de tratamiento con NaOH al 1 %p y 2 %p

La Figura 3.33 muestra los espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después del tratamiento con 3 %p NaOH durante 60 y 120 minutos. Los espectros del TH hidrolizado resultaron muy similares entre sí, ya que en ambos casos no se observó la presencia de las bandas características de la hemicelulosa. Los datos mostrados en la Tabla 3.16 y los espectros de FTIR, sugieren que la remoción de la lignina en el TH puede incrementarse al aumentar el tiempo de contacto y la concentración de NaOH, sin embargo, el tratamiento alcalino además de eliminar a la lignina remueve una gran cantidad de hemicelulosa, reduciendo así la cantidad de azúcares disponibles. La Figura 3.34 muestra los espectros FTIR del RM antes y después del tratamiento con NaOH 3 %p durante 60 y 120 minutos. Las bandas propias de la hemicelulosa se observaron al término del tratamiento, mientras que las vibraciones correspondientes al anillo aromático de la lignina (1590 y en 1510 cm^{-1}) no fueron detectadas. La banda situada a 1435 cm^{-1} característica de los enlaces C-H de la parte alifática de la lignina permaneció intacta durante el tratamiento. El TH y el RM mostraron un comportamiento distinto después del tratamiento alcalino, lo cual puede atribuirse principalmente a la naturaleza de los residuos agrícolas, así como al tipo de hemicelulosa y de lignina predominante.

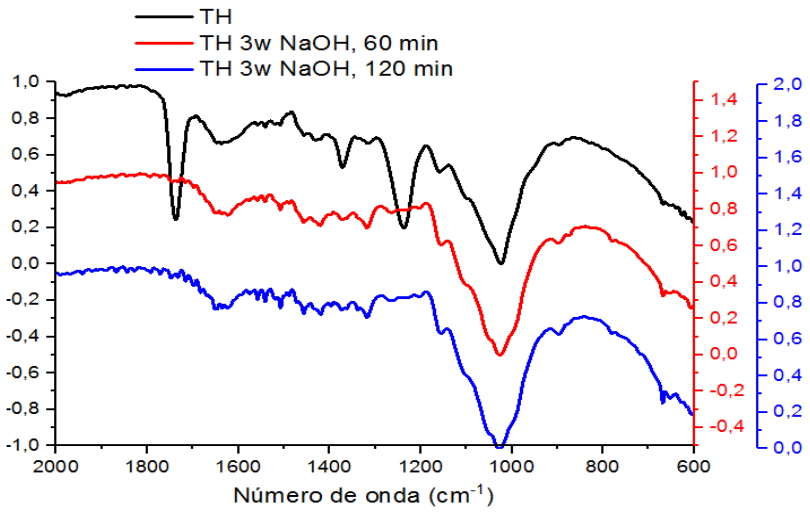


Figura 3.33. Espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después del tratamiento con NaOH al 3 %p durante 60 y 120 minutos

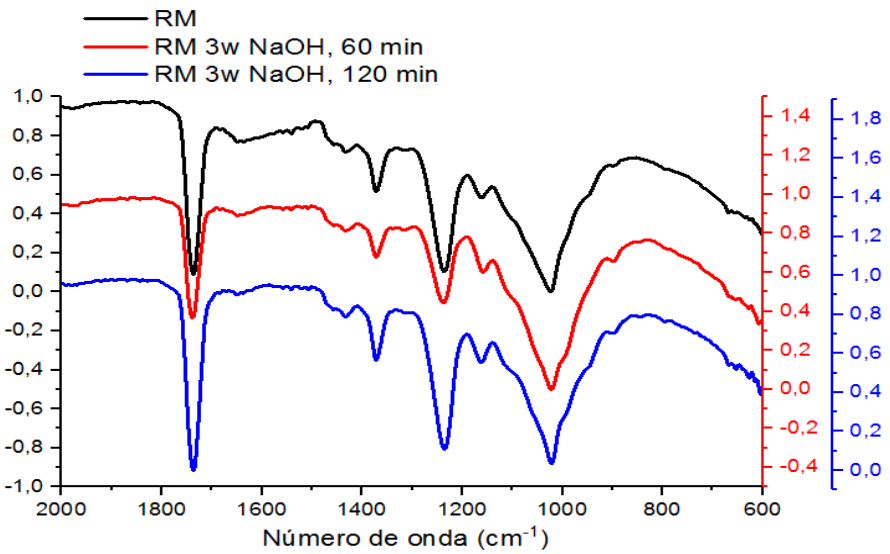


Figura 3.34. Espectros FTIR de las muestras de RM tomadas antes y después del tratamiento con NaOH al 3 %p durante 60 y 120 minutos

3.3.2 Hidrólisis ácida del tallo de haba y del rastrojo de maíz pretratado con NaOH

Debido a que tanto el TH como el RM mostraron la presencia de hemicelulosa después de 60 minutos de tratamiento con 1 %p NaOH, ambos materiales pretratados se utilizaron para evaluar la producción de azúcares reductores mediante hidrólisis con 0.96 M H_3PO_4 y 100 °C, se muestras sin tratar de ambos materiales para comparar la eficiencia en la producción de azúcares reductores.

Los mejores rendimientos de producción de azúcares se obtuvieron con el TH y RM sin tratamiento alcalino, alcanzando una producción de 15.12 g / 100 g de TH y de 27.42 g / 100 g de RM. La producción de azúcares disminuyó considerablemente al utilizar TH y RM previamente tratados con 1 %p NaOH, los rendimientos más altos obtenidos con dichos materiales fueron 8.92 g / 100 g de TH y 16.64 g / 100 g de RM (Figura 3.35). De acuerdo con Lee *et al.* (2015), este comportamiento es atribuido a la formación del *licor negro* que está compuesto principalmente por lignina soluble y hemicelulosa, lo cual hace que el sólido remanente de la hidrólisis alcalina tenga un menor contenido de carbohidratos disponibles para su transformación en azúcares reductores.

De entre ambos materiales, el TH mostró un menor potencial para la producción de azúcares reductores, hecho que puede asociarse con su naturaleza, composición, tipo lignina y estructura, la cual es mucho más rígida en comparación con la del RM. Además de que el tratamiento alcalino removió una mayor cantidad de hemicelulosa en el TH disminuyendo su contenido de carbohidratos.

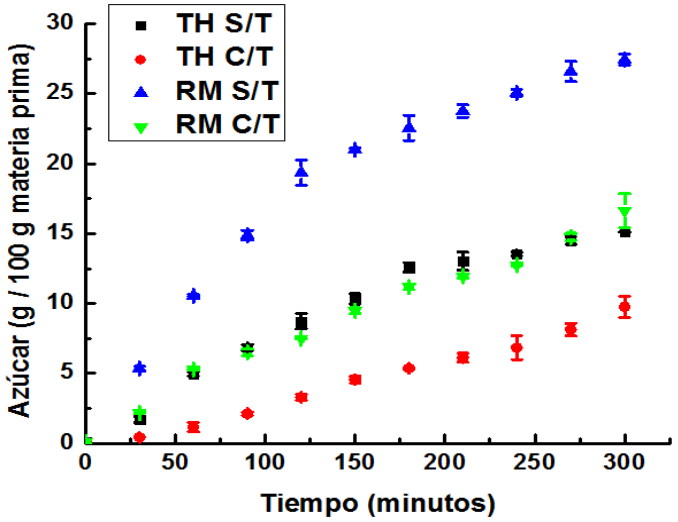


Figura 3.35. Producción de azúcares reductores mediante hidrólisis con 0.96 M H_3PO_4 y 100 °C a partir de TH y RM con y sin tratamiento alcalino previo

Los datos experimentales de la producción de azúcares mostrados en la Figura 3.31, se ajustaron al modelo cinético de Saeman utilizando un ajuste no lineal en el software Origin 8.6. Dichos ajustes se presentan en la Figura 3.36, mientras que los parámetros cinéticos y estadísticos se resumen en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17 Parámetros cinéticos y estadísticos de la producción de azúcares reductores a partir de TH y RM con y sin tratamiento alcalino

Sustrato	Azúcar (g / 100 g)	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	R^2	k_r	t_{opt} (min)
TH S/T	15.12	$1.50X10^{-3}$	$2.55X10-^{3}$	0.999	0.588	505.36
TH C/T	8.92	$5.25X10^{-4}$	$3.70X10^{-4}$	0.998	1.419	2257.39
RM S/T	27.42	$3.25X10^{-3}$	$2.34X10^{-3}$	0.999	1.389	360.99
RM C/T	16.64	$1.19X10^{-3}$	$1.86X10^{-3}$	0.992	0.640	666.60

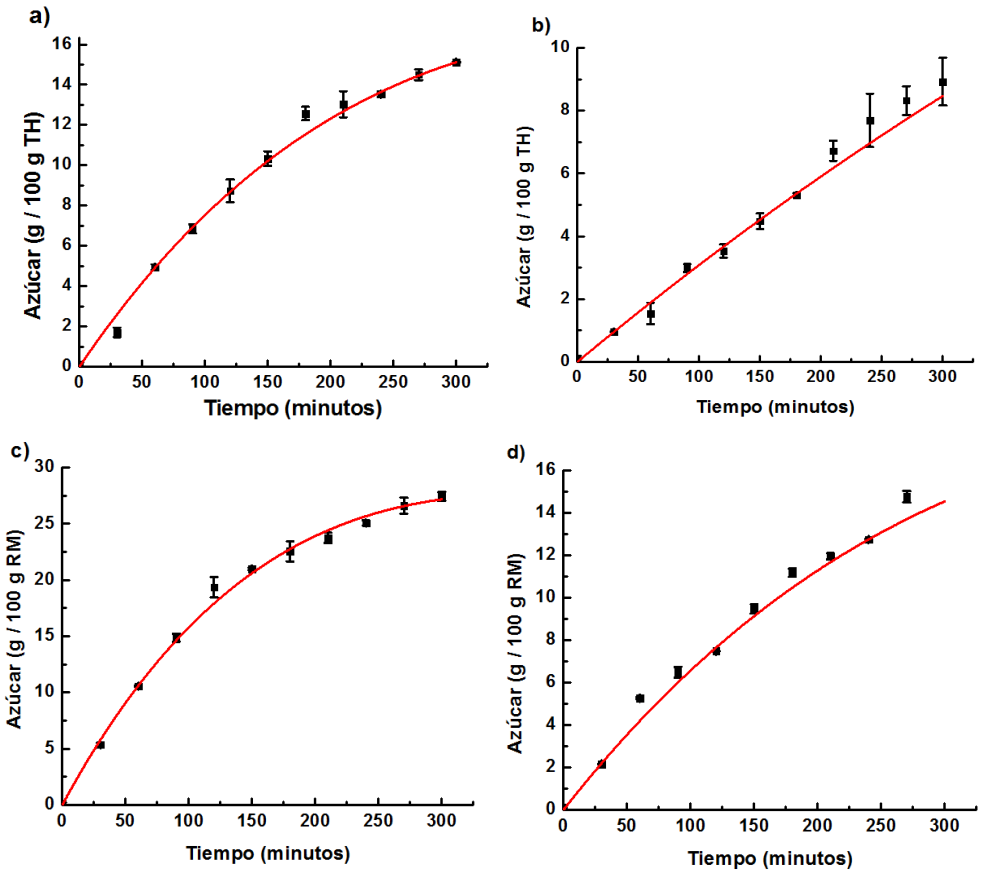


Figura 3.36. Datos experimentales de la producción de azúcares mediante hidrólisis con 0.96 M H_3PO_4 y 100 ºC de a) TH sin tratamiento alcalino, b) TH con tratamiento alcalino, c) RM sin tratamiento alcalino y d) RM con tratamiento alcalino ajustados al modelo cinético de Saeman

Las constantes cinéticas k_1 y k_2 determinadas para los experimentos con TH y RM sin tratamiento alcalino mostraron valores mayores en comparación con los pretratados con 1 %p NaOH. La constante cinética k_1 más alta fue de $3.25X10^{-3}$ min^{-1} determinada para el experimento con RM sin tratamiento, dicha constante está asociada a la mayor producción de azúcares reductores (27.42 g de azúcar / 100 g RM). Por otro lado, los valores más pequeños tanto de k_1 como de k_2 se observaron para el TH con tratamiento alcalino, experimento en el cual se alcanzó un máximo rendimiento de 8.92 g / 100 g TH y un tiempo óptimo de reacción de 2257.39 minutos. Los tiempos óptimos de reacción tuvieron el mismo comportamiento que las

constantes cinéticas, mostrando los tiempos mayores para los experimentos realizados con los residuos agrícolas previamente tratados con 1 %p NaOH.

3.4 Hidrólisis ácida del tallo de haba y de rastrojo de maíz

Debido a que el tratamiento alcalino tuvo un efecto negativo sobre la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis ácida del TH y RM pretratados, la producción de azúcares a partir de TH se llevó a cabo sin ningún tratamiento previo utilizando las condiciones de operación propuestas para el olote.

3.4.1 Producción de azúcares reductores

La máxima producción de azúcares reductores fue de 21.20 g de azúcar / 100 g TH, obtenido en el experimento con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C después de 270 minutos de tiempo de reacción, a estas condiciones el porcentaje de conversión de holocelulosa a sacárido fue de 29.19%. El experimento que mostró el porcentaje de conversión más bajo y la menor producción de azúcares se obtuvo con 0.58 M H_3PO_4, 90 °C y 300 minutos de reacción, la cantidad de azúcar producida fue de 5.22 g / 100 g de TH (Figura 3.37).

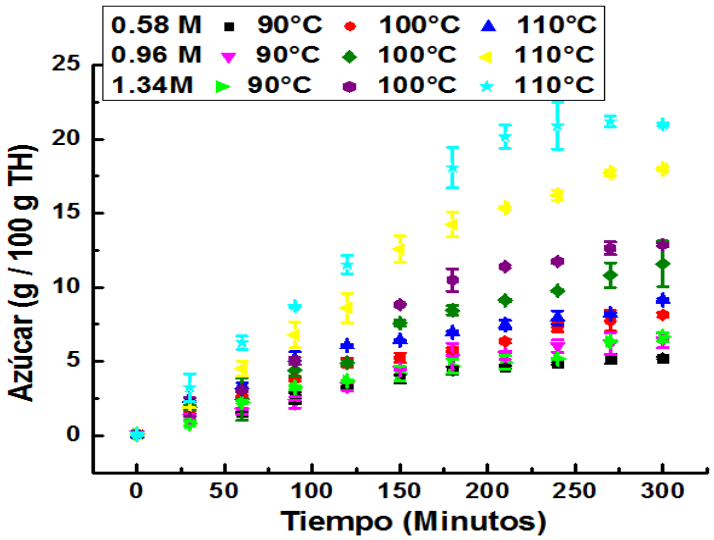


Figura 3.37. Producción de azúcares reductores por hidrólisis ácida del TH

Como se observa en la Figura 3.37, la hidrólisis ácida del TH mostró un comportamiento similar al observado con el olote, ya que un incremento tanto en la concentración del ácido como en la temperatura propició un aumento en la cantidad de azúcares reductores. Las hidrólisis realizadas a 90 °C incrementaron su rendimiento de producción de azúcares al aumentar la concentración del ácido (Figura 3.38 a), sin embargo, dicho incremento fue pequeño en comparación con el observado a 110 °C (Figura 3.38 b). A diferencia de los experimentos realizados con olote, la hidrólisis del TH con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C mostró una ligera descomposición de los azúcares después de los 270 minutos, este comportamiento sugiere que a dichas condiciones la velocidad de deshidratación resultó mayor a la de producción, por lo cual a fin de incrementar el rendimiento de producción de azúcares es necesario disminuir la temperatura de operación e incrementar tanto el tiempo de reacción como la concentración del ácido.

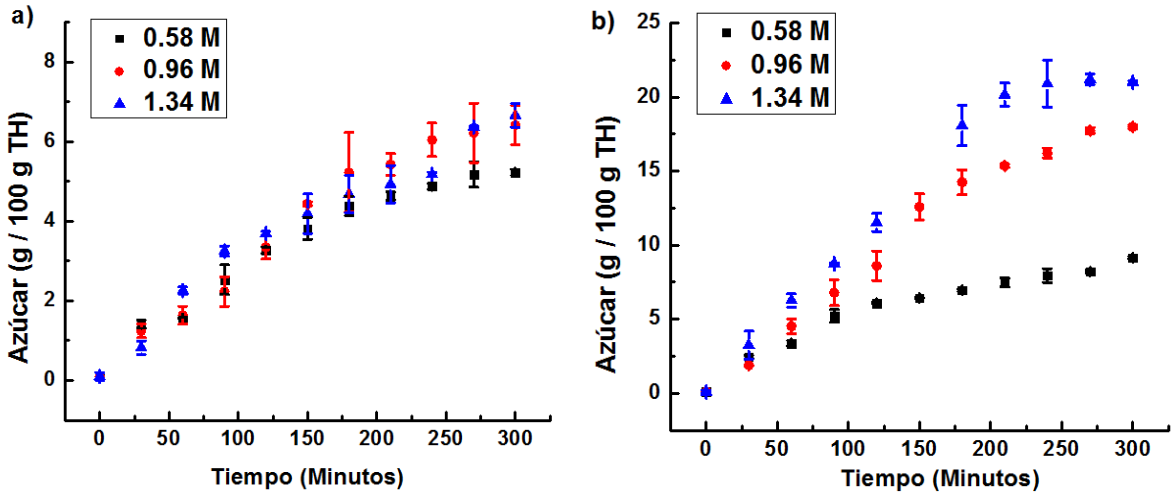


Figura 3.38. Efecto de la concentración del ácido fosfórico sobre la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis del TH a a) 90 ºC y b) 110 ºC

3.4.2 Parámetros cinéticos y termodinámicos de la hidrólisis ácida del tallo de haba

Los datos experimentales de la producción de azúcares reductores ajustados al modelo de Saeman se muestran en la Figura 3.39, mientras que los parámetros cinéticos y estadísticos se resumen en la Tabla 3.18.

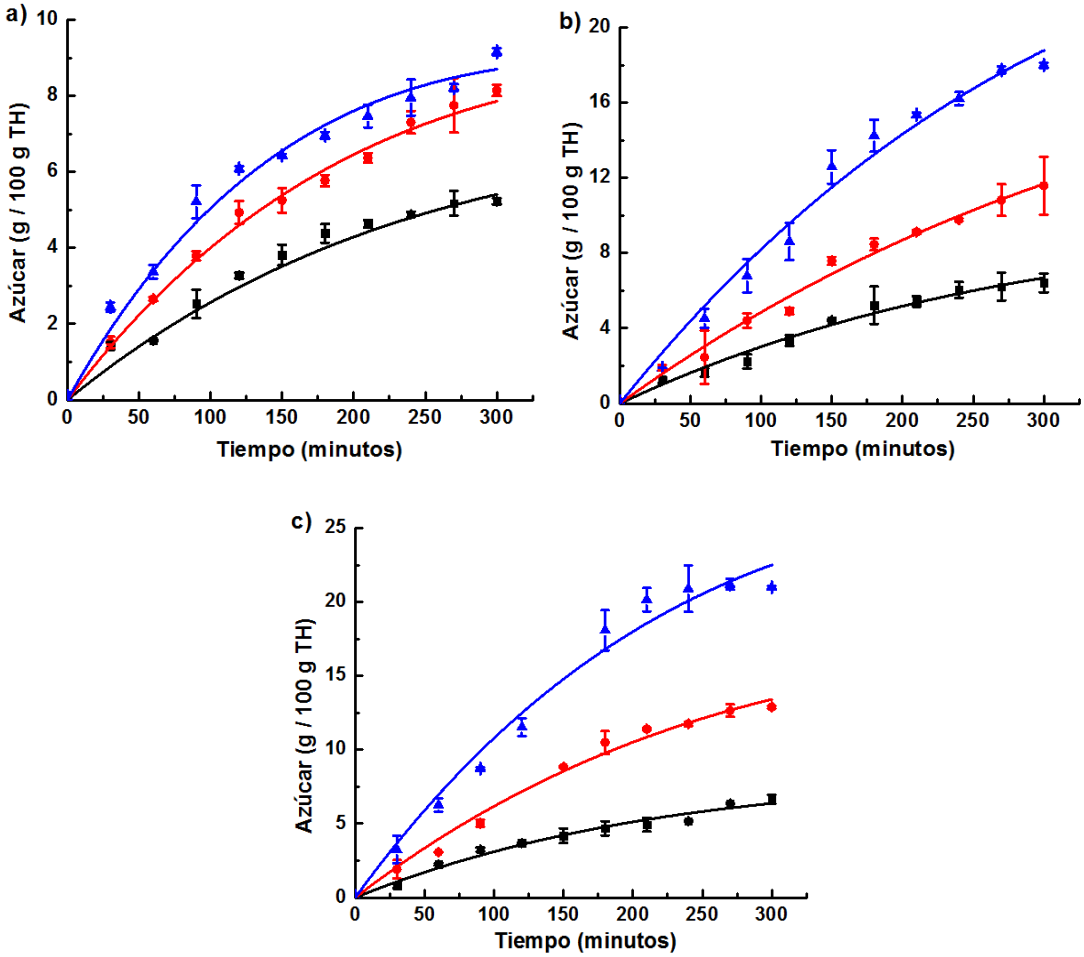


Figura 3.39. Datos experimentales de la producción de azúcares a partir de TH mediante hidrólisis con a) 0.58 M, b) 0.96 M y c) 1.34 M H_3PO_4 ajustados al modelo cinético de Saeman

Las constantes cinéticas obtenidas con el modelo de Saeman incrementaron su valor a medida que la temperatura aumentó, la constante k_1 más alta fue de $1.77X10^{-3}$ min^{-1} determinada en la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C, mientras que la constante k_1 más pequeña fue de $5.03X10^{-4}$ min^{-1}, correspondiente al experimento realizado con 0.58 M H_3PO_4 y 90 °C.

El factor K_r observado en la Tabla 3.18 se define como la relación numérica existente entre las constantes cinéticas k_1 y k_2, valores positivos menores a 1 significan que el valor de k_1 es menor que el de k_2, lo cual sugiere que a dichas condiciones de

operación la hidrólisis no resulta favorable para la producción de azúcares reductores, siendo la reacción de descomposición de los azúcares en furfural y en HMF la más favorecida.

Tabla 3.18 Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis ácida del TH determinados con el modelo de Saeman

Condiciones de hidrólisis	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	R^2	k_r
0.58 M y 90°C	$5.03X10^{-4}$	$3.29X10^{-3}$	0.983	0.153
0.58 M y 100°C	$8.13X10^{-4}$	$3.70X10^{-3}$	0.995	0.219
0.58 M y 110°C	$1.10X10^{-3}$	$4.91X10^{-3}$	0.981	0.224
0.96 M y 90°C	$5.43X10^{-4}$	$2.14X10^{-3}$	0.988	0.254
0.96 M y 100°C	$8.82X10^{-4}$	$1.33X10^{-3}$	0.987	0.663
0.96 M y 110°C	$1.38X10^{-3}$	$4.87X10^{-4}$	0.992	2.834
1.34 M y 90°C	$6.15X10^{-4}$	$3.46X10^{-3}$	0.988	0.178
1.34 M y 100°C	$9.85X10^{-4}$	$7.54X10^{-4}$	0.970	1.306
1.34 M y 110°C	$1.77X10^{-3}$	$4.15X10^{-4}$	0.991	4.265

Los valores pequeños de las constantes de velocidad k_1 están asociados al bajo rendimiento de producción de azúcares, ambos resultaron menores en comparación con los obtenidos con el olote, lo cual puede deberse principalmente a la naturaleza de la biomasa ya que el contenido de holocelulosa determinado en el TH fue menor que el del olote, además la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el contenido de lignina pudo afectar considerablemente la eficiencia. A fin de incrementar la producción de azúcares utilizando el TH como materia prima es necesario modificar las condiciones del proceso, aumentando el tiempo de contacto y disminuyendo la temperatura de reacción.

El valor de las constantes k_1 incrementó en función de la concentración del ácido, ajustándose adecuadamente a un modelo potencial para cada una de las temperaturas (Figura 3.40). Ésta tendencia fue observada anteriormente en el presente trabajo durante la hidrólisis del olote a las mismas condiciones de operación y también en algunos trabajos previos como los reportados por Guerra-Rodríguez *et al.* (2012) y Sarkar *et al.* (2013).

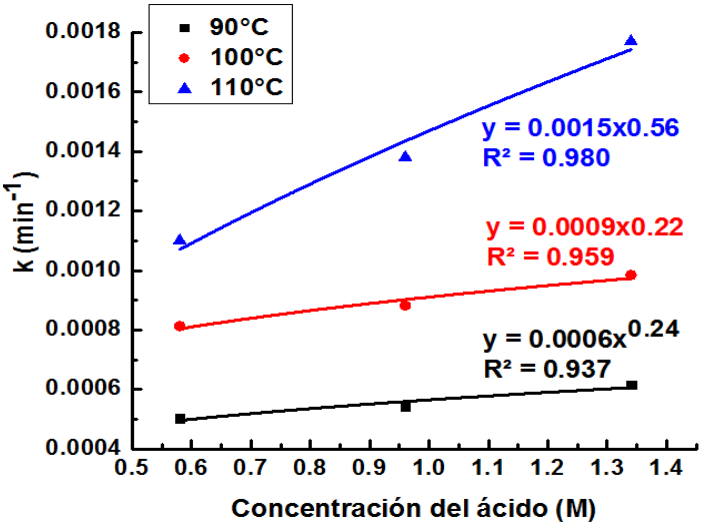


Figura 3.40. Efecto de la concentración del ácido sobre las constantes cinéticas de producción de azúcares calculadas con el modelo de Saeman

Los datos obtenidos con el modelo cinético de Saeman permiten calcular los parámetros de termodinámica tanto de la producción de azúcares (k_1) como de la descomposición de los mismos (k_2). Como se observa en la Figura 3.41 las constantes de velocidad k_1 obtenidas se ajustaron satisfactoriamente a las formas lineales de las ecuaciones de Arrhenius y de Eyring ($R^2 > 0.95$), permitiendo así el cálculo de los parámetros *Ea, A, ΔH* y *ΔS*.

Para cada una de las concentraciones del ácido el valor de la *Ea, ΔH* y *ΔG* fueron positivos, mientras que *ΔS* fue negativo, de acuerdo con la teoría del complejo activado, los valores positivos de *ΔH* y de *ΔG* están asociados respectivamente a reacciones endotérmicas y no espontáneas. En cambio valores negativos de *ΔS* son

atribuidos a una alta cantidad de energía en los reactivos previo a la formación del complejo ácido-agua-polisacárido que promueve la producción de azúcares, además la reacción fue favorable hacia la formación de los productos.

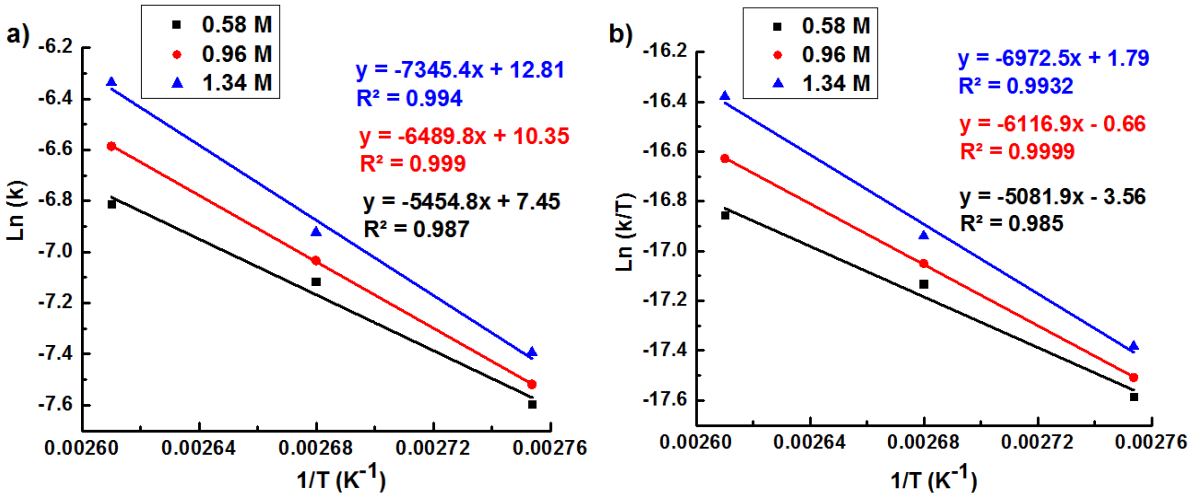


Figura 3.41. Constantes cinéticas k_1 obtenidas con el modelo de Saeman para la hidrólisis del TH ajustadas a las ecuaciones lineales de a) Arrhenius y de b) Eyring

Al igual que con el olote, la hidrólisis del TH resultó un proceso endotérmico y no espontáneo con la mayor cantidad de energía en el lado de los reactivos. Las *Ea* determinadas con las constantes k_1 para el TH fueron menores en comparación con las determinadas con el olote utilizando una concentración de ácido de 0.58 M y 0.96 M, este comportamiento sugiere que la energía necesaria para romper los enlaces β1-4 glucosídicos presentes en el TH es menor en comparación con la requerida en la hidrólisis del olote, sin embargo, los datos experimentales mostraron una baja producción de azúcares reductores que puede estar asociada a la rápida transformación de dicho azúcares en sus productos de descomposición.

Las entropías de activación (ΔS) determinadas para el TH fueron menores en comparación con las calculadas para el olote, por lo cual se infiere que los productos de la descomposición de los azúcares fueron termodinámicamente más estables durante la hidrólisis del TH. Los parámetros termodinámicos determinados para la producción de azúcares durante la hidrólisis del TH se resumen en la Tabla 3.19.

De acuerdo con la teoría de las colisiones moleculares, un incremento en la concentración de reactivos propicia un incremento en el número de colisiones y en consecuencia en el valor numérico del factor *A*. Éste comportamiento va acorde a lo observado experimentalmente durante la hidrólisis del TH, ya que como se aprecia en la Figura 3.42, el factor A incrementó de manera exponencial en función de la concentración del ácido.

Tabla 3.19 Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida del TH calculados con las constantes cinéticas del modelo de Saeman

H_3PO_4 (M)	Ea (KJ mol^{-1})	A (min^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)	K	ΔG (KJ mol^{-1})
0.58	45.35	$1.72X10^3$	42.25	-227.19	363.15	124.75
					373.15	127.03
					383.15	129.29
0.96	53.96	$3.14X10^4$	50.86	-203.05	363.15	120.60
					373.15	122.52
					383.15	124.44
1.34	61.07	$3.65X10^5$	57.97	-182.64	363.15	124.29
					373.15	126.12
					383.15	127.95

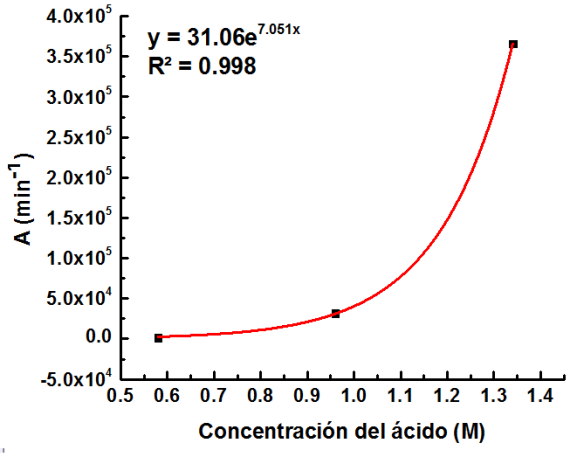


Figura 3.42. Comportamiento del factor *A* determinados en la hidrólisis del TH en función de la concentración del ácido

El comportamiento de A en función de la molaridad del ácido fosfórico fue similar al reportado por Ranganathan *et al.* (1985), quienes estudiaron la hidrólisis de la paja de trigo con ácido sulfúrico y Arslan *et al.,* 2012 observaron una tendencia parecida durante la hidrólisis de la cáscara de avellana con ácido sulfúrico diluido.

3.4.3 Caracterización del TH hidrolizado

Los espectros FTIR de las muestras de TH sin hidrolizar e hidrolizadas con 1.34 M H_3PO_4, 110 °C y después de 180 y 300 minutos de tiempo de reacción, se muestran en la Figura 3.43.

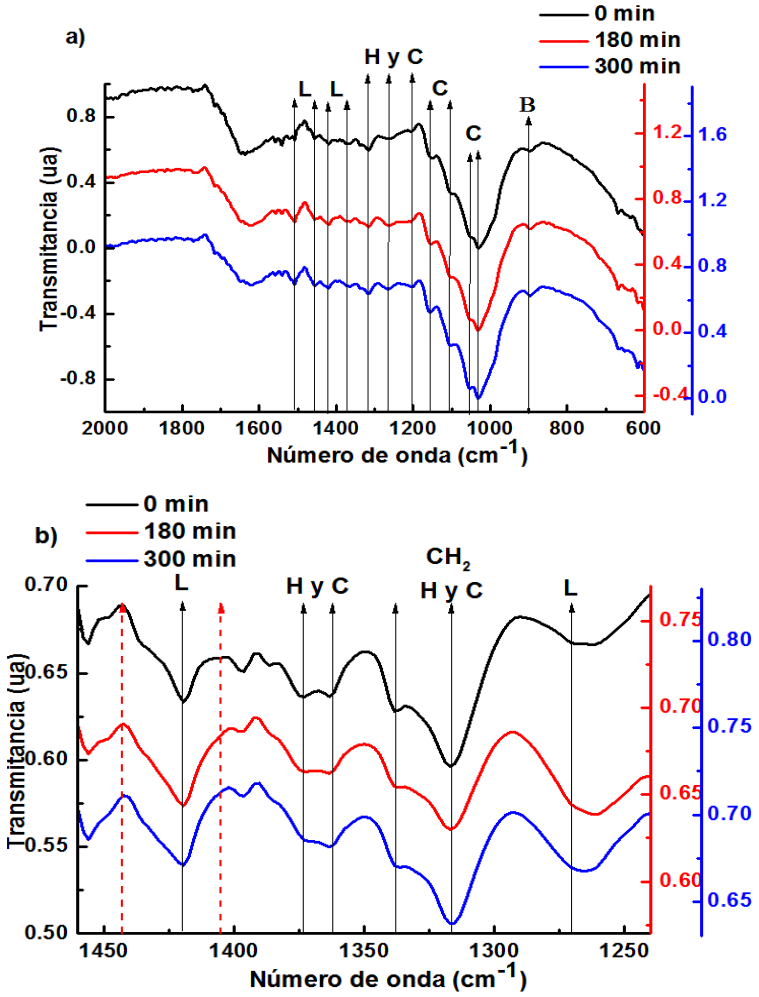


Figura 3.43. Espectros FTIR de las muestras de TH tomadas antes y después de 180 y 300 minutos de hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC, utilizando un rango espectral de a) 2000 a 600 cm^{-1} y de b) 1450 a 1250 cm^{-1}

En los espectros FTIR de la figua anterior, como en las del olote, las letras H, C y L corresponden a hemicelulosa, celulosa y lignina respectivamente, mientras que el símbolo β hace referencia al enlace β-glucosídico. Esta vibración se observó a un número de onda de 898 cm^{-1} en cada uno de los espectros (Sahoo *et al.,* 2018). En la figuras 3.43 las bandas características de la celulosa y de la lignina se observaron en las mismas regiones espectrales a las discutidas previamente en la sección 3.2.3.

Las vibraciones propias de la hemicelulosa se detectaron a los números de onda de 1240 y 1732 cm^{-1}, ésta última vibración no fue observada en ninguno de los espectros mostrados en la Figura 3.43´a), lo cual sugiere que el porcentaje de hemicelulosa presente en el TH fue bajo. La banda de vibración asociada al grupo metoxilo (CH_3-O) en 1423 cm^{-1} incrementó su amplitud después de la hidrólisis ácida (Figura 3.43 b), en cambio las vibraciones en 1366 y 1373 cm^{-1} atribuidas respectivamente a los enlaces C-H y O-H de la celulosa y de la hemicelulosa disminuyeron su intensidad al aumentar la producción de azúcares, comportamiento que sustenta la despolimerización de la celulosa y en menor proporción de la hemicelulosa.

La Figura 3.44 muestra los difractogramas del TH sin hidrolizar e hidrolizado con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC. En ambos espectros se observó la presencia de dos picos importantes situados a los ángulos 2Ɵ de 16° y 22°, los cuales se asocian respectivamente a la fracción amorfa y cristalina de la celulosa (Gaur *et al.,* 2016; Segal *et al.,* 1959). El pico localizado a 28° puede asociarse a la presencia de hemicelulosa, sin embargo, Li *et al.* (2016), reportaron que dicho pico puede atribuirse al SiO_2 presente en la fracción inorgánica del TH, la alta intensidad de dicho pico sugiere la presencia de un plano mono-cristalino del SiO_2.

La morfología del TH antes y después de la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C se analizó mediante MEB. La muestra de TH sin hidrolizar mostró partículas blanquecinas que pueden asociarse a la presencia de óxido de silicio, además se observó claramente uniformidad en las microfibrillas de carbohidratos las cuales

estaban enlazadas unas con otras de una forma homogénea y regular. La ruptura de las microfibrillas observada en la Figura 3.45 puede ser consecuencia de la trituración mecánica a la cual fue sometida la muestra de TH (Boontum *et al.,* 2019), además el ancho de las fibras de carbohidrato mostró una longitud menor a los 50 µm.

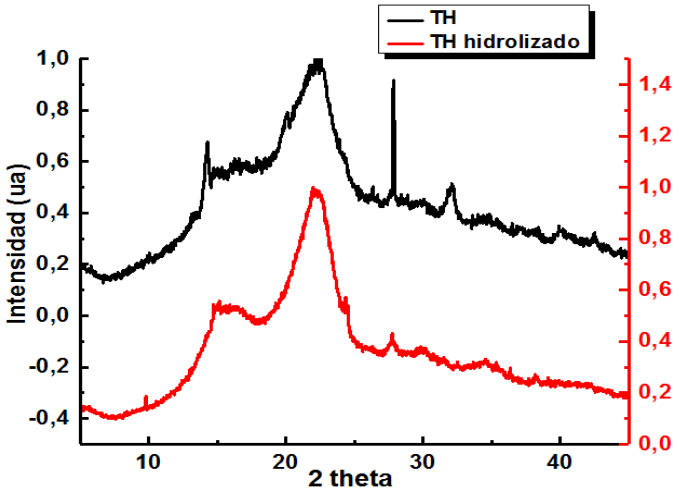


Figura 3.44. Espectros de difracción del TH antes y después de la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC

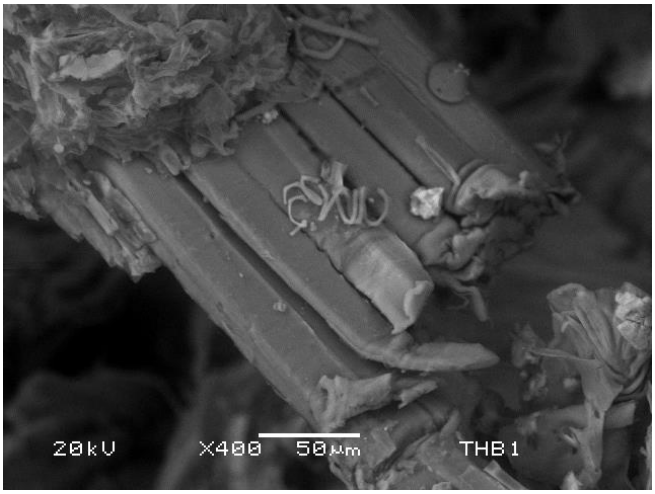


Figura 3.45. Micrografía del TH obtenida antes de la hidrólisis ácida

Después de 300 minutos de hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C las fibras de carbohidratos se fragmentaron (Figura 3.46), sin embargo, la morfología de las fibras se observó uniforme y menos rígida en comparación con la observada en el TH sin

tratamiento. La hidrólisis ácida promovió la ruptura de las fibras de carbohidratos presentes en el TH dejándolas más expuestas para su posterior transformación, este comportamiento sugiere que los azúcares producidos provinieron principalmente de las fibras de carbohidratos que no estaban entrelazadas entre sí, es decir de la fase amorfa de la celulosa, lo cual se asocia con el incremento en la intensidad de los picos observados en el espectro de difracción del TH hidrolizado. A fin de aprovechar al máximo el TH para la producción de azúcares reductores, una hidrólisis previa con ácido concentrado o un tratamiento enzimático posterior podría ser una alternativa prometedora (Jang & Choi, 2018).

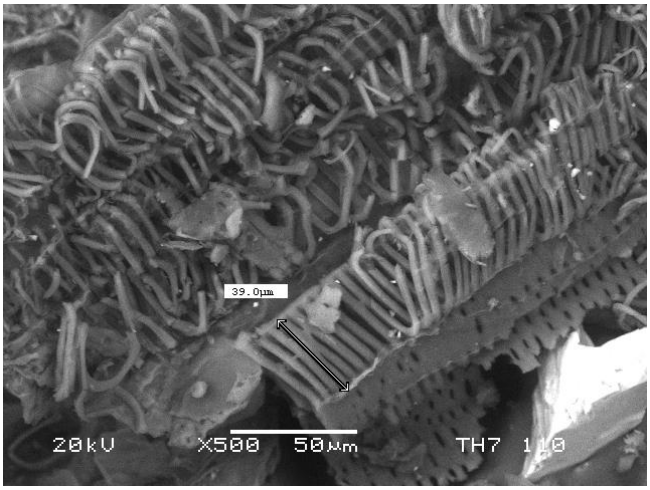


Figura 3.46. Micrografía del TH hidrolizado durante 300 minutos con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C

El porcentaje atómico de C, O y S determinado por EDS para las muestras de TH sin hidrolizar e hidrolizado con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C, mostraron valores muy similares entre sí, en cambio, el porcentaje de Na, Al y K disminuyó después del tratamiento ácido. De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 3.20, el Si duplicó su porcentaje atómico al término de la hidrólisis, hecho que se asocia a la solubilización de los compuestos orgánicos y de parte de los elementos mencionados, como el sodio y el potasio.

Tabla 3.20 Análisis elemental del TH antes y después de la hidrólisis con 1.34 M H_3PO_4, 110°C y 300 minutos

	TH sin hidrolizar		Residuo de TH hidrolizado	
Elemento	%	±	%	±
C	65.07	1.19	66.25	0.869
O	33.40	0.98	32.68	0.977
Na	0.16	0.048	0.049	0.007
Mg	0.14	0.008	0.187	0.052
Al	0.13	0.014	0.114	0.001
Si	0.12	0.051	0.235	0.015
S	0.13	0.009	0.157	0.029
K	0.59	0.287	0.009	0.006
Ca	0.26	0.055	0.314	0.029

3.5 Análisis cualitativo de los hidrolizados ácidos de olote y de TH

La identificación de los tipos de azúcares presentes en los hidrolizados de olote y de TH se realizó en colaboración con el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad Irapuato, mediante HAPLC utilizando un detector de índice de refracción y un tiempo de análisis promedio de 40 minutos.

El hidrolizado de olote obtenido después de 30 minutos de tiempo de reacción con una solución 0.58 M de ácido fosfórico y 90 °C mostró un alto contenido de glucosa (t_{ret}=6.25) y una baja concentración de trehalosa y arabinosa (t_{ret}=5.0 y t_{ret}=6.0) (Figura 3.47 a), mientras que el hidrolizado de olote en 1.34 M H_3PO_4, 110 °C y 300 minutos de tiempo de reacción mostró la aparición de un pico a un tiempo de retención de 6.50 minutos correspondiente a la xilosa, así como la disminución en la intensidad del pico asociado a la glucosa (Figura 3.47 b). Este comportamiento sugiere que la hidrólisis a estas condiciones de operación favorece la despolimerización de la fracción de hemicelulosa y al mismo tiempo la transformación de la glucosa en HMF, lo cual va acorde con el espectro UV-vis del hidrolizado de olote con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC mostrado en la figura 3.29 y con el análisis FTIR del olote hidrolizado.

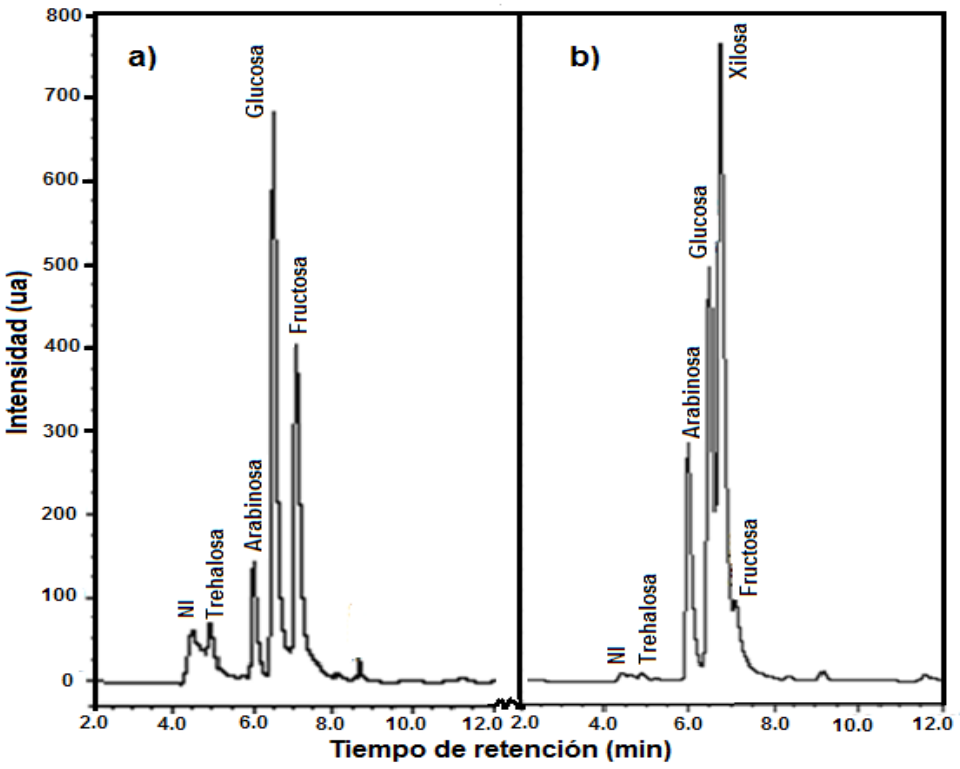


Figura 3.47. Cromatogramas de los hidrolizados de olote obtenidos con a) 0.58 M H_3PO_4, 90 °C y 30 minutos, y con b) 1.34 M H_3PO_4, 110 °C y 300 minutos

La Figura 3.48 muestra los cromatogramas de los hidrolizados de TH obtenidos en el experimento con 1.34 M ácido fosfórico y 110 °C después de 30 y 300 minutos de tiempo de reacción. El hidrolizado tomado a los 30 minutos mostró un alto contenido de trehalosa, arabinosa y glucosa, así como una baja concentración de xilosa. Caso contrario se observó después de 300 minutos, en donde los picos característicos de la trehalosa y de la arabinosa mostraron una intensidad muy baja en comparación con el pico de la glucosa. El azúcar que se generó en mayor cantidad durante la hidrólisis del olote fue la xilosa, mientras que la glucosa fue el azúcar mayormente producido a partir del TH. Este sugiere que el hidrolizado de TH obtenido después de 300 minutos es una fuente potencial para su uso en procesos biotecnológicos como en la producción de biohidrógeno, ya que el azúcar que es fácilmente metabolizado por los microorganismo hidrogénicos es la glucosa (Lukajtis *et al.,* 2018; Rosales-Colunga *et al.,* 2012).

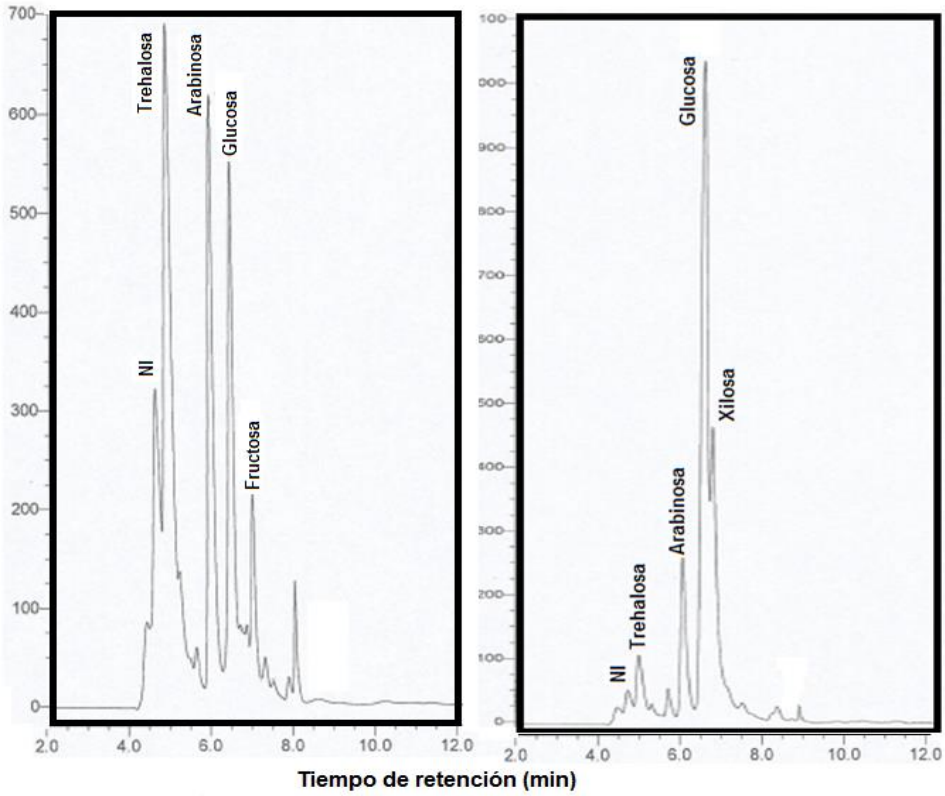


Figura 3.48. Cromatogramas de los hidrolizados de TH obtenidos con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C después de a) 30 y b) 300 minutos de tiempo de reacción

Los azucares identificados en cada uno de los cromatogramas de las Figuras 3.47 y 3.48 se muestran directamente en las figuras, hay más picos que no se pudieron identificar a bajos tiempos de retención, de ellos solo el pico en 5 min, corresponde a la trehalosa. La identificación de dichos picos se hizo con patrones que se corrieron y se compararon en el mismo cromatógrafo y con lo reportado anteriormente por Mellado-Mojica *et al.* (2016), quienes utilizaron la misma técnica cromatográfica para la determinación de azúcares en agave. La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas entre sí por un enlace α 1-1 glucosídico, es un azúcar sintetizado de manera natural por algunas bacterias, hongos y algas (Suárez *et al.,* 2015), sin embargo, también puede estar presente en los nódulos de las raíces de algunas leguminosas como el haba y la soja así como en la fracción soluble de la pared celular de la planta (Müller *et al.,* 1994).

La intensidad de los picos cromatográficos de la glucosa y de la xilosa se relacionaron con los correspondientes a la trehalosa (C) y a la arabinosa (D) para cada uno de los tiempos del experimento realizado con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC. La Figura 3.49 muestra que tanto para la glucosa como para la xilosa un incremento en el tiempo de reacción propició un aumento en la relación de los picos, es decir, a medida que el tiempo de reacción avanzó la concentración de glucosa y xilosa aumentó, mientras que la intensidad en los picos de la trehalosa y de la arabinosa disminuyó. La producción de glucosa durante la hidrólisis ácida del TH está relacionada directamente con la despolimerización de la trehalosa, la cual se monomeriza fácilmente al tener un enlace α de baja energía. El tiempo que mostró la mayor relación entre los picos para ambos azúcares fue 270 minutos, a tiempos posteriores dicha relación disminuyó y puede atribuirse a la descomposición de los azúcares a sus aldehídos correspondientes o a que la velocidad de producción de trehalosa y de arabinosa resultó mayor en ese punto que la velocidad de producción de xilosa y glucosa. Con base a las Figuras 3.48 y 3.49, la disminución en la cantidad de azúcares reductores observada en la Figura 3.37 se atribuye principalmente a la transformación de la glucosa en HMF.

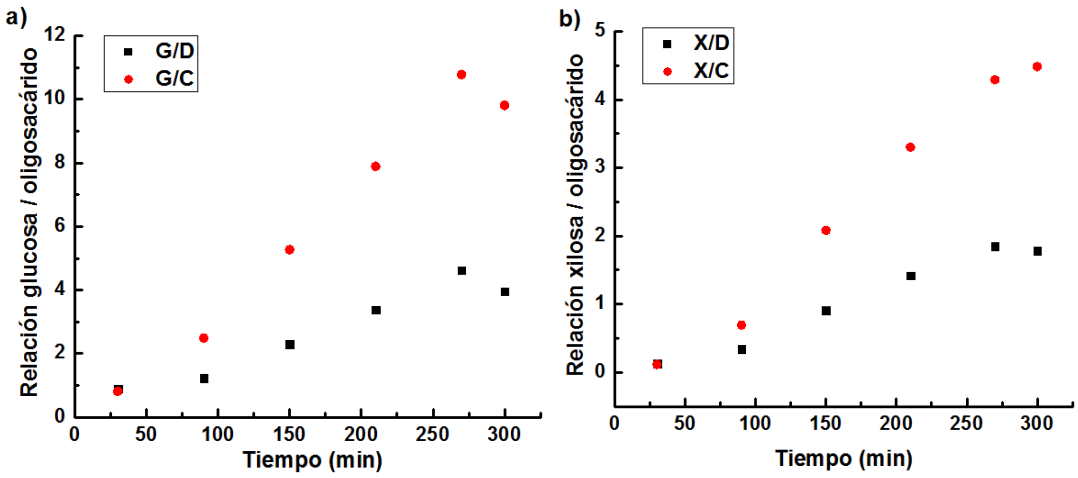


Figura 3.49. Relación entre las intensidades de los picos cromatográficos de la a) glucosa con trehalosa y arabinosa y de la b) xilosa con trehalosa y arabinosa

La Figura 3.50 muestra el cromatograma del hidrolizado de TH con ácido fosfórico 1.34 M, 110 °C después de 210 minutos de tiempo de reacción, en donde se aprecia que el azúcar mayormente formado fue la glucosa, que la trehalosa aún está presente en una buena cantidad y que la xilosa es mucho menor, sin embargo, no se logró hacer la determinación cuantitativa, pues faltó determinar las cantidades de cada uno de los azúcares utilizando un patrón conocido para cada uno de ellos. También es necesario modificar las condiciones con el fin de aumentar la separación de los picos, ya que la presencia de xilosa, arabinosa y trehalosa está muy próxima al pico característico de la glucosa y su cuantificación individual sería inexacta.

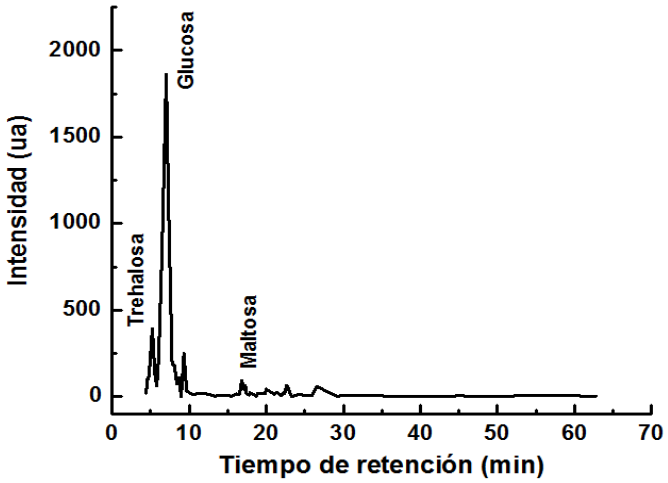


Figura 3.50. Cromatograma del hidrolizado de TH obtenido con 1.34 M H_3PO_4 y 110 °C después de 210 minutos de tiempo de reacción.

En los cromatogramas se observó una alta concentración de trehalosa en los primeros tiempos de cada uno de los experimentos, mientras que la concentración de glucosa aumentó al incrementar la temperatura, la concentración del ácido y el tiempo de reacción; alcanzando los valores más altos con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC. La presencia de arabinosa, fructosa y manosa se observó también en la mayoría de los cromatogramas de los hidrolizados de TH, en cambio la xilosa solo se empezó a formar en estas condiciones, después de los 240 min de reacción.

3.6 Hidrólisis ácida del RM a bajas temperaturas

El ácido clorhídrico ha sido reportado como una alternativa eficiente para la producción de azúcares monoméricos a partir de lignocelulosas, el cual puede recuperarse fácilmente al término del proceso mediante una destilación simple debido a su bajo punto de ebullición en comparación con el resto de los ácidos inorgánicos utilizados en los procesos de hidrólisis (Abd-Rahim *et al.,* 2014; Higgins & Ho, 1982), para reducir la concentración de aldehídos se hizo una hidrólisis del RM con 2.2 M HCl a bajas temperaturas, 60, 70 y 80 ºC. La máxima producción de azúcares con HCl fue de 18.16 g / 100 g RM, mientras que la concentración más alta de furfural fue de 0.52 g / 100 g RM, ambos obtenidos después de 120 minutos de hidrólisis a 80 ºC. Dichas concentraciones resultan favorables para la posterior etapa de fermentación, ya que la baja concentración de aldehídos no inhibe la actividad metabólica de los microorganismos productores de hidrógeno favoreciendo así los rendimientos de producción (Muñoz-Páez *et al.,* 2019). Los datos experimentales de la producción de azúcares se ajustaron a los modelos cinéticos de Saeman (Ec. 1.4), Saeman bifásico (Ec. 1.6) y de primer orden (Ec. 1.5), determinándose las constantes de velocidad y que se encuentran resumidas en las Tablas 3.21 y 3.22. Las constantes cinéticas determinas con el modelo de Saeman fueron similares a las constantes k_f y k_2 del modelo de Saeman bifásico, mostrando un incremento en sus valores al aumentar la temperatura de hidrólisis. La constante k_s no se ajustó al comportamiento sugerido por la ecuación de Arrhenius, ya que al aumentar la temperatura de reacción dicha constante no se incrementó, este comportamiento ha sido reportado en trabajos anteriores (Adeogun *et al.,* 2019; Arslan *et al.,* 2012).

Tabla 3.21. Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis de RM en HCl a bajas temperaturas determinados con el modelo de Saeman

Temp. (°C)	k_1 (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	R^2	Azu_{max} (g / 100g)	t_{opt} (min)
60	2.05×10^{-3}	8.63×10^{-3}	0.999	9.74	218.45
70	3.79×10^{-3}	8.95×10^{-3}	0.996	14.46	166.53
80	5.12×10^{-3}	9.58×10^{-3}	0.993	16.71	140.48

Tabla 3.22. Parámetros cinéticos y estadísticos de la hidrólisis de RM en HCl a bajas temperaturas determinados con los modelos de Saeman bifásico y de primer orden

	Saeman bifásico				Primer orden	
Temp. (°C)	k_f (min^{-1})	k_s (min^{-1})	k_2 (min^{-1})	R^2	k (min^{-1})	R^2
60	2.05×10^{-3}	2.05×10^{-3}	8.63×10^{-3}	0.999	1.29×10^{-3}	0.942
70	3.79×10^{-3}	3.79×10^{-3}	8.95×10^{-3}	0.996	2.50×10^{-3}	0.964
80	6.29×10^{-3}	2.95×10^{-3}	9.28×10^{-3}	0.992	3.36×10^{-3}	0.983

A partir de las constantes cinéticas calculadas con cada uno de los modelos matemáticos, se determinaron los parámetros termodinámicos de la reacción de hidrólisis de RM con HCl (Tabla 3.23).

Tabla 3.23. Parámetros termodinámicos calculados para la hidrólisis de RM en HCl a bajas temperaturas de operación

	AE (kJ mol^{-1})	A (min^{-1})	R^2	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1} K^{-1})	R^2	G_{av} (kJ mol^{-1})
Producción de azúcares							
Primer orden (k)	46.98	3.17×10^{4}	0.960	44.13	-202.28	0.955	113.54
Saeman (k_1)	44.90	2.35×10^{4}	0.969	42.05	-204.74	0.964	112.31
Saeman bifásico (k_f)	54.87	8.31×10^{5}	0.998	52.02	-175.11	0.998	112.11
Descomposición de azúcares							
Primer orden (k)	4.03	1.42×10^{-1}	0.991	1.18	-304.67	0.917	105.73
Saeman (k_2)	5.09	5.39×10^{-2}	0.964	2.24	-312.72	0.845	109.55
Saeman bifásico (k_2)	3.55	3.10×10^{-2}	0.999	0.69	-317.31	0.998	109.58

Al igual que la hidrólisis de olote y de TH con ácido fosfórico, la hidrólisis del RM con ácido clorhídrico resultó un proceso endotérmico y no espontáneo. Desde el punto de vista termodinámico, la reacción favorecida es la descomposición de los azúcares en sus aldehídos correspondientes, ya que la Ea para k_2 fue mucho menor que la obtenida con k_1. La entropía de activación (ΔS) para la reacción de descomposición fue menor en comparación con la de la reacción de producción de azúcares, haciendo evidente que el producto más estable es el furfural y que el complejo ácido-holocelulosa tiene un nivel energético bajo.

3.7 Rendimientos de la producción de azúcares y parámetros termodinámicos reportados en la literatura

La Tabla 3.24 muestra un comparativo de los rendimientos más altos obtenidos en el presente trabajo con algunos de los valores citados en literatura.

Tabla 3.24 Rendimientos citados para la producción de azúcares

Materia prima	Condiciones de operación	Rendimiento (g / 100 g)	Referencia
Olote	Hidrólisis ácida: 1.34 M H_3PO_4, 110 °C, 5 horas, relación 1:15 entre sólido y líquido.	54.31	Presente trabajo
Olote	Hidrólisis ácida: 0.96 M H_3PO_4, 110 °C, 5 horas, relación 1:15 entre sólido y líquido.	51.26	Presente trabajo
TH	Hidrólisis ácida: 1.34 M H_3PO_4, 110 °C, 5 horas, relación 1:15 entre sólido y líquido.	21.20	Presente trabajo
Cáscara de papa	1.12 M H_3PO_4, 135 °C, 8 minutos, 130 bar.	55.5	Lenihan *et al.,* 2010
Paja de trigo	H_2SO_4, 130 °C, 180 minutos, relación 1:12 entre sólido y líquido.	26.8	Guerra Rodríguez *et al.,* 2012
Residuos del cultivo de hongo	50 mM H_2SO_4, 150 °C, 80 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	25	Na & Lee, 2015
Bagazo de caña de azúcar	H_2SO_4, 110 °C, 120 minutos, relación 1:30 entre sólido y líquido.	39.15	Tizazu & Moholkar, 2018

Tabla 3.24Rendimientos citados para la producción de azúcares (Continuación)

Materia prima	Condiciones de operación	Rendimiento (g / 100 g)	Referencia
Cáscara de yuca	0.3 M HCl 120 °C, 60 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	18.4	Adeogun *et al.,* 2018
Achyranthes aspera	Hidrólisis ácida: 15.35 M H_3PO_4, 60 °C, 60 minutos, relación 1:8 entre sólido y líquido.	82.6	Siripong *et al.,* 2016
Sida acuta	Hidrólisis enzimática: 50°C, 120 rpm, 72 horas.	74.2	
Tallo de girasol	Hidrólisis ácida: 0.13 M H_2SO_4, 167 °C, 5 minutos, relación 1:5 entre sólido y líquido.	32.8	Ruiz *et al.,* 2013
	Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72		
Olote	Hidrólisis ácida: 0.21 M H_2SO_4, 121 °C, 60 minutos, relación 1:5 entre sólido y líquido.	53.7	Li *et al.,* 2016
	Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72 h		
Tallo de algodón	Hidrólisis ácida: 1.07 % H_2SO_4, 157 °C, 20 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	68.4	Gaur *et al.,* 2016
	Hidrólisis enzimática: 50°C, 120 rpm, 48 h		
Pasto de arroz silvestre	Hidrólisis ácida: 2 % H_2SO_4, 121 °C, 60 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	45.7	Sahoo *et al.,* 2018
	Hidrólisis enzimática: 50°C, 120 rpm, 48 h		

El máximo rendimiento de producción de azúcares obtenido en el presente trabajo, 54.31 g azúcares / 100 g olote, resultó mayor en comparación con lo reportado por Ruiz *et al.* (2013), López-Linares *et al.* (2013) y Vasconcelos *et al.* (2013), quienes alcanzaron rendimientos de 32.8, 43.4 y 36.7 g azúcar / 100 g sustrato trabajando

con tallo de girasol, rastrojo de colza y bagazo de caña de azúcar respectivamente. Sin embargo, el rendimiento fue menor a lo reportado por Siripong *et al*. (2016) y por Gaur *et al.* (2016), quienes estudiaron respectivamente la hidrólisis enzimática de la especie *Sida acuta* y del tallo de algodón.

Los azúcares obtenidos durante la hidrólisis ácida pueden ser utilizados por los microorganismos para la producción de biocombustibles. Pérez-Cadena *et al.* (2018), estudiaron la producción de bioetanol a partir de los hidrolizados ácidos de la especie *Opuntia ficus indica*, concluyendo que las hexosas presentes en el licor hidrolizado son una fuente de carbono viable para el desarrollo de los microorganismos *C. intermedia* y *S. paradoxus*. Otro biocombustible que ha sido estudiado en los últimos años es el biohidrógeno, el cual es producido principalmente por bacterias del género *Clostridium*, dichas bacterias además de tener una alta capacidad para producir hidrógeno, son tolerantes al furfural en concentraciones menores a 1000 mg / L (Haroun *et al.,* 2016; Muñoz-Páez *et al.,* 2019). La producción máxima de furfural obtenida en el presente trabajo fue de 1.01 g por cada 100 g de olote, valor que equivale a una concentración de 673 mg / L, lo que sugiere que los azúcares obtenidos a partir de la hidrólisis con ácido fosfórico diluido del olote pueden utilizarse para la producción de biohidrógeno de una manera viable utilizando bacterias del género *Clostridium*.

Con respecto al cálculo de los parámetros termodinámicos, la Tabla 3.25 muestra un comparativo entre los valores obtenidos en el presente proyecto con los citados en la literatura. Dicha Tabla se compone de dos apartados, el primero de ellos correspondiente a los valores determinados para la producción de azúcares (k_1), mientras que el segundo hace referencia a los parámetros obtenidos a partir de k_2.

Es necesario mencionar que el estudio de dichos parámetros utilizando H_3PO_4 no ha sido reportado hasta el momento, razón por la cual un comparativo directo no es posible; además éste hecho hace evidente la necesidad de profundizar en el estudio de los parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de la hidrólisis de diferentes materiales lignocelulósicos utilizando H_3PO_4.

Tanto los rendimientos de producción de azúcares como los parámetros cinéticos y termodinámicos de la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos varían mucho en función del tipo de biomasa, tipo y concentración del ácido, rango de temperaturas, presión del sistema, relación biomasa-solución ácida, tamaño de partícula, entre otros. Sin embargo, pese a esta amplia gama de variables, diversos estudios han concluido que el utilizar temperaturas de reacción bajas disminuye la deshidratación de los azúcares lo cual resulta benéfico para la subsecuente etapa de fermentación (Avci[a] *et al.,* 2013; Cieciura-Wloch *et al.,* 2019). A fin de controlar la presión, el pH y la agitación dentro del sistema se propuso el diseño y la construcción de un reactor de tipo tanque agitado con un volumen total de 1.5 L y un volumen de trabajo de 1 L, el cual pueda utilizarse para estudiar en profundidad la hidrólisis ácida de lignocelulosas. El diseño geométrico del reactor así como los diagramas se detallan en el Anexo D.

Tabla 3.25 Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos reportados en la literatura

Para k_1									
Materia prima	Condiciones de hidrólisis	Modelo cinético	Azúcar estudiado	E_a (KJ mol^{-1})	A (min $^{-1}$)	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS (KJ$mol^{-1}K^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})	Referencia
Olote	0.77–1.34M H_3PO_4, 90-110°C.	Saeman	Azúcares reductores	56.58	$1.26X10^6$	53.48	-185.22	122.59	Presente trabajo
TH	0.58 y 1.34M H_3PO_4, 90-110°C.	Saeman	Azúcares reductores	51.59 96.01	$7.9X10^3$ $3.21X10^{10}$	48.49 98.62	-208.69 -73.18	126.36 125.93	Presente trabajo
Olote	0.1-0.3M H_2SO_4, 98-130ºC	Hidrólisis rápida y lenta	Xilosa	80.34	$1.49X10^{10}$	-		-	Eken *et al.,* 1998
Rastrojo de maíz	0.2 M ácido maleico, 150-170ºC	Saeman	Xilosa	83.30	$2.37X10^{10}$	-	-	-	Lu *et al.,* 2008
Cáscara de avellana	0.5M H_2SO_4, 100-120ºC	Saeman	Azúcares reductores	52.74	$5.36X10^5$	-	-	-	Arslan *et al.,* 2012
Rastrojo de maíz	0.15M H_2SO_4, 110-130ºC	Modelo bifásico	Xilosa	83.24	$1.40X10^7$	-	-	-	Chen *et al.,* 2015
Parthenium hysterophorus	5% H_2SO_4, 150-210ºC	Saeman	Xilosa	16.31	-	12.79	-0.373	163.19	Swati *et al.,* 2013
Bagazo de caña	0.38M H_2SO_4 100-130ºC	Hidrólisis rápida y lenta	Xilosa	60.33 - 61.14	$1.95X10^7$ – $2.63X10^6$	57	-1.06	469	Tizazu & Moholkar, 2018

Tabla 3.25 Parámetros termodinámicos de la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos reportados en la literatura (Continuación)

Para k_2									
Materia prima	Condiciones de hidrólisis	Modelo cinético	Azúcar estudiado	E_a (KJ mol^{-1})	A (min^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($KJmol^{-1}K^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})	Referencia
Olote	0.77–1.34M H_3PO_4, 90-110°C.	Saeman	Azúcares reductores	78.39 – 114.99	$1.18X10^8$ – $1.38X10^{12}$	75.30 – 111.89	-134.58 -56.72	125.52 – 133.05	Presente trabajo
TH	0.58 y 1.34M H_3PO_4, 90-110°C.	Saeman	Azúcares reductores	31.23 78.98	$1.46X10^2$ $1.21X10^8$	31.56 49.37	-238.46 -203.04	120.54 125.13	Presente trabajo
Olote	0.1-0.3M H_2SO_4, 98-130ºC	Hidrólisis rápida y lenta	Xilosa	133.70	$6.34X10^{14}$	-	-	-	Eken *et al.,* 1998
Rastrojo de maíz	0.2 M ácido maleico, 150-170ºC	Saeman	Xilosa	143.50	$2.18X10^{15}$	-	-	-	Lu *et al.,* 2008
Cáscara de avellana	0.5M H_2SO_4, 100-120ºC	Saeman	Azúcares reductores	46.58	$2.9X10^4$	-	-	-	Arslan *et al.,* 2012
Rastrojo de maíz	0.15M H_2SO_4, 110-130ºC	Modelo bifásico	Xilosa	159.60	$9.17X10^{13}$	-	-	-	Chen *et al.,* 2015
Parthenium hysterophorus	5% H_2SO_4, 150-210ºC	Saeman	Xilosa	-	-	-	-	-	Swati *et al.,* 2013
Bagazo de caña	0.38M H_2SO_4 100-130ºC	Hidrólisis rápida y lenta	Xilosa	83.40	$2.21X10^8$	80.1	-103	478	Tizazu & Moholkar, 2018

3.8 Producción de biohidrógeno mediante fermentación

En este apartado se describe y se discute la producción de biohidrógeno utilizando los hidrolizados ácidos como fuente de carbono para la fermentación mesofílica realizada con las bacterias *C. butyricum* y *E. cloacae*.

3.8.1 Resiembra de los microorganismos

Los microorganismos resembrados en medio de tioglicolato con resarzurina se observaron en microscopía óptica para ver la viabilidad de las células y aleatoriamente se seleccionaron 3 viales de cada cepa para cuantificar su producción de biohidrógeno y determinar su concentración con ayuda de la curva de calibración mostrada en el Anexo C. La Tabla 3.26 muestra la producción de biohidrógeno de los cultivos mesofílicos sembrados en medio de tioglicolato incubados durante 20 horas.

Tabla 3.26 Producción de biohidrógeno de los diferentes cultivos sembrados en medio de tioglicolato con resarzurina

Microorganismo	Concentración (%v)
C. butyricum	30.48 ± 0.52
E. cloacae	14.37 ± 0.34
C. bifermentans	23.45 ± 0.21
C. sordellis	ND

ND: No Detectado

La bacteria *C. butyricum* mostró la generación de biohidrógeno más alta alcanzando una concentración de 30.48 ± 0.52 %v, seguida de la bacteria *C. bifermentans* la cual mostró un porcentaje de 23.44 ± 0.21 %v y de *E. cloacae* que tan sólo alcanzó un valor de 14.37 ± 0.34 %v. El hidrógeno no se logró detectar en ningún vial sembrado con la bacteria *C. sordelli.* Cada una de las cepas mencionadas mostró la generación de CO_2 como metabolito secundario. El propósito de evaluar la generación de biohidrógeno a partir de las bacterias *C. bifermentans* y *C. sordelli* es que ambas pudieran ser utilizadas como alternativas en reactores bioelectroquímicos para la producción simultánea de biohidrógeno y de energía eléctrica. Serment-Guerrero *et al. (*2017) aislaron y evaluaron el potencial de la bacteria *Clostridium bifermentans*

para generar voltaje en una celda combustible utilizando medios sintéticos, mientras que Wong *et al.* (2018), estudiaron la generación de biohidrógeno con la bacteria *C. bifermentans* a partir de agar, en ambos casos la bacteria *C. bifermentans* mostró una alta eficiencia para la generación de energía sustentable lo cual abre un área de oportunidad prometedora para futuras investigaciones.

3.8.2 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de olote

Debido a que el experimento realizado con 1.34 M H_3PO_4, 110 ºC y 300 minutos de tiempo de contacto mostró la mayor producción de azúcares reductores a partir del olote, dichas condiciones se escalaron en un frasco GL55 de 500 mL mezclando 15 g de olote con 225 mL de solución ácida. La concentración de azúcares obtenida en este experimento fue de 33.46 g/L, valor equivalente a un rendimiento de 50.19 g / 100 g de olote, el cuál fue similar al obtenido previamente en los viales de 20 mL (54.31 g / 100 g olote).

Estos experimentos se llevaron a cabo dentro de viales de 20 mL mezclando 8.5 mL de medio de cultivo con 1.5 ml de hidrolizado tal y como se describió en el apartado 2.5 a). La presencia de hidrógeno se observó a partir de las 12 horas de incubación, sin embargo, la concentración de dicho gas fue tan pequeña que no se logró cuantificar. El CO_2 se observó desde las 6 horas de incubación hasta el término del experimento. El pH inicial de la solución fue de 6.4, el cual disminuyó en función del tiempo hasta estabilizarse en 5.95 después de las 12 horas. Por otro lado, el crecimiento microbiano comenzó a partir de las 2 horas y alcanzó la saturación en el medio después de las 12 horas (Figura 3.51), lo cual está relacionado con la estabilidad en el valor de pH, sugiriendo una falta de actividad metabólica. Este comportamiento puede atribuirse a la cantidad de azúcares presentes en el medio, a la posible presencia de trazas de oxígeno en los viales o a una posible desviación de la ruta metabólica de los microorganismos que inhibió la producción de biohidrógeno.

El crecimiento bacteriano incrementó de forma exponencial en función del tiempo de incubación, con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos de dicho

crecimiento los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz modificado. Como se observa en la Figura 3.52, los microorganismos se adaptaron rápidamente al medio mostrando un tiempo de latencia de 0.13 horas, un crecimiento máximo esperado de 2.42 células / mL y una velocidad máxima de crecimiento de 1.21 células mL^{-1} h^{-1} con un coeficiente de correlación R^2 de 0.986.

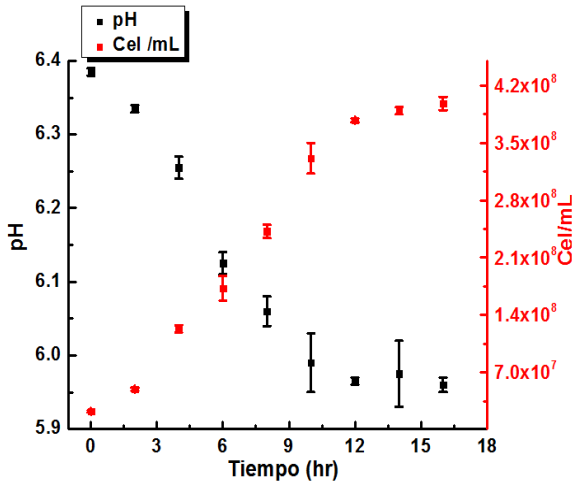


Figura 3.51. Comportamiento del pH y del crecimiento bacteriano durante la fermentación de los hidrolizados de olote

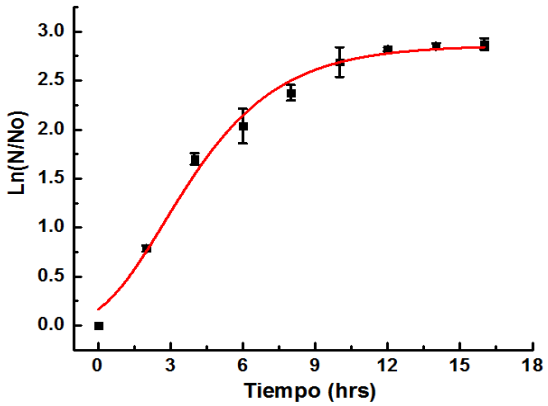


Figura 3.52. Datos experimentales del crecimiento bacteriano obtenidos durante la fermentación del olote ajustados al modelo de Gompertz modificado

3.8.3 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de TH

Al igual que en la hidrólisis del olote, el experimento realizado con TH utilizando 1.34 M H_3PO_4, 110 ºC y 300 minutos se escaló. La máxima producción de azúcares y de

furfural fue de 20.28 g / 100 g TH y de 742.23 mg / 100 g TH respectivamente. Se realizaron Dos experimentos con los hidrolizados neutros de TH, los cuáles se describen a continuación:

a) El primer experimento se describió en la sección 2.5 a). Al igual que en la fermentación del olote, la concentración de hidrógeno observada fue muy baja y no se logró cuantificar, mientras que el CO_2 se detectó por cromatografía de gases a partir de las 4 horas. El pH de la solución disminuyó ligeramente hasta alcanzar un valor final de 6.65. La inhibición en la producción de biohidrógeno se atribuye a una desviación en la ruta metabólica de los microorganismos posiblemente debida a la presencia de oxígeno en el medio (Soares *et al.,* 2020).

b) El segundo experimento consistió en agregar diferentes cantidades de hidrolizado en los viales como se describió en la sección 2.5 b). El pH inicial de la solución ajustado previamente a 7.0 disminuyó hasta un valor cercano a 6.40 lo cual puede asociarse a un proceso acidogénico, sin embargo, el hidrógeno producido no pudo cuantificarse nuevamente debido a su baja concentración, la cual de acuerdo con la curva de calibración (Figura C1) es menor al 5 %v. Las bacterias crecieron adecuadamente en el medio ya que después de las 20 horas de incubación se observó una saturación en todos los viales. La Tabla 3.27 resume los datos experimentales obtenidos para este experimento.

Tabla 3.27 Datos experimentales obtenidos durante la fermentación del hidrolizado de TH ajustado a pH 7 con KOH 0.1 M

	Con KOH 0.1 M		
Hidrolizado (µL)	pH	Bacteria	Hidrógeno
300	6.40 ± 0.05	Saturado	Detectado
600	6.38 ± 0.08	Saturado	Detectado
900	6.40 ± 0.04	Saturado	Detectado
1200	6.40 ± 0.04	Saturado	Detectado
1500	6.36 ± 0.03	Saturado	Detectado
1800	6.35 ± 0.02	Saturado	Detectado

El experimento descrito en el apartado 2.5 b) se repitió, pero en éste caso no se ajustó el pH inicial con KOH 0.1 M. La Tabla 3.28 muestra los datos experimentales obtenidos en donde se aprecia que el pH inicial de la solución varió en función de la cantidad de hidrolizado mostrando valores cercanos a 7.0 con los volúmenes más pequeños y el valor más pequeño de 6.63 cuando se adicionó 1.8 mL de hidrolizado. Para cada uno de los experimentos, el pH determinado después de la fermentación fue menor al observado al inicio de la misma estabilizándose todos en un valor cercano a 6.40, éste comportamiento fue similar al observado en la fermentación de los hidrolizados de TH con KOH y sugiere un poco de actividad metabólica bacteriana acidogénica. La producción de biohidrógeno fue muy baja e incluso en algunos experimentos no se observó el pico cromatográfico característico del hidrógeno, al mismo tiempo, el CO_2 fue detectado en cada una de las muestras y los medios de cultivo presentaron saturación bacteriana al término de la fermentación.

Tabla 3.28 Datos experimentales obtenidos durante la fermentación de los hidrolizados de TH sin adición de KOH 0.1 M

Hidrolizado (µL)	pH_{in}	pH_{fin}	Bacteria	Hidrógeno
300	7.00 ± 0.05	6.42 ± 0.1	Saturado	Detectado
600	6.94 ± 0.08	6.38 ± 0.06	Saturado	ND
900	6.87 ± 0.1	6.42 ± 0.02	Saturado	ND
1200	6.80 ± 0.2	6.37 ± 0.05	Saturado	Detectado
1500	6.75 ± 0.02	6.41 ± 0.01	Saturado	ND
1800	6.63 ± 0.01	6.37 ± 0.04	Saturado	Detectado

ND: No Detectado

Las bajas concentraciones de hidrógeno asociadas con la saturación de bacterias en el medio sugiere que la ruta metabólica de los microorganismos se desvió debido a la posible presencia de oxígeno en el espacio gaseoso de los viales, lo cual induciría a las bacterias a producir etanol y CO_2 como principales productos de la fermentación (Grisales & Willis, 2018). Pese a la presencia de la bacteria *E. cloacae* los viales no estuvieron completamente anóxicos inhibiendo la producción de hidrógeno.

3.8.4 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de olote y de TH. Efecto de la cantidad inicial de azúcares

Estos experimentos se llevaron a cabo como se describió en la sección 2.5 c). Los hidrolizados utilizados como fuente de carbono fueron nuevamente obtenidos a las mismas condiciones de operación; 1.34 M H_3PO_4, 110 ºC y 300 minutos. Las concentraciones de azúcares y de aldehídos en el hidrolizado neutro de olote fueron de 32.41 g/L (48.62 g / 100 g) y 1053.66 ppm respectivamente. Para el TH las concentraciones de azúcares y de furfural fueron de 11.82 g/L (17.73 g / 100) y 359.1 ppm respectivamente.

La producción de biohidrógeno a partir del hidrolizado de olote aumentó en función de la cantidad inicial de hidrolizado, alcanzando el valor máximo de 2.14 mL de H_2 con un volumen inicial de hidrolizado de 2.5 mL de hidrolizado. La producción de biohidrógeno observada en los volumenes iniciales de 2.5, 3.0 y 4.0 mL resultó muy similar entre sí, de igual manera el número total de bacterias por mL mostró un comportamiento similar para cada uno de los volumenes de hidrolizado con excepción de la muestra de los 2.0 mL (Figura 3.53a). La cantidad de bacterias al término de la fermentación del hidrolizado de olote osciló entre las 6 y las 7.4 $X10^8$ células / mL, lo cual se asocia a una saturación de microorganismos en el medio.
Como se observa en la Figura 3.53 b), la máxima producción de biohidrógeno a partir del hidrolizado de TH fue de 3.07 mL alcanzado en el experimento con 3.0 mL de hidrolizado. Al igual que en el caso del olote, un incremento en el volumen inicial de hidrolizado propicia un aumento en la producción de biohidrógeno. Exceptuando la muestra de 0.5 mL de hidrolizado, el resto de los experimentos mostró una saturación bacteriana en el medio acuoso, ya que el número de células / mL se encontró entre 6 y 7.2 $X10^8$.

De acuerdo a lo observado en la Figura 3.53, ambos hidrolizados resultaron viables para el desarrollo de los microorganismos ya que en la mayoría de los experimentos se alcanzó la saturación bacteriana en el medio, sin embargo, el hidrolizado de TH

mostró un mayor potencial para su transformación a biohidrógeno, lo cual se puede atribuir a su alto contenido de glucosa.

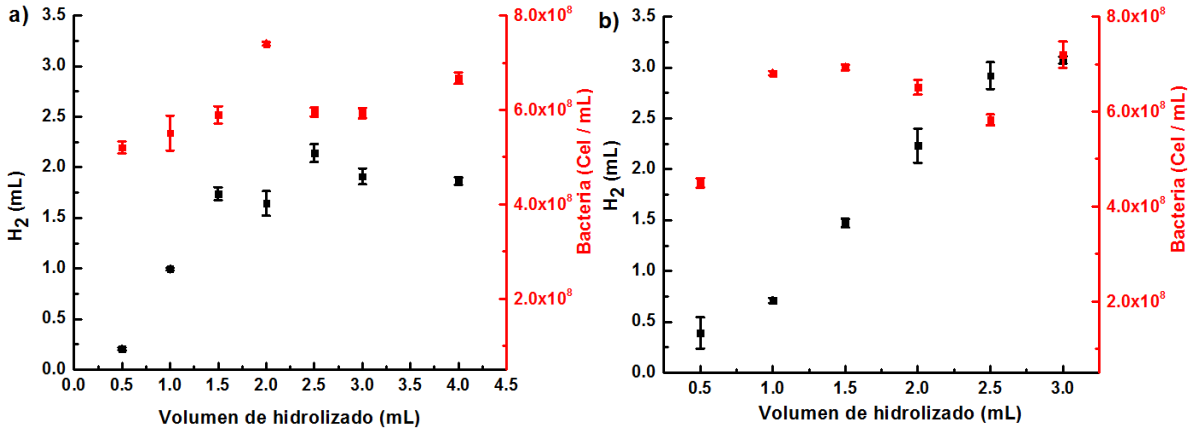


Figura 3.53. Producción de biohidrógeno y crecimiento bacteriano observado durante la fermentación de los hidrolizados de a) olote y de b) TH

En la Figura 3.54, se reportan los pH's de los diferentes hidrolizados determinados después de la fermentación. El pH de los hidrolizados de olote fueron menores a los obtenidos con el TH para cada uno de los volúmenes de hidrolizado. Algunos trabajos como los reportados por Cao *et al.* (2009), Ghimire *et al.* (2015) y Ávila-Vera E. (2010) muestran que la eficiencia de producción de biohidrógeno incrementa al utilizar pH's relativamente ácidos (5.5 - 6.5), pese a esta tendencia, la mayor producción de biohidrógeno en el presente trabajo se observó con el hidrolizado de TH cuando el pH final de la solución fue de 6.2. El pH más bajo fue de 5.98 determinado después de la fermentación de 3.0 mL de hidrolizado de olote, a pesar de la disminución considerable en el pH, dicho experimento no alcanzó la mayor producción de biohidrógeno. La diferencia tanto en la producción de biohidrógeno como en el gradiente de pH observado durante la fermentación de los hidrolizados del olote y del TH puede atribuirse a la ruta metabólica seguida por los microorganismos, a la concentración de aldehídos y a los tipos de azúcares presentes en el hidrolizado. Tanto en el caso del olote como en el TH las rutas metabólicas posibles podrían ser la formación de ácido butírico (Ec. 1.19), y de ácido acético (Ec. 1.18) en diferentes proporciones, dependiendo de los azucares

presentes. Con la finalidad de sustentar este comportamiento, es necesario cuantificar la concentración de ácidos orgánicos volátiles en los lixiviados generados. La otra posibilidad es que los azúcares mayormente presentes en el hidrolizado de olote sean pentosas y en el tallo de haba hexosas, lo que implica la determinación cuantitativa de los azúcares monoméricos para asociarlos con el hidrógeno producido, Conocer estos datos es importante para determinar cuál de ellos es más importante en la producción de hidrógeno.

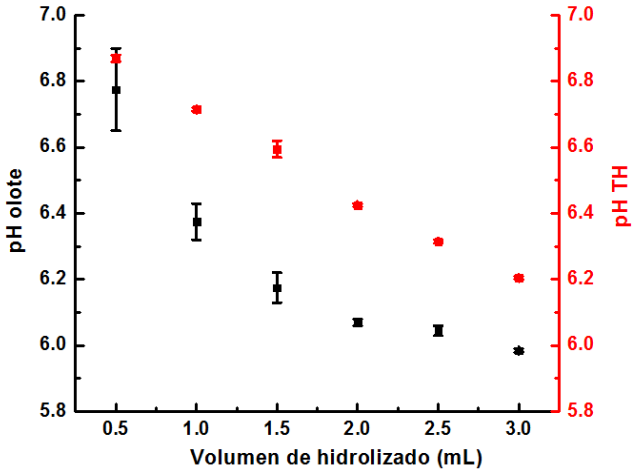


Figura 3.54. Valores de pH determinados después de la fermentación de los hidrolizados de olote y de TH

La Tabla 3.29 resume los datos experimentales obtenidos durante las fermentaciones de los hidrolizados de olote y de TH. A pesar de que la cantidad inicial de azúcares reductores presente en los hidrolizados de TH fue menor en comparación con los del olote, el TH alcanzó los volúmenes más grandes de H_2 y en consecuencia los rendimientos más altos. El porcentaje más alto de hidrógeno fue de 23.64% determinado con 3 mL de hidrolizado de TH. El pH inicial de cada uno de los sistemas disminuyó al aumentar la cantidad de hidrolizado, para cada uno de los sistemas dicho pH se encontró en un rango de entre 6.91 y 6.95. Esto parece confirmar lo que suponemos de la ruta metabólica con formación de ácido acético y ácido butírico, como se determinó previamente durante la fermentación de frutas y verduras (Ávila-Vera E. 2010). Tanto para el olote como para el TH un incremento en

la cantidad inicial de hidrolizado propició un aumento en el volumen de hidrógeno producido, alcanzando los volúmenes más altos con 2.5 mL (0.078 g de azúcares) y con 3.0 mL (0.030) para el olote y el TH respectivamente. La cantidad inicial de azúcares adicionada con los hidrolizados del olote fue tres veces más que la agregada con el TH, pese a esto tanto el volumen como los rendimientos de producción de biohidrógeno (mL H_2 / g de azúcar) fueron más altos con éste último sustrato, siendo un valor calculado de 138.16 mL H_2 / g de azúcar degradada con una cantidad inicial de azúcares de 0.020 g, el valor más alto obtenido.

Tabla 3.29 Datos experimentales obtenidos durante la fermentación de los hidrolizados de olote y de TH

Hidrolizado	pH_{in}	pHf_{in}	$\%H_2$	mL H_2	$Azúcar_{in}$ (g)	$Azúcar_{fin}$ (g)	$Azúcar_{deg}$ (%)	mL H_2 / g azúcar
Olote								
0.5	6.94	6.78	1.33	0.21	0.016	0.0015	90.21	14.66
1.0	6.94	6.38	6.63	0.99	0.031	0.0039	87.27	36.52
1.5	6.93	6.18	11.99	1.74	0.047	0.0080	82.91	44.80
2.0	6.92	6.07	11.74	1.64	0.06	0.025	59.33	44.39
2.5	6.92	6.05	15.84	2.14	0.078	0.036	54.11	50.68
3.0	6.91	5.98	14.69	1.91	0.094	0.044	52.57	38.82
TH								
0.5	6.95	6.87	2.53	0.39	0.005	0.0013	74.65	104.46
1.0	6.94	6.72	4.73	0.71	0.010	0.0022	78.11	90.47
1.5	6.94	6.59	10.14	1.47	0.015	0.0034	77.54	125.82
2.0	6.94	6.43	15.94	2.23	0.020	0.0039	80.38	138.16
2.5	6.93	6.31	21.62	2.92	0.025	0.0037	85.12	136.49
3.0	6.93	6.21	23.64	3.07	0.030	0.0063	79.03	129.01

En cada uno de los experimentos se observó un porcentaje de degradación de azúcar mayor al 50%, para el caso del olote dicho porcentaje disminuyó a medida que la cantidad inicial de azúcares aumentó. En cambio, los porcentajes de degradación de azúcares observados con los hidrolizados de TH se mantuvieron entre 75 y 85%, esta tendencia puede deberse a que los hidrolizados de olote tuvieron un mayor contenido de aldehídos y/o a la alta concentración de glucosa

presente en los hidrolizados de TH. Debido a que los hidrolizados están compuestos por una mezcla de azúcares de 5 y 6 carbonos, la determinación del rendimiento en términos de mol H_2 por mol hexosa se vuelve complicado. Por ello, a fin de comparar los rendimientos de producción de H_2 obtenidos en el presente trabajo con lo citado en la literatura se propuso determinar el rendimiento en términos de mL de H_2 / g de azúcar degradada. Como se observa en la Figura 3.55, los rendimientos de hidrógeno más altos corresponden a las fermentaciones del hidrolizado de TH.

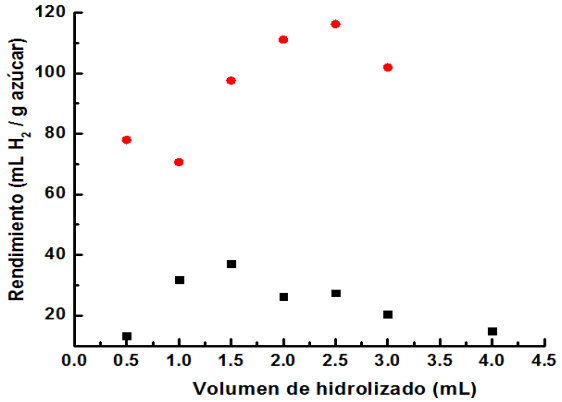


Figura 3.55. Rendimientos de producción de biohidrógeno en función del volumen de hidrolizado obtenidos en la fermentación de los hidrolizados de olote y de TH

El máximo rendimiento de hidrógeno obtenido en el presente trabajo, 138.16 mL H_2 / g azúcar, fue mayor en comparación con lo reportado por Koskinen *et al.* (2008) y por Reungsang *et al.* (2013), quienes estudiaron respectivamente la producción de hidrógeno a partir de glucosa en régimen termofílico y de glicerol utilizando la bacteria *E. aerogens* (Tabla 3.30).

Tabla 3.30 Comparación de los rendimientos de hidrógeno

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento (mL H_2 / g azúcar)	Temperatura operación	Referencia
E. cloacae y *C. butyricum*	TH	116.18	37 ºC	Presente trabajo
E. coli WDHL	Paja de trigo	140.1	37 ºC	López-Hidalgo *et al.*, 2017

Tabla 3.30 Comparación de los rendimientos de hidrógeno (Continuación)

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento (mL H_2 / g azúcar)	Temperatura operación	Referencia
S. cerevisiae	Paja de trigo	178	70 ºC	Kaparaju *et al.,* 2009
E. aerogens	Glicerol residual	35.84	37 ºC	Reungsang *et al.,* 2013
Consorcio termófilo	Glucose	108.64	60 ºC	Koskinen *et al.,* 2008
Cultivo mixto	Camote	126.70	37 ºC	Lay *et al.,* 2012
Cultivo mixto	Glucose	176.54	37 ºC	Karadag & Puhakka, 2010

CONCLUSIONES

El olote resultó una materia prima viable para la obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida, siendo el experimento con 1.34 M H_3PO_4 y 110 ºC el que mostró los mayores rendimientos. La mayor cantidad de los azúcares producidos durante la hidrólisis del olote proviene principalmente de la descomposición de la hemicelulosa.

Bajo las mismas condiciones experimentales, el olote tiene un mayor potencial para la producción de azúcares en comparación con el TH. Además un incremento tanto en la temperatura como en la concentración del ácido resultó favorable para la producción de azúcares reductores a partir del olote y del TH.

Los datos experimentales de la producción de azúcares reductores de todas las hidrólisis del olote se ajustaron adecuadamente a los modelos cinéticos de Saeman y de primer orden. Los parámetros termodinámicos calculados a partir de las constantes cinéticas determinadas con ambos modelos resultaron muy similares entre sí, lo cual sugiere que ambos modelos cinéticos pueden utilizarse para el cálculo de los parámetros termodinámicos cuando la fase de degradación de azúcares no se observa en los datos experimentales.

De acuerdo con los parámetros termodinámicos, la hidrólisis del olote y del TH con ácido diluido es un proceso endotérmico y no espontáneo, con la mayor cantidad de energía en los reactivos, los aldehídos son los productos termodinámicamente más estables.

El tratamiento con NaOH resultó eficiente para solubilizar a la hemicelulosa presente en el TH y en el RM, disminuyendo la eficiencia de producción de azúcares en una hidrólisis ácida subsecuente.

La hidrólisis del olote con ácido sulfúrico resultó un método eficiente para la producción de azúcares reductores, sin embargo, bajo las mismas condiciones de

operación el ácido sulfúrico deshidrata una mayor cantidad de azúcares en comparación con el fosfórico, produciendo inhibidores bacterianos.

El hidrolizado neutro de olote mostró un alto contenido de azúcares reductores y de aldehídos en comparación con el hidrolizado de TH, la xilosa es el azúcar predominante en el hidrolizado de olote, mientras que el hidrolizado de TH está compuesto principalmente por glucosa.

La hidrólisis del RM con HCL a bajas temperaturas mostró la producción de azúcares reductores y disminuyó la concentración de aldehídos inhibidores, sugiriendo que los procesos a baja temperatura son una opción viable para el tratamiento de la biomasa lignocelulósica, al menos con ácido clorhídrico.

Las bacterias crecieron adecuadamente utilizando los hidrolizados neutros como fuente de carbono, hay que verificar que se tenga el medio anóxico, la presencia de bajas cantidades oxígeno desvía la ruta metabólica de los microorganismos hacia la producción de metabolitos secundarios como el etanol.

El hidrolizado de TH mostró un alto potencial para su transformación en biohidrógeno utilizando las bacterias mesofílicas *E. cloacae* y *C. butyricum*. Con base a los rendimientos de hidrógeno y al gradiente de pH observado en los lixiviados se sugiere una ruta metabólica mixta con la producción de ácido acético y butírico, sin embargo, es necesaria la caracterización del lixiviado para validar este supuesto.

El alto contenido de glucosa y la baja concentración de aldehídos permitieron al hidrolizado de TH ser una fuente de carbono adecuada para el desarrollo de las bacterias mesofílicas y para la producción de biohidrógeno. El TH es un material, no reportado anteriormente, con alto potencial biotecnológico para la producción de hidrógeno.

REFERENCIAS

Abd-Rahim F., Wasoh H., Zakaria M. R., Ariff A., Kapri R., Ramli N., Siew-Ling L. (2014). Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*. Vol. 42, 309-315.

Adeogun A. I., Agboola B. E., Idowu M. A., Shittu T. A. (2019). $ZnCl_2$ enhanced acid hydrolysis of pretreated corncob for glucose production: Kinetics, thermodynamics and optimization analysis. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. Vol. 4, 149-158.

Adeogun A. I., Idowu M. A., Oladeji O. B., Ofudje E. A., Akinloye A. O. (2018). Kinetic, thermodynamic and optimization studies of dilute acid hydrolysis of *Manihot esculenta* peels for glucose production. *Waste and Biomass Valorization.* Vol. 11, 817-826.

Agbor Valery B., Cicek Nazim, Sparling Richard, Berlin Alex, Levin David D. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances.* Vol. 29, 675-685.

Ajala E. O., Ajala M. A., Tijani I. A., Adebisi A. A., Suru I. (2020). Kinetics modelling of acid hydrolysis of cassava (*Manihot esculenta Cranz*) peel and its hydrolysate chemical characterisation. *Journal of King Saud University – Science*. Vol. 32, 2284-2292.

Akobi C., Hafez H., Nakhla G. (2017). Impact of furfural on biological hydrogen production kinetics from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic and thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 42, 12159-12172.

Amnuaycheewa P., Hengaroonprasan R., Rattanaporn K., Kirdponpattara S., Cheenkachorn K., Sriariyanun M. (2016). Enhancing enzymatic hydrolysis and biogas production from rice straw by pretreatment with organic acids. *Industrial Crops and Products.* Vol. 87, 247-254.

APHA. (2005). Standard Methods for Water and Wastewater Examination 21 st ed. American Public Health Association-American Water Works Association. *Water Environmental Federation Publication.* Washington DC.

Arslan Y., Takac S., Eken-Saracoglu N. (2012). Kinetic study of hemicellulosic sugar production from hazelnut shells. *Chemical Engineering Journal.* Vol. 185, 23-28.

ASTM. (2013). American Society for Testing and Materials. ASTM D1106-96, Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood, *ASTM International,* West Conshohocken.

[a]Avci A., Saha B. C., Dien B. S., Kennedy G. J., Cotta M. A. (2013). Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology,* Vol. 130, 603-612.

[b]Avci A., Saha B. C., Kennedy G. J., Cotta M. A. (2013). High temperature dilute phosphoric acid pretreatment of corn stover for furfural and ethanol production. *Industrial Crops and Products.* Vol. 50, 487-484.

Ávila-Vera E. (2010). Obtención de un energético limpio, hidrógeno, a partir de desechos orgánicos de frutas y verduras. *Tesis Doctoral.* Instituto Tecnológico de Toluca. México.

Ayeni A. O., Daramola M. O. (2017). Lignocellulosic biomass Waste beneficiation: Evaluation of oxidative and non-oxidative pretreatment methodologies of South African corn cob. *Journal of Environmental Chemical Engineering.* Vol. 5, 1771-1779.

Bajpal P. (2018). Pulping fundamentals*. Biermanns Handbook of Pulp and Paper.* Third edition, 295-351.

Bao T., Zhao J., Li J., Liu X., Yang S. T. (2019). N-Butanol and ethanol production from cellulose by *Clostridium cellulovorans* overexpressing heterologous aldehyde/alcohol dehydrogenases. *Bioresource Technology. Vol*. 285, 121316.

Boontum A., Phetsom J., Rodiahwati W., Kitsubthawee K., Kuntothom T. (2019). Characterization of diluted-acid pretreatment of Water hyacinth. *Applied Science and Engineering Progress*. Vol. 12, 253-263.

Buchanan R. E. Gibbons. (1974). Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology. *Editorial Board and trustees of Bergey´s manual trust*. 8° Edition. Pp. 550-555.

Budiman P. M., Wu T. Y. (2018). Role of chemicals addition in affecting biohydrogen production through photofermentation. *Energy Conversion and Management.* Vol. 165, 509-527.

Burhenne L., Messmer J., Aicher T., Laborie M. P. (2013). The effect of the biomass components lignin, cellulose and hemicellulose on TGA and fixed bed pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* Vol. 101, 177-184.

Camesasca L., Ramírez M. B., Guigou M., Ferrari M. D., Lareo C. (2015). Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis and fermentation of napiergrass for fuel ethanol production. *Biomass & Bioenergy*. Vol. 74, 193-201.

Cao G., Ren N., Wang A., Lee D., Guo W., Liu B., Feng Y., Zhao Q. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for Biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16 International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 7182-7188.

Cao G., Zhao L., Wang A.J., Wang Z.Y., Ren N. (2014). Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria. *Biotechnology for Biofuels.* Vol. 7:82, 1-13.

Cao L., Chen H., Tsang D. C. W., Luo G., Hao S., Zhang X., Chen J. (2018). Optimizing xylose production from pinewood sawdust through dilute-phosphoric acid hydrolysis by response surface methodology. *Journal of Cleaner Production.* Vol. 178, 572-579.

Castro E., Nieves I. U., Mullinnix M. T., Sagues W. J., Hoffman R. W., Fernández-Sandoval M. T., Tian Z., Rockwood D. L., Tamang B., Ingram L. O. (2014). Optimization of dilute phosphoric acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. *Applied Energy.* Vol. 125, 76-83.

Chayanon Sawatdeenarunat, Surendra K. C., Devin Takara, Hans Oechsner, Samir Kumar. (2015). Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*. Vol. 178, 178-186.

Chen L., Zhang H., Li J., Lu M., Guo X. (2015). A novel diffusion biphasic hydrolysis coupled kinetic model for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology.* Vol. 177, 8-16.

Chen R. F., Lee Y. Y., Torget R. (1996). Kinetic and modelling investigation of two stage reverse-flow reactor as applied to dilute acid pretreatment of agricultural residues. *Appl Biochem Biotechnol.* Vol. 57, 133-146.

Cheng J., Liu M., Song W., Ding L., Liu J., Zhang L., Cen K. (2017). Enhanced hydrogen production of *Enterobacter aerogens* mutated by nuclear irradiation. *Bioresource Technology.* Vol. 227, 50-55.

Chong Mei-Ling, Sabaratnam Vikineswary, Shirai Yoshihito, Hassan Mohd A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 3277-3287.

Cieciura-Wloch W., Binczarski M., Tomaszewska J., Borowski S., Dománski J., Dziugan P., Witonska I. (2019). The use of acidic hydrolysates after furfural production from sugar waste biomass as a fermentation medium in the biotechnological production of hydrogen. *Energies.* Vol. 12, 3222.

Coimbra M. C., Duque A., Saéz F., Manzanares P., García-Cruz C. H., Ballesteros M. (2016). Sugar production from wheat straw biomass by Alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis. *Renewable Energy.* Vol. 86, 1060-1068.

Corona V. M., Razo-Flores E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from *Agave tequiliana* bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology.* Vol. 249, 334-341.

Das Debabrata, Khanna N., Dasgupta C. N. (2014). Biohydrogen production: Fundamentals and Technology Advances. *CRC Press.* 1° Edición. Estados Unidos.

De Souza I. T., Moreira F. S., Ferreria J. S., Cardoso V. L., Batista F. R. X. (2019). Technological Advances in Hydrogen production by *Enterobacter* bacteria upon substrate, luminosity and anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 44, 16190-16198.

Díaz-Blanco D. I., De la Cruz J. R., López-Linares J.C., Morales-Martínez T. K., Ruiz E., Ríos-González L. J., Romero I., Castro E. (2018). Optimization of dilute acid pretreatment of Agave lechuguilla and ethanol production by co-fermentation with *Escherichia coli MM160. Industrial Crops and Products.* Vol. 114, 154-163.

Eken S. N., Mutlu S. F., Dilmac G., Cavusoglu H. (1998). A comparative kinetic study of acidic hemicellulose hydrolysis in corn cob and sunflower seed hull. *Bioresour Technol*. Vol. 65, 29-33

Elbeshbishy E., Dhar B. R., Nakhla G., Lee H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 79, 656-668.

Elsharnouby O., Hafez H., Nakhla G., El-Naggar M. H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 38, 4945-4966.

Esteghlalian A., Hashimoto A. G., Fenske J. J., Penner M. H. (1997). Modeling and optimization of the dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover, poplar and switch grass. *Bioresource Technology.* Vol. 96, 139-136.

Gaur R., Soam S., Sharma S., Gupta R. P., Bansal V. R., Kumar R., Tuli D. K. (2016). Bench scale dilute acid pretreatment optimization for producing fermentable sugars from cotton stalk and physicochemical characterization. *Industrial Crops & Products*, Vol. 83, 104-112.

Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably E., Escudie R., Lens P. N. L., Esposito G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass. Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. Vol. 144, 73-95.

Ghimire A., Luongo V., Frunzo L., Pirozzi F., Lens P. N. L., Esposito G. (2017). Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 42, 4861-4869.

Giraldeli L. D., Fonseca B. C., Reginatto V. (2019). Investigating how biomass hydrolysis derivatives inhibit H2 production by an isolated *Clostridium beijerinckii. International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 44, 14683-14693.

Girisuta B., Janssen L. P. B. M., Heeres H. J. (2007). Kinetic study on the acid catalyzed hydrolysis of cellulose to levulinic acid. *Industrial and Engineering Chemistry Research.* Vol. 46, 1696-1708.

Gonzales R. R., Sivagurunathan P., Kim S. H. (2016). Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 41, 21678-21684.

Gómora Hernández J. C. (2016). Obtención de biohidrógeno a partir de residuos agrícolas prehidrolizados. *Tesis de Maestría.* Instituto Tecnológico de Toluca, Metepec, México.

Gómora-Hernández J. C., Alcántara-Díaz D., Fernández-Valverde S. M., Hernández-Burriel M. C. (2016). Biohydrogen production by anaerobic digestion of corn cob and stem of faba bean hydrolysates. International Congress of the Mexican Hydrogen Society. *Proceedings of the IEEE*, 1-6. Doi: 10.1109/CSMH.2016.7947659.

Grisales D. V. H., Willis M. J. (2018). Kinetic modelling and simulation of batch continuous and cell-recycling fermentations for acetone-butanol-ethanol production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Biochemical Engineering Journal.* Vol. 137, 30-39.

Guerra-Rodríguez E., Portilla-Rivera O. M., Jarquín-Enríquez L., Ramírez J. A., Vázquez M. (2012). Acid hydrolysis of wheat straw: A kinetic study. *Biomass & Bioenergy,* Vol. 36, 346-355.

Haroun B. M., Nakhla G., Hafez H., Nasr F. A. (2016). Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous flow system. *Renewable Energy*. Vol. 93, 302-311.

Hay J. X. W., Wu T. Y., Juan J. C., Jahim J. M. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics and future prospects of Hydrogen usage. *Biofuels Bioproducts Bioref*. Vol. 7, 334-352.

He Y., Pang Y., Liu X., Wang K. (2008). Physicochemical characterization of rice straw pretreated with sodium hydroxide in the solid state for enhancing biogas production. *Energy Fuel.* Vol. 22, 2775-2781.

Higgins F. J., Ho G. E. 1982. Hydrolysis of cellulose using HCl: A comparison between liquid phase and gaseous phase processes. *Agricultural wastes*. Vol. 4, 97-116.

Hsu T. C., Guo G. L., Chen W. H., Hwang W. S. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology,* Vol. 101, 4907-4913.

Ingle A. P., Chandel A. K., Da Silva S. S. (2020). Lignocellulosic biorefining tehcnologies. *Wiley*, 1° Edición, India.

INEGI. (2009). (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). Cuéntame Economía y Agricultura. (Consultada el 02 de Noviembre de 2014). http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/agri/default.aspx?tema=E

Jang M. O., Choi G. (2018). Techno-economic analysis of butanol production from lignocellulosic biomass by concentrated acid pretreatment and hydrolysis plus continuous fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 134, 30-43.

Jiang H., Gadow S. I., Tanaka Y., Cheng J., Li Y. Y. (2015). Improved cellulose conversion to bio-hydrogen with thermophilic bacteria and characterization of microbial community in continuous bioreactor. *Biomass & Bioenergy.* Vol. 75, 57-64.

Jung Y. H., Kim I. J., Kim H. K., Kim K. H. (2013). Dilute acid pretreatment of lignocellulosic for whole slurry ethanol production fermentation. *Bioresource Technology.* Vol. 132, 109-114.

Kadier A., Simayi Y., Kalil M. S., Abdeshahian P., Hamid A. A. (2014). A review of the substrates used in microbial electrolysis cells for producing sustainable and clean Hydrogen gas. *Renewable Energy*, Vol 71, 466-472.

Kadier A., Kalil M. S., Abdeshahian P., Chandrasekhar K., Mohamed A., Azman N. F., Logroño W., Simayi Y., Hamid A. A. (2016). Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cells (CEM's) for microbial production of hydrogen and value-added chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* Vol 61, 501-525.

Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A. B., Kongjan P., Angelidaki I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology,* Vol. 100, 2562-2568.

Kapoor K., Garg N., Diwan R. K., Varshney L., Tyagi A. K. (2017). Study the effect of gamma radiation pretreatment of sugarcane bagasse on its physic-chemical, morphological and structural properties. *Radiation Physics and Chemistry.* Vol. 141, 190-196.

Karadag D., Puhakka J. A. (2010). Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, 10245-10251.

Kim J. S., Lee Y. Y., Kim T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology,* Vol. 199, 42-48.

Koskinen P. E., Beck S. R., Orlygsson J., Puhakka J. A. (2008). Ethanol and hydrogen production by two thermophilic anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas. *Biotechnol Bioeng.* Vol. 101, 679-690.

Kumar G., Bakonyi P., Periyasamy S., Kim S. H., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K. (2015). Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 44, 728-737.

Kumar G., Cho S. K., Sivagurunathan P., Anburajan P., Mahapatra D. M., Park J. H. (2018). Insights into evolutionary trends in molecular biology tools in microbial screening for biohydrogen production through dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 43, 19885-19901.

Kumar G., Dharmaraja J., Arvindnarayan S., Shoban S., Bakonyi P., Saratale G. D., Nemestóthy N., Bélafi-Bakó K., Yoon J. J., Kim S. H. (2019). A comprehensive review on thermochemical, biological, biochemical and hybrid conversion methods of bio-derived lignocellulosic molecules into renewable fuels. *Fuel.* Vol. 251, 352-367.

Kumar[b] G., Mathimani T., Rene E. R., Pugazhendhi A. (2019). Application of nanotechnology in dark fermentation for enhanced biohydrogen production using inorganic nanoparticles. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 44, 13106-13113.

Kumar S., Dheeran P., Singh S. P., Mishra I. M., Adhikari D. K. (2015). Kinetic studies of two stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Renewable Energy,* Vol. 83, 850-858.

Láinez M., Ruiz H. A., Castro-Luna A. A., Martínez-Hernández S. (2018). Release of simple sugars from lignocellulosic biomass of *Agave salmiana* leaves subject to sequential pretreatment and enzymatic saccharification. *Biomass & Bioenergy.* Vol. 118, 133-140.

Lay C-H., Lin H-C., Sen B., Chu C-Y., Lin C-Y. (2012). Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. *Journal of cleaner production.* Vol. 27, 155-164.

Lee J. W., Kim J. Y., Jang H. M., Lee M.W., Park J. M. (2015). Sequential dilute acid hydrolysis and alkali pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization. *Bioresource Technology.* Vol. 182, 296-301.

Lee K. S., Tseng T. S., Liu Y. W., Hsiao Y. D. (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 37, 15556-15562.

Lenihan P., Orozco A., O´Neill E., Ahmad M. N. M., Rooney W., Walker G. M. (2010). Dilute Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 156, 395-403.

Leya T., Abhilash J., Lalitha D. G. (2014). Xylanase and cellulase systems of *Clostridium sp.* An insight on molecular approaches for strain improvement. *Bioresource Technology.* Vol. 158, 343-350.

Li P., Cai D., Luo Z., Qin P., Chen C., Wang Y., Zhang C., Wang Z., Tan T. (2016). Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. *Bioresource Technology.* Vol. 206, 86-92.

Li Q., Guo C., Liu C. Z. (2014). Dynamic microwave-assisted alkali pretreatment of cornstalk to enhance hydrogen production via co-culture fermentation of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum. Biomass & Bioenergy.* Vol. 64, 220-229.

Li Y. C., Wu S. Y., Chu C. Y., Huang H. C. (2011). Hydrogen production from mushroom farm waste with a two-step acid hydrolysis process. *International Journal of Hydrogen Energy,* Vol. 36, 14245-14251.

Liang Yue-gan, Cheng B., Si Y., Cao D., Nie E., Tang J., Liu X., Zheng Z., Luo X. (2014). Physicochemical changes of rice straw after lime pretreatment and mesophilic dry digestion. *Biomass & Bioenergy.* Vol. 71, 106-112.

Liu C. M., Chu C. Y., Lee W. Y., Li Y. C., Wu S. Y., Chou Y. P. (2013). Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pretreatment in both batch and continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy,* Vol. 38, 15823-15829.

Liu H., Chen X., Ji G., Yu H., Gao C., Han L., Xiao W. (2019). Mechanochemical deconstruction of lignocellulosic cell wall polymers with ball-milling. *Bioresource Technology.* Vol. 286, 121364.

López-Hidalgo A. M., Sánchez A., De León-Rodríguez A. (2017). Simultaneous production of bioethanol and biohydrogen by *Escherichia coli* WDHL using wheat straw hydrolysate as substrate. *Fuel.* Vol. 188, 19-27.

López-Linares J. C., Moya C. C., Ruiz E., Castro E., Romero I. (2013). Fermentable sugar production from rapeseed straw by dilute phosphoric acid pretreatment. *Industrial Crops and Products.* Vol. 50, 525-531.

Lu C., Wang Y., Lee D. J., Zhang Q., Zhang H., Tahir N., Jing Y., Liu H., Zhang K. (2019). Biohydrogen production in pilot scale fermenter: Effects of hydraulic retention time and substrate concentration. *Journal of Cleaner Production.* Vol. 229, 751-760.

Lu L., Ren Z. J. (2016). Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: A state of the art review. *Bioresource Technology.* Vol. 215, 254-264.

Lu Y. L., Moiser N. S. (2008). Kinetic modelling analysis of maleic acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis in corn stover*. Biotechnol Bioeng*. Vol. 101, 1170-1181.

Lukajtis R., Holowacz I., Kucharska K., Glinka M., Rybarczik P., Przyjazny A., Kamínski M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* Vol 91, 665-694.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock. (2003). Biology of Microorganisms. 10° ed. *Prentice Hall*, Upper Saddle River.

Maitan-Alfenas G. P., Visser E. M., Guimaraes V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste into valuable products. *Current opinion in Food Science*. Vol. 1, 44-49.

Mars Astrid E., Veuskens Teun, Budde Miriam A. W., Doeveren Patrick F. N. M., Lips Steef J., Bakker Robert R., Vrije Truus, Claassen Pieternel A. M. (2010). Biohydrogen production from untreated and hydrolyzed potato steam peels by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, 7730-7737.

Mechery J., Thomas D. M., Kumar C. S. P., Joseph L., Sylas V. P. (2019). Biohydrogen production from acidic and alkaline hydrolysates of paddy straw using locally isolated facultative bacteria through dark fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery.*

Mellado-Mojica E., Seeram N. P., López M. G. (2016). Comparative analysis of maple syrups and natural sweeteners: Carbohydrates composition and classification (differentiation) by HPAEC-PAD and FTIR spectroscopy-chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis.* Vol. 52, 1-8.

Michalska K., Bizukojc M., Ledakowicz S. (2015). Pretreatment of energy crops with sodium hydroxide and cellulolytic enzymes to increase biogas production. *Biomass & Bioenergy. Vol*. 80, 213-221.

Miller Gail Lorenz. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* Vol. 31, 426-428.

Miller J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 1° Edición. Estados Unidos.

Modenbach Alicia. (2013). Sodium hydroxide pretreatment of corn stover and subsequent enzymatic hydrolysis: An investigation of yields, kinetic modelling and glucose recovery. Theses and Dissertations – Bio systems and Agricultural Engineering. University of Kentucky.

Mudhoo A., Torres-Mayanga P. C., Forster-Carneiro T., Sivagurunathan P., Kumar G., Komilis D., Sánchez A. (2018). A review of reserach trends in the enhancement of biomass to Hydrogen conversion. *Waste Management.* Vol. 79, 580-594.

Müller J., Xie Z. P., Staebelin C., Mellor R. B., Boller T., Wiemken A. (1994). Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiologia Plantarum.* Vol. 90, 86-92.

Muñoz-Páez K. M., Alvarado-Michi E. L., Buitrón G., Valdez-Vázquez I. (2019). Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation

hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 44, 2289-2297.

Na B. I., Lee J. W. (2015). Kinetic study on the dilute acid catalyzed hydrolysis of waste mushroom medium. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* Vol. 25, 176-179.

Ngo T. A., Nguyen T. H., Bui H. T. V. (2012). Thermophilic fermentative hydrogen production from xylose by *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 37, 174-179.

Nissila M. E., Lay C. H., Puhakka J. A. (2014). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolysates. A review. *Biomass & Bioenergy*. Vol. 67, 145-159.

Pandey Ashok, Chang Jo-Shu, Hallenbeck Patrick C., Larroche Christian. (2013). Biohydrogen. *Book Aid International.* 1° Edición. Polonia.

Pappas I. A., Koukoura Z., Tananaki C., Goulas C. (2014). Effect of dilute acid pretreatment severity on the bioconversion efficiency of *Phalaris aquatica L*. Lignocellulosic biomass into fermentable sugars. *Bioresource Technology,* Vol. 166, 395-402.

Park J. H., Cheon H. C., Yoon J. J., Park H. D., Kim S. H. (2013). Optimization of batch dilute acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 38, 6130-6136.

Partida-Sedas G., Montes-García N., Carvajal-Zarrabal O., López-Zamora L., Gómez-Rodríguez J., Aguilar-Uscanga M. G. (2016). Optimization of hydrolysis process to obtain fermentable sugars from sweet sorghum bagasse using a Box-Behnken design. *Sugar Tech.* Vol. 19, 317-325.

Paul S. Dutta A. (2018). Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Resources, Conservation & Recycling*. Vol. 130, 164-174.

*Patinvoh R. J., Taherzadeh M. J. (*2019). Challenges of biogas implementation in developing countries. *Current opinion in Environmental Science & Health.* Vol. 12, 30-37.

Pérez-Cadena R., Medina-Moreno S. A., Martínez A., Lizardi-Jiménez M. A., Espinosa-Solares T., Téllez-Jurado A. (2018). Effect of concentration of salts in ethanol production from acid hydrolysis of cladodes of *Opuntia ficus indica* var. Atlixco. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* Vol. 17, 349-365.

Petersson A. Thomsen M. H., Nielsen H. H., Thomsen A. B. (2007). Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean *Biomass & Bioenergy.* Vol. 31, 812-819.

Plangklang P., Reungsang A., Pattra S. (2012). Enhanced biohydrogen production form sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 37, 15525- 15532.

Poovaiah C. R., Nageswara-Rao M., Soneji J. R., Baxter H. L., Stewart C. N. (2014). Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. *Plant Biotechnology Journal.* Vol. 12, 1163-1173.

Prabakar D., Manimudi V. T., Suvetha S. K., Sampath S., Mahapatra D. M., Rajendran K., Pugazhendhi A. (2018). Advanced biohydrogen production using pretreated industrial Waste: Outlook and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 96, 306-324.

Rafiqul I. S. M., Sakinah A. M. M. (2012). Kinetic studies on acid hydrolysis of *Meranti* wood sawdust for xylose production. *Chemical Engineering Science.* Vol. 71, 431-437.

Ranganathan S., McDonald D. G., Bakhsi N. N. (1985). Kinetic studies of wheat straw hydrolysis using sulphuric acid. *Canadian Journal of Chemical Engineering.* Vol. 63, 840-844.

Raud M., Tutt M., Olt J., Kikas T. (2016). Dependence of the hydrolysis efficiency on the lignin content in lignocellulosic material. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 41, 16338-16343.

Reddy M. V., Amulya K., Rohit M. V., Sarma P. N., Mohan S. V. (2014). Valorization of fatty acid waste for bioplásticos production using Bacillus tequilensis: Integration with dark fermentative hydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 39, 7616-7626.

Reddy K., Nasr M., Kumari S., Kumar S., Gupta S. K., Enitan A. M. (2017). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe^{2+} and magnetite nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research.* Vol. 24, 8790-8804.

Ren Y., Wang J., Liu Z., Ren Y., Li G. (2009). Hydrogen production from the monomeric sugars hydrolyzed from hemicellulose by *Enterobacter aerogenes. Renewable Energy.* Vol. 34, 2774-2779.

Reungsang A., Sittijunda S., Angelidaki I. (2013). Simultaneous production of Hydrogen and ethanol from Waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKu-S1. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 38, 1813-1825.

Rojas-Rejón O. A., Sánchez A. (2013). The impact of particle size and initial solid loading on thermochemical pretreatment of wheat straw for improving sugar recovery. *Bioprocess & Biosynthesis Engineering.* Vol. 37, 1427-1436.

Rosales-Colunga L. M., Razo-Flores E., De León-Rodríguez A. (2012). Fermentation of lactose and its constituents sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on Hydrogen production. *Bioresource Technology.* Vol. 111, 180-184.

Roy Anindita & Kumar Ashwani. (2013). Pretreatment methods of lignocellulosic materials for biofuel production. A review. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences.* Vol. 2, 181-193.

Ruiz E., Romero I., Moya M., Cara C., Vidal J. D., Castro E. (2013). Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology.* Vol. 140, 292-298.

Saeman J. F. (1945). Kinetics of wood saccharification: Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Industrial and Engineering Chemistry.* Vol. 37, 43-52.

SAGARPA. (2010). (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Consultado el 04 de Noviembre de 2014. http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural

Saha S., Jeon B. H., Kurade M. B., Jadhav S. B., Chatterjee P. K., Chang S. W., Govindwar S. P., Kim S. J. (2018). Optimization of dilute acetic acid pretreatment of mixed fruit waste for increased methane production. *Journal of Cleaner Production.* Vol. 190, 411-421.

Sahoo D., Ummalyma S. B., Okram A. K., Pandey A., Sankar M., Sukumaran R. K. (2018). Effect of dilute acid pretreatment of wild rice grass (*Zizania latifolia*) from Loktak Lake for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology.* Vol. 253, 252-255.

Sambusiti C., Ficara E., Malpei F., Steyer J. P., Carrère H. (2013). Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*. Vol. 55, 449-456.

Sarkar N., Aikat K. (2013). Kinetic study of acid hydrolysis of rice straw. *ISRN Biotechnology.* 1-5.

Sattar A., Arslan C., Ji C., Sattar S., Umair M., Sattar S. (2016). Quantification of temperature effect on batch production of biohydrogen form rice crop wastes in an anaerobic bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 41, 11050-11061.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas en México. Primera etapa: Diagnóstico nacional. 2015.. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346963/Manejo_de_Residuos_Reporte_Ejecutivo.pdf-24-09-209.

Segal L., Creely J. J., Martin-Jr A. E., Conrad C. M. (1959). An empirical method for estimation the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* Vol. 29, 786-794.

Seifert K., Zagroknik R., Stodolny M., Laniecki M. (2018). Biohydrogen production from chewing gum manufacturing residue in a two-step process of dark fermentation and photofermentation. *Renewable Energy.* Vol. 122, 526-532.

Serment-Guerrero J. H., Lara-Rivera E. A., Becerril-Varela K., Suarez-Contreras S., Ramírez-Durán N. (2017). Detección y aislamiento de microorganismos exoelectrógenos a partir de lodos del Río Lerma, Estado de México, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental,* Vol. 33, 617-628.

Sewsynker-Sukai Y., Suinyuy T. N., Kana E. G. (2018). Development of a sequential alkalic salt and dilute acid pretreatment for enhanced sugar recovery from corn cobs. *Energy Conversion and Management.* Vol. 160, 22-30.

Show K Y., Lee D. J., Tay J. H., Lin C. Y., Chang J. S. (2012). Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 37, 15616-15631

Shuvashish Behera, Richa Arona, N. Nandhagopal. Sachin Kumar. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Vol. 36, 91-106.

Singh Renu, Shukla Ashish, Tiwari Sapna, Srivastava Monika. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Vol. 32, 713-728.

Singh S., Cheng G., Sathitsuksanoh N., Wu D., Varanasi P., George A., Balan V., Gao X., Kumar R., Dale B. E., Wyman C. E., Simmons B. A. (2015). Comparison of different biomass pretreatment techniques and their impact on chemistry and structure. *Frontiers in Energy Research*. Vol. 2, 1-12.

Siripong P., Duangporn P., Takata E., Tsutsumi Y. (2016). Phosphoric acid pretreatment of Achyranthes aspera and Sida acuta weed biomass to improve enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology.* Vol. 203, 303-308.

Soares J. F., Confortin T. C., Todero I., Mayer F. D., Mazutti M. A. (2020). Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Vol. 117, 109484.

Solarte-Toro J. C., Romero-García J. M., Martínez-Patiño J. C., Ruiz-Ramos E., Castro-Galiano E., Cardona-Alzate C. A. (2019). Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Vol. 107, 587-601.

Stuart Barbara, (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application. Analytical Techniques in the Sciences. *Editorial Wiley.* Pps: 1-5.

Suárez R. R., Raya P. J. C., Iturriaga F. G. (2015). La trehalosa: Un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México.* Vol. 3, 1-13.

Sun S. L., Sun S. N., Wen J. L., Zhang X. M., Peng F., Sun R. C. (2015). Assessment of integrated process based on hydrothermal and alkaline treatments for enzymatic saccharification of sweet sorghum stems. *Bioresource Technology.* Vol. 175, 473-479.

Swati G., Haldar S., Ganguly A., Chatterjee P. K. (2013). Investigations on the kinetics and thermodynamics of dilute acid hydrolysis of *Parthenium hysterophorus L*. substrate. *Chemical Engineering Journal.* Vol. 229, 111-117.

Swiatek K., Gaag S., Klier A., Kruse A., Sauer J., Steinbach D. (2020). Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: Sugars and Furfural formation. *Catalysts*. Vol. 10, 437-454.

Taherdanak M., Zilouei H., Karimi K. (2016). The effects of Fe^0 and Ni^0 nanoparticles versus Fe^{2+} and Ni^{2+} ions on dark hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 41, 167-173.

Terry L. Miller and M. J. Wolin. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology,* Vol. 27, 985-987.

Timung R., Mohan M., Chilukoti B., Sasmal S., Banerjee T., Goud V. V. (2015). Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic biomass: A comparative study. *Biomass & Bioenergy.* Vol. 81, 9-18.

Tizazu B.Z., Moholkar V. S. (2018). Kinetic and thermodynamic analysis of dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. Vol. 250, 197-203.

Türker Lemi, Gümüs S., Tapan A. (2008). Biohydrogen production: Molecular aspects. *Journal of Scientific and Industrial Research.* Vol. 67, 994-1016.

Vasconcelos Solange M., Pinheiro Santos A. M., Moraes Rocha G. J., Souto Maior A. M. (2013). Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane based biorefinery. *Bioresource Technology.* Vol. 135, 46-52.

Vázquez M., Oliva M., Téllez-Luis S. J., Ramírez J. A. (2007). Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresource Technology.* Vol. 98, 3053-3060.

Wang Q., Hu J., Shen F., Mei Z., Yang G., Zhang Y., Hu Y., Zhang J., Deng. (2016). Pretreating wheat straw by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP): Investigations on pretreatment conditions and structure changes. *Bioresource Technology*. Vol. 199, 245-257.

Wise L. E., Murphy M., D'Adieco A. (1946). Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal,* 122:35-45.

Woiciechowski A. L., Dalmas-Neto C. J., De Souza V. L. P., Carvalho N. D. P., Novak S. A. C., Junior L. L.A., Karp S. G., Zevallos T. L. A., Soccol C. R. (2020). Lignocellulosic biomass: Acid and Alkaline pretreatments and their effect on biomass recalcitrance. Conventional processing and recent advances. *Bioresource Technology.* Vol. 304, 122848.

Wong Y. M., Wu T. Y., Ling T. C., Show P. L., Lee S. Y., Chang J. S., Ibrahim S., Juan J. C. (2018). Evaluating new bio-hydrogen producers: *Clostridium perfringens* strain JJC, *Clostridium bifermentans* strain WYM and *Clostridium* sp. Strain Ade.TY. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 125, 590-598.

Xiang Q., Lee Y. Y., Pettersson P. O., Torget R. W. (2003). Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of α-cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* Vol. 107, 505-514.

Xu F., Yu J., Tesso T., Dowell F., Wang D. (2013). Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques. A mini-review. *Appl Energy.* Vol. 107, 94-99.

Ya-Chieh Li, Yung-Feng Liu, Chen-Yeon Chu, Pao-Long Chang, Chiung-Wen Hsu, Ping-Jei Lin, Shu-Yii Wu. (2012). Techno-economic evaluation of biohydrogen production from wastewater and agricultural waste. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 37, 15704-15710.

Yang M., Kuittinen S., Zhang J., Keinanen M., Pappinen A. (2013). Effect of dilute acid pretreatment on the conversion of barley straw grains to fermentable sugars. *Bioresource Technology.* Vol. 146, 444-450..

Yasin N. H. M., Mumtaz T., Hassan M. A., Rahman N. A. A. (2013). Food waste and food processing waste for biohydrogen production. A review. *Journal of Environmental Management.* Vol. 130, 375-385.

Yi Zheng, Jia Zhao, Fuqing Xu, Yebo Li. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*. Vol. 42, 35-53.

Yu H., Xiao W., Han L., Huang G. (2019). Characterization of Mechanical pulverization / phosphoric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology.* Vol. 282, 69-74.

Yu-Loong L., Ta Y. W., Khang A. T., Yung S. L., Fee F. S., Jamaliah M. J., Abdul W. M., Wen H. T. (2015). Recent advances in application of inorganic salt pretreatment for transforming lignocellulosic biomass into reducing sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 68, 8349-8363.

Zhang H., Jin Q., Xu R., Yan L., Lin Z. (2011). Kinetic studies of xylan hydrolysis of corn stover in a dilute acid cycle spray flow through reactor. *Front. Chem Sci Eng.* Vol. 5, 252-257.

Zhang J., Zhang J., Lin L., Chen T., Zhang J., Liu S., Li Z., Ouyang P. (2009). Dissolution of microcrystalline cellulose in phosphoric acid. Molecular changes and kinetics. *Molecules.* Vol. 14, 5027-541.

Zhao X., Xing D., Fu N., Liu B., Ren N. (2011). Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerincki* RZF-1108. *Bioresource Technology*. Vol. 102, 8432-8436.

Zhao X., Wang L., Lu X., Zhang S. (2014). Pretreatment of corn stover with diluted acetic acid for enhancement of acidogenic fermentation. *Bioresource Technology.* Vol. 158, 12-18.

Zhao Y., Wang Y., Zhu J. Y., Ragauskas A., Deng Y. (2008). Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 99, 1320-1328.

Zhu Z., Rezende C. A., Simister R., McQueen-Mason X. J., Macquarrie D. J., Polikarpov I., Gomez L. D. (2016). Efficient sugar production from sugar cane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. *Biomass & Bioenergy.* Vol. 93, 269-278.

Zu S., Li W. Z., Zhang M., Li Z., Wang Z., Jameel H., Chang H. M. (2014). Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. *Bioresource Technology.* Vol. 152, 364-370.

ANEXOS

Anexo A. Técnicas analíticas para sólidos

En este apartado se presentan las técnicas usadas para las determinaciones de humedad, SVT´s, extractivos, holocelulosa, lignina y análisis mediante espectroscopia de IR y DRX.

Anexo A1. Determinación de pH

La determinación de pH en sólidos se realizó conforme a la NMX-AA-25-1984 (SEMARNAT, 2008). 5 g de rastrojo seco se mezclaron con 90 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL, posteriormente se pusieron en agitación durante 10 minutos y se dejaron reposar por 30 minutos más. La medida se hizo en un potenciómetro marca *"Conductronic PC18"* con un electrodo de calomel, el cual fue calibrado previamente con buffers de pH 4 y 7. La determinación se llevó a cabo por duplicado.

Anexo A2. Determinación de humedad

El porcentaje de humedad presente en los residuos agrícolas se determinó por duplicado en cápsulas de aluminio las cuales fueron previamente colocadas a peso constante. La técnica utilizada fue la establecida en la norma NMX-AA-016-1984 publicada por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SEMARNAT, 2008).

El primer paso fue la calibración de la balanza analítica, después utilizando unas pinzas se colocó en cada cápsula de aluminio 1 g de residuo previamente triturado a un tamaño de partícula menor a 250 µm. Las muestras se secaron a 45°C durante 2 horas en una estufa, se colocaron en un desecador por media hora y se pesaron. La muestra se secó nuevamente a 45°C durante media hora y se colocó en un desecador por lapso de 15 minutos, la muestra se pesó y se registró el valor. El procedimiento se repitió hasta alcanzar peso constante en cada una de las muestras. Para el pesado se consideraron cuatro dígitos de la balanza analítica, después del

punto decimal. El porcentaje de humedad se determinó mediante el uso de la Ecuación A.1, los valores de G y G_1 se obtuvieron al restar el peso de la cápsula de aluminio:

$$\%\mathbf{H} = \frac{(\mathbf{G} - \mathbf{G_1})}{\mathbf{G}} * \mathbf{100} \qquad \text{Ec. A.1}$$

Dónde:

%H: Porcentaje de humedad
G: Peso de la muestra húmeda en g
G_1: Peso de la muestra seca en g

Anexo A3. Determinación de SVT

El porcentaje de SVT se determinó por duplicado conforme a la técnica 2540G del Standard Methods (APHA, 1998). Para ello se utilizaron las cápsulas con las muestras de los residuos secos (G_1) de la determinación de humedad. Estas cápsulas se introdujeron en una mufla y se dejaron calcinar a 550°C durante una hora. Al término de este tiempo, se redujo la temperatura de la mufla, lentamente, mediante su control automático a 200°C, las muestras se transfirieron a una estufa la cual se había estabilizado previamente a 50°C y se les dejó ahí por media hora, finalmente se colocaron en un desecador durante 30 minutos y se pesaron (G_2). Para determinar el porcentaje de SVT se utilizó la Ecuación A.2, tomando en cuenta que para obtener el valor de G_1 y G_2 se debe restar el peso de la cápsula de aluminio.

$$\%\mathbf{SVT} = \frac{(\mathbf{G_1} - \mathbf{G_2})}{\mathbf{G_1}} * \mathbf{100} \qquad \text{Ec. A.2}$$

Dónde:

%SVT: Porcentaje de Sólidos Volátiles Totales
G_1: Peso de la muestra seca en g
G_2: Peso de la muestra después de la calcinación en g

Anexo A4. Preparación para sustrato libre de extractivos

Para realizar las determinaciones de holocelulosa y lignina, primero se deben eliminar los extractivos de los residuos sólidos. Los extractivos consisten de materiales que son solubles en solventes polares y su eliminación se hizo de acuerdo con el método estándar para la preparación de la madera libre de extraíbles ASTM D1105-56 reportado por Colín-Urieta *et al.* (2007).

Para ello se pesaron 4 g de residuo agrícola previamente secado en un cartucho de extracción, con ayuda de pinzas se colocó el cartucho en el cuerpo extractor del sistema de reflujo Soxhlet, se puso a reflujo con 60 mL de una mezcla 1:2 de etanol – tolueno (20 – 40 mL) hasta no observar coloración en el sifón del cuerpo del extractor. El cartucho se secó a temperatura ambiente durante una noche y se colocó a reflujo con 60 mL de agua destilada, esto con la finalidad de eliminar los rastros de solvente, el reflujo se detuvo cuando el bulbo del sifón no presentó coloración. Los cartuchos se sacaron del cuerpo extractor, se dejaron secando a temperatura ambiente durante una noche, posteriormente cada una de las muestras sólidas se recuperó de los cartuchos, se colocaron en vidrios de reloj y se secaron a 50 °C durante 24 horas.

Anexo A5. Determinación de holocelulosa

La determinación de holocelulosa se realizó por duplicado de acuerdo al método del clorito (Wise *et al.,* 1946), el cual se basa en la acción del dióxido de cloro cuyos productos de reacción acuosa y caliente hacen que la lignina se separe en forma soluble. El dióxido de cloro se genera in situ utilizando clorito de sodio y ácido acético, las Ecuaciones A.3 y A.4 muestran la síntesis del dióxido de cloro.

$$\mathbf{NaClO_2 + CH_3COOH \rightarrow CH_3COONa + HClO_2} \qquad \text{Ec. A.3}$$

$$\mathbf{4HClO_2 \rightarrow 2ClO_2 + HClO_3 + HCl + H_2O} \qquad \text{Ec. A.4}$$

1 g de la muestra seca y libre de extractivos (M_1) se pesó y se colocó en un recipiente con una solución de 0.3 g de clorito de sodio en 32 mL de agua destilada, a la que previamente se le había añadido 2 gotas de ácido acético. Los recipientes preparados se pusieron a reaccionar en un baño de calentamiento a 75ºC durante 4 horas. Cada 30 minutos se agitaron y cada hora se les añadió lentamente 2 gotas de ácido acético y 0.32 g de clorito de sodio. Una vez enfriados los recipientes a temperatura ambiente, las muestras sometidas a reacción se filtraron utilizando papel filtro previamente pesado. Cada una de las muestras se lavó con 200 mL de agua caliente (hasta tener color pálido) y posteriormente con 100 mL de acetona. Con ayuda de unas pinzas se colocó cada papel filtro con muestra dentro de una capsula de aluminio calcinada y previamente pesada (M_2) y se colocó en una estufa a 40ºC durante 3 días. Al término del secado, las muestras se colocaron en un desecador por 30 minutos y se pesó rápidamente para evitar la hidratación de la holocelulosa. La Ecuación A.5 muestra el cálculo para la determinación del porcentaje de holocelulosa.

$$\%\mathbf{Hol} = \frac{(\mathbf{M_3} - \mathbf{M_2})}{\mathbf{M_1}} * \mathbf{100} \qquad \text{Ec. A.5}$$

Dónde:

%Hol: Porcentaje de holocelulosa
M_1: Peso de la muestra seca en g
M_2: Peso de la capsula y del papel filtro
M_3: Peso de la capsula, papel filtro y muestra después de secado

Anexo A6. Determinación de lignina

La determinación de lignina se realizó de acuerdo al método ASTM D1106 – 56 reportado por Colín-Urieta *et al.* (2007). Para ello se pesó 1 g de muestra seca libre de extractivos (M_1) en un vaso de precipitado de 500 mL, se adicionaron 25 mL de ácido sulfúrico al 72% (v/v) y 2.5 mL de ácido bromhídrico al 40% (v/v) y se dejó reposar por 2 horas agitándola cada 30 minutos. Posteriormente se le adicionaron

100 mL de agua destilada y se hirvió durante 5 minutos. La muestra contenida en el vaso de precitado se filtró con papel filtro previamente pesado, y se lavó con agua destilada caliente hasta pH neutro. Con ayuda de pinzas se colocó el papel filtro en una capsula previamente calcinada y pesada (M_2), y se secó a 45ºC durante 24 horas. Al término del secado, las muestras se colocaron en un desecador por 30 minutos. La Ecuación A.6 presenta el cálculo para la determinación del porcentaje de lignina.

$$\%\mathbf{Lig} = \frac{(\mathbf{M_3} - \mathbf{M_2})}{\mathbf{M_1}} * \mathbf{100} \qquad \text{Ec. A.6}$$

Dónde:

%Lig: Porcentaje de lignina
M_1: Peso de la muestra seca en g
M_2: Peso de la capsula y del papel filtro
M_3: Peso de la capsula, papel filtro y muestra después de secado

Anexo A7. Análisis por FTIR

Los residuos agrícolas antes y después de la hidrólisis ácida se secaron a 45°C durante una noche y se trituraron con ayuda de un mortero. Las muestras se analizaron en un espectrómetro FTIR marca *"Varian 640"* utilizando un rango espectral de 500 a 4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1}.

Anexo A8. Análisis por DRX

El análisis de cristalinidad se llevó a cabo en un difractometro D8 discovery operado con un potencial de 35 kV y utilizando una radiación kα de 1.5418 Aº a partir de un electrodo de cobre. El tamaño de pasó se ajustó a 0.03º y se utilizó un rango de difracción 2θ de 5º a 80º.

Anexo B. Técnicas analíticas para líquidos

Las determinaciones de pH y de azúcares reductores en el hidrolizado se presentan en este apartado.

Anexo B1. Determinación de pH

El pH se determinó en los hidrolizados de cada uno de los experimentos, utilizando un potenciómetro marca *"Conductronic PC18"* con un electrodo de calomel para medir el pH y otro de acero inoxidable para determinar la temperatura. Las lecturas se tomaron por triplicado, registrando el pH y la temperatura de los hidrolizados.

Anexo B2. Determinación de azúcares reductores

Para la cuantificación de azúcares reductores se utilizó el método del ácido 3-5 dinitro salicílico (DNS) primeramente reportado por Miller (1959), el cual de acuerdo con Chaplin (1986), se basa en la reducción del ácido 3-5 dinitro salicílico por los azúcares cíclicos que poseen un grupo carbonilo en su estructura (azúcar reductor) al ácido 3-amino 5-nitrosalicílico, cuya presencia puede detectarse por la lectura de absorbancia en la zona de 540 a 570 nm. La Figura B1 muestra la reacción redox llevada a cabo para la cuantificación de azúcares reductores mediante DNS.

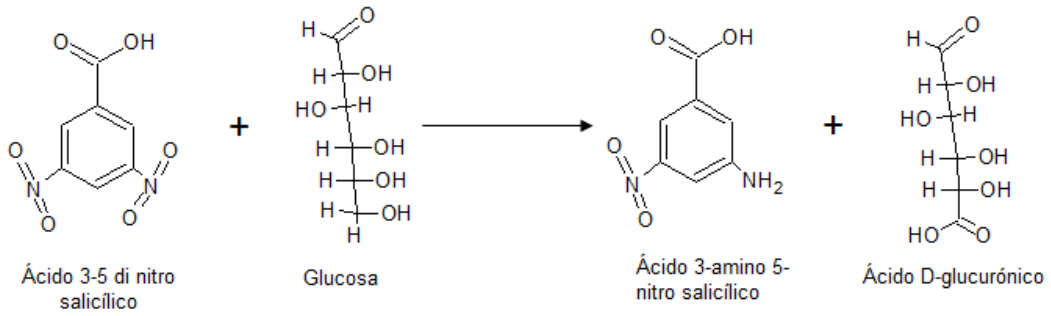


Figura B1. Reducción del ácido 3-5 dinitro salicílico para la cuantificación de azúcares

El reactivo DNS se preparó agregando 30 g de tartrato de sodio y potasio tetra-hidratado ($KNaC_4H_4O_6 * 4H_2O$) en una solución de 2 M de NaOH, posteriormente se agregó 1 g de ácido dinitro salicílico ($C_7H_4N_2O_7$), se aforó con agua destilada hasta un volumen final de 100 mL y se almacenó en ausencia de luz.

Las muestras empleadas para la determinación de azúcares reductores fueron los hidrolizados, de los cuales se tomaron 300 µL y se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 3 mL. Las alícuotas obtenidas se ajustaron a un pH superior a 8 con NaOH a fin de evitar precipitación y decoloración. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 rpm en una centrifuga marca *"Hettich Zentrifuegen Universal 32R"* durante 5 minutos, se tomaron 500 µL del sobrenadante y se mezclaron en un tubo de vidrio de 12 mL con 500 µL de reactivo DNS. Los tubos se colocaron en baño María a 92°C durante 5 minutos, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se diluyeron con 10 mL de agua destilada. La absorbancia se determinó contra un blanco utilizando una longitud de onda de 540 nm y se calculó la concentración de azúcares en relación a una curva de calibración, la cual se realizó utilizando glucosa como azúcar patrón. La curva de calibración se muestra en la Figura B2.

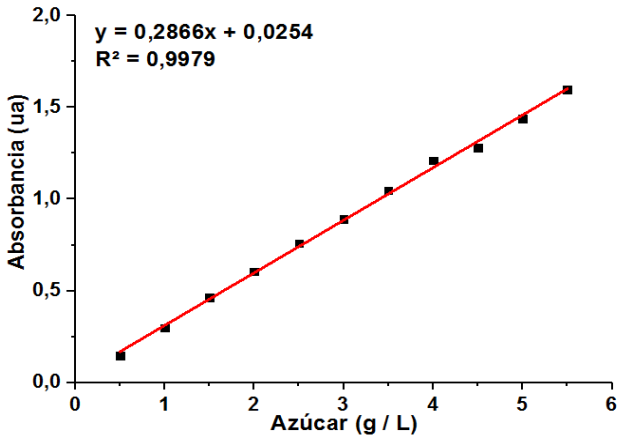


Figura B2. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores

Anexo B3. Determinación de furfural

200 µL de cada uno de los hidrolizados se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 10 mL, posteriormente las muestras se homogenizaron y se analizaron en un espectrómetro Uv-Vis *Evolution Array Thermo Scientific* utilizando una longitud de onda de 277 nm. Furfural grado reactivo (ensayo > 99.99%) fue

utilizado para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia y para la preparación de la curva de calibración, la cual se muestra en la Figura B3

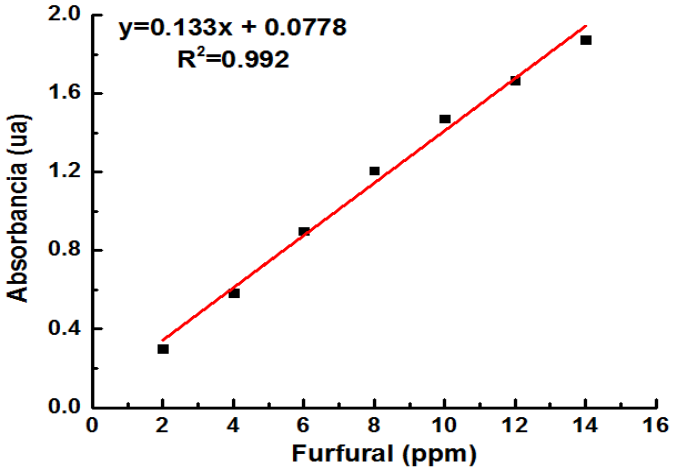


Figura B3. Curva de calibración para la determinación de furfural

Anexo B4. Determinación de HMF

La preparación de las muestras previa a la determinación de HMF se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado anterior. Una vez diluidas las muestras se leyó su absorbancia en un espectrómetro Uv-Vis *Evolution Array Thermo Scientific* utilizando una longitud de onda de 284 nm. HMF grado patrón (ensayo > 99.99%) fue utilizado para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia y para la preparación de la curva de calibración, la cual se muestra en la Figura B4.

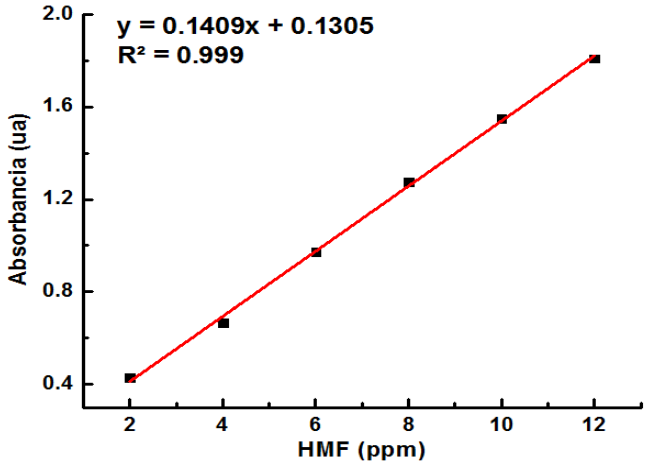


Figura B4. Curva de calibración para la determinación de HMF

Anexo B5. Conteo de bacterias

Para el análisis del crecimiento de los microorganismos se utilizó la cuenta directa al microscopio empleando la cámara de Petroff-Hausser y tomando como base lo reportado por Madigan *et al.* (2003). Para ello se tomó 0.05 mL de cada uno de los viales utilizados para la fermentación y se colocó sobre la cámara de conteo, la cual posteriormente fue observada en un microscopio de contraste de fases. La cámara Petroff-Hausser posee una rejilla de 1 mm^2 formada a su vez por 400 cuadros pequeños situados dentro de 25 cuadros más grandes, la distancia entre la cámara y el cubreobjetos es de 0.02 mm. De manera aleatoria, se contaron las células en 5 de los cuadros grandes y se calculó su promedio. La cantidad de bacterias por unidad de volumen se correlacionó con la profundidad y área de la rejilla mediante la ecuación B.1.

$$\frac{\boldsymbol{Cel}}{\boldsymbol{mL}} = \frac{\boldsymbol{Cel\,prom}}{\mathbf{16}} \left(\mathbf{400} * \mathbf{50} * \mathbf{1000}\right) \qquad \text{Ec. B.1}$$

En donde 16 corresponde al número de cuadros pequeños dentro de cada uno de los cuadros más grandes, 400 hace referencia al número total de cuadros pequeños, 50 es un factor de conversión dado por la distancia entre la cámara y el cubreobjetos (1 / 0.02 = 50) y 1000 es la conversión de mm^3 a cm^3.

Anexo C. Análisis por cromatografía de gases

Para la caracterización de biogás y cuantificación de biohidrógeno se empleó el cromatógrafo de gases marca *"Varian 3600"* ubicado en la Gerencia de Ciencias Básicas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). Éste posee 2 detectores, uno de conductividad térmica (TCD) y uno de ionización de flama (FID) ambos sensibles a detecciones de hidrocarburos, el detector empleado en el presente trabajo fue el TCD. El sistema de inyección del cromatógrafo es automático y ajustado a 250 µL, mientras que el gas de arrastre utilizado en todas las determinaciones fue Argón (Ar) grado cromatográfico. Las temperaturas a las cuales el equipo se operó fueron: 100°C temperatura de columna; 110°C temperatura de inyector y detector, mientras que el tiempo de retención fue de 2 minutos.

La curva de calibración se preparó utilizando H_2 de ultra alta pureza, el cual se mezcló en proporciones conocidas con Ar dentro de una jeringa, posteriormente se inyectó la mezcla gaseosa en el cromatógrafo y se determinó por triplicado los tiempos de retención y las áreas bajo la curva asociadas al porcentaje en volumen de H_2. La curva de calibración empleada para el análisis de H_2 se muestra en la Figura C1.

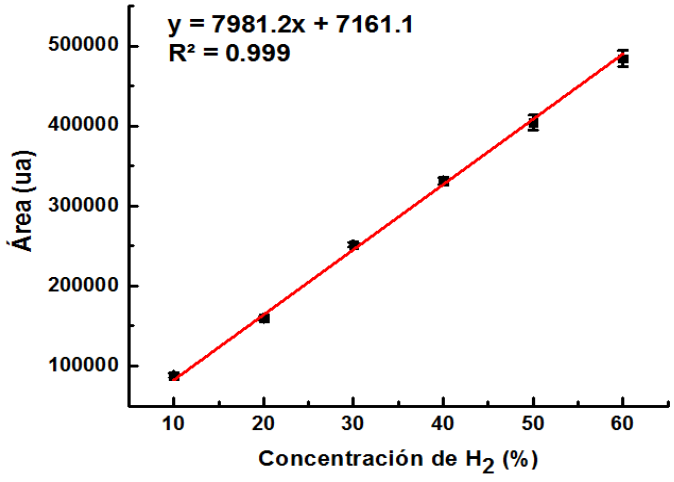


Figura C1. Curva de calibración empleada para la cuantificación de H_2

Anexo D. Diseño geométrico y construcción del reactor de hidrólisis tipo tanque agitado

El volumen de trabajo fue de 1.5 litros. A partir de dicho volumen se calculó el diámetro y el largo del reactor utilizando las Ecuaciones D.1 y D.2.

$$\boldsymbol{2D = L} \qquad \text{Ec. D.1}$$

$$\boldsymbol{V = \frac{\pi}{4} 3D^3} \qquad \text{Ec. D.2}$$

El diámetro sugerido fue de 10 cm, por lo cual la longitud calculada fue de 20 cm y un volumen total de 1.57 L. Para el cálculo de la altura total del tanque se utilizó la Ecuación D.3, en la cual el término h_d es conocido como la altura necesaria del gas o *headspace*. Este término generalmente abarca una dimensión del 30 al 50% de la altura del fluido, a fin de disminuir las pérdidas debidas a la evaporación de la fase líquida, se consideró un valor h_d de 25%. La altura total del tanque se calculó de 25 cm.

$$\boldsymbol{H = L + hd} \qquad \text{Ec. D.3}$$

Para el cálculo de los deflectores se utilizó la Ecuación D.4, la cual de acuerdo a lo establecido en literatura especializada, éstos tienen un grosor de 1/12 del diámetro total del tanque y por convención suelen colocarse entre 4 y 6. Con base al diámetro del tanque (10 cm), el grosor del deflector es de 0.83 cm

$$\boldsymbol{J = \frac{D}{12}} \qquad \text{Ec. D.4}$$

La distancia entre los deflectores y la pared del biorreactor suele tener un valor de 0.15J, es decir, 1/7 del grosor de los deflectores (Ecuación D.5). La distancia calculada fue de 12 mm.

$$E = .15J$$ Ec. D.5

Para el sistema de agitación se consideró la relación mostrada en la Ecuación D.6, la cual utiliza un factor de 0.30 con respecto al diámetro total del tanque. Cabe mencionar que en el sistema de agitación se contempla el uso de un agitador helicoidal con un diámetro de 3.5 cm. Las dimensiones calculadas del tanque agitado se muestran en la Figura D1.

$$Da = .30D$$ Ec. D.6

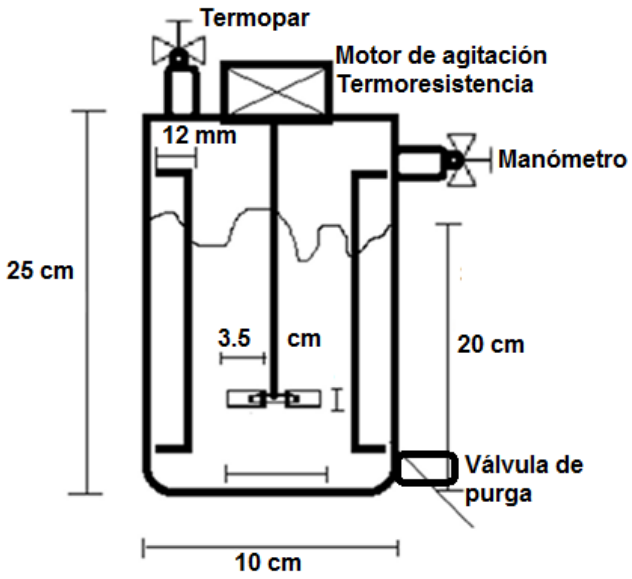


Figura D1. Dimensiones del reactor tipo tanque agitado a escala laboratorio

El reactor de tipo tanque agitado se diseñó a fin de incrementar la eficiencia de producción de azúcares mediante hidrólisis ácida, tomando como base las consideraciones geométricas previamente descritas. El reactor consta de un cuerpo y dos tapas de acero inoxidable con un grosor de 10 mm, un volumen total de 1.97 litros y un volumen de trabajo de 1.5 litros. En la parte inferior tiene una válvula de purga de 1/2” de diámetros, mientras que en la parte superior tiene una válvula de alimentación de ¾”, una entrada de ½” para la termoresistencia y una de 1/4” para el termopar, la temperatura dentro del reactor se controla con ayuda de un sensor electrónico acoplado tanto a la termoresistencia como al termopar. El sistema de

agitación constará de un motor eléctrico acoplado a una varilla de acero inoxidable a la cual se le acondicionarán cierto número de propelas con distintas aspas. La selección tanto del número de propelas como de aspas se realizará tomando como base los resultados obtenidos en la simulación dinámica. La Figura D2 muestra el reactor de hidrólisis a escala laboratorio.

Figura D2. Reactor de hidrólisis tipo tanque agitado a escala laboratorio

Previo a la construcción del sistema de agitación, se estudiaron los perfiles de, temperatura y de concentración utilizando el software Ansys, para ello el reactor se dibujó en AutoCAD proponiendo distintos tipos de agitadores. La Figura D3 muestra la parte interna del reactor de hidrólisis tipo taque agitado diseñado en AutoCAD.

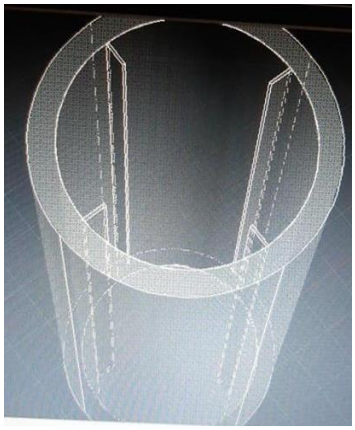


Figura D3. Diseño en AutoCAD del reactor de hidrólisis tipo tanque agitado

Anexo E. Contribución científica

Artículos de investigación

1.- Low temperature hydrochloric acid hydrolysis of corn stover: Kinetic, thermodynamics and characterization.

J. C. Gómora-Hernández, M. C. Carreño-de-León, N. Flores-Álamo

Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2020, Vol.19, No. 3, 1425-1437.

2.- Kinetic and thermodynamic study of corncob hydrolysis in phosphoric acid with low yield of bacterial inhibitors.

J. C. Gómora-Hernández, M. del C. Carreño-De-León, N. Flores-Álamo, M. del C. Hernández-Berriel, S. M. Fernández-Valverde

Biomass & Bioenergy. Artículo en revisión.

3.- Effect of temperature, acid concentration and reaction time on phosphoric acid hydrolysis of corn cobs.

J. C. Gómora-Hernández, N. Flores-Álamo, J. H. Serment-Guerrero, M. del C. Carreño-De-León.

Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. Artículo en Revisión.

Artículos en memorias de congreso

1.- Dilute phosphoric acid hydrolysis of lignocelluloses. Effect of acid concentration and biomass composition

J. C. Gómora-Hernández, M. del C. Carreño-De-León, N. Flores-Álamo, M. del C. Hernández-Berriel.

Frontier Science in Engineering: Solutions that benefit Society. Proceedings of the First International Conference on Engineering, TecNM / ITToluca (Enero, 2020).

ISBN: 978-87-18080-36-4, pp. 65-73.

2.- Dilute phosphoric acid hydrolysis of stem of faba bean for reducing sugar production

J. C. Gómora Hernández, M. del C. Carreño de León, S. M. Fernández Valverde.

Proceedings of the International Congress of the Mexican Hydrogen Society XVIII (Septiembre, 2018). ISSN: 2448-7120, pp. 526-535.

3.- Determination of kinetic and thermodynamic parameters of reducing sugar production by dilute acid hydrolysis of corncob

Gómora Hernández Julio César, Carreño de León María del Carmen.

Proceedings of International conference on polymers and advanced materials.

POLYMAT (Octubre, 2017). ISSN: 2448-590X.

4.- Reducing sugar recovery by acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production

J. C. Gómora Hernández, M. C. Hernández Berriel, S. M. Fernández Valverde.

XVII International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Book of proceedings (Septiembre, 2017). ISSN: 2448-7120, pp. 365-375.

5.- Biohydrogen production by anaerobic digestion of corn cob and stem of faba bean hydrolysates

J. C. Gómora-Hernández, D. Alcántara-Díaz, S. M. Fernández-Valverde, M. C. Hernández-Berriel.

2016 XVI International Congress of the Mexican Hydrogen Society (CSMH).

Proceedings of IEEE. DOI: 10.1109/CSMH.2016.7947659

6. Efecto de la extracción orgánica en la determinación de holocelulosa en rastrojos agrícolas

Julio César Gómora Hernández, María del Consuelo Hernández Berriel, María del Carmen Carreño de León, María del Consuelo Mañón Salas.

Encuentro de Expertos en Residuos Sólidos (Octubre, 2016).

ISSN: 2395-8170, pp.234-243.