

S.E.P.

S.E.S.T.N.M.

TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“OBTENCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR
DE RESIDUOS AGRÍCOLAS PRE-
HIDROLIZADOS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CINEICAS EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

PRESENTA:

**JULIO CÉSAR GÓMORA HERNÁNDEZ
No. CONTROL: 0628M0629**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CONSUELO HERNÁNDEZ BERRIEL (ITT)

CODIRECTOR DE TESIS:

DRA. SUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE (ININ)

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, A 06 DE JULIO DE 2016

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Toluca

Metepec, Méx., **27/Junio/2016**

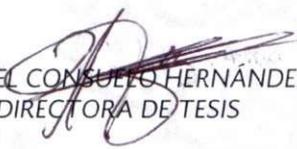
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

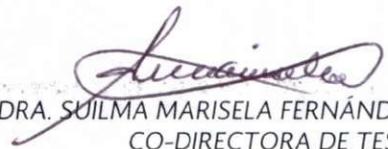
DEPI-395-878/2016

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

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **"OBTENCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE RESIDUOS AGRICOLAS PREHIDROLIZADOS"**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta el C. JULIO CÉSAR GÓMORA HERNÁNDEZ, con número de control 0628M0629 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


DRA. MARÍA DEL CONSUELO HERNÁNDEZ BERRIEL
DIRECTORA DE TESIS


DRA. SULMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE
CO-DIRECTORA DE TESIS


DRA. MARÍA DEL CARMEN CARREÑO DE LEÓN
REVISORA


DR. ISAÍAS DE LA ROSA GÓMEZ
REVISOR


M. en C. DAVID ALCÁNTARA DÍAZ
REVISOR



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, C.P. 52149,
Metepec, Estado de México. Tels. Dirección (01722) 208 7205, Subd. Académica 208 7207,
Subd. de Planeación 208 7206, Subd. Administrativa 208 7208, Conmut. 208 72 00
e-mail: info@toluca.tecnm.mx, www.toluca.tecnm.mx





Meteppec, Méx., **01/Julio/2016**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-1007/2016

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. JULIO CÉSAR GÓMORA HERNÁNDEZ
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica 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 "OBTENCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS PREHIDROLIZADOS" 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.

ATENTAMENTE

Educación. Integridad y Ciencia



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

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JLGR/magj



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 Consuelo Hernández Berriel y con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para el proyecto titulado “Obtención de biohidrógeno a partir de residuos agrícolas y de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos pre-hidrolizados”

Al mismo tiempo, la investigación se realizó en el Departamento de Química de la Gerencia de Ciencias Básicas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares dentro de los proyectos CB-304 y QU-001 bajo la asesoría de la Dra. Suilma Marisela Fernández Valverde y en el Departamento de Radiobiología con invaluable apoyo del M. en C. David Alcántara Díaz.

“He esperado miles de millones de años para que el milagro de la vida se hiciera presente en mí, así que ahora que estoy vivo no pienso perder ni un solo instante de esta hermosa y efímera existencia”

“No me siento obligado a creer que el mismo Dios que nos otorgó razón, ciencia e intelecto, sea quien trate de que olvidemos su uso”

Galileo Galilei

“Aunque este universo poseemos nada tenemos, pues no podemos conocer lo desconocido si nos aferramos a lo conocidos”

Eric Fisher

AGRADECIMIENTOS

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 MIS PADRES

Anastacio Gómora Pichardo y Hermelinda Hernández Guzmán por sus invaluable consejos, tiempo, confianza, amor, educación, esfuerzo y apoyo incondicional, quienes me han impulsado día tras día a ser mejor en todo aspecto, a buscar nobles ideales, a no dejarme caer y a ser feliz pese a las adversidades. Gracias por la educación, el tiempo y la confianza. Como todo lo que he alcanzado en la vida este logro es suyo también.

A MI HERMANA Y SOBRINOS

Claudia Gabriela Gómora Hernández por todas las experiencias que hemos compartido y a mis sobrinos Gugus y Jeshua por las alegrías que me han regalado, por hacer más linda la vida y por recordarme 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

Agradezco el cariño y los momentos compartidos. La confianza y las palabras de aliento que me motivaron a seguir adelante, así como la dicha de conocerlos.

A LA DRA. SUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE

Por regalarme la oportunidad de trabajar con ella, ha sido una experiencia enriquecedora e invaluable. Por su tiempo, asesoría, consejos académicos, amistad, y paciencia. Por forjar en mi un sentido autodidacta y curioso, por despertar el cariño hacia la investigación. Con enorme cariño, respeto, admiración y gratitud.

A LA DRA. MARÍA DEL CONSUELO HERNÁNDEZ BERRIEL

Agradezco inmensamente su amistad, confianza y contribución en mi formación. Muchas gracias por el tiempo y el interés dedicado al proyecto, por la paciencia. Con especial cariño y respeto.

AL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

Por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios, así como por el uso de las instalaciones y laboratorios. Con mucha gratitud para la Dra. María del Carmen Carreño de León y el Dr. Isaías de la Rosa Gómez por su apoyo incondicional, por poner todo de su parte para que este trabajo saliera de la mejor manera y por su conocimiento compartido. Gracias al Laboratorio de Ingeniería Química por el préstamo de material y reactivos.

AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

Por permitirme realizar parte de la investigación en sus instalaciones, por la beca alimenticia y de transporte, por las experiencias adquiridas y porque mi estadía deja huella en mi vida. A los técnicos del Departamento de Química por su oportuna participación en el análisis de muestras. Al Departamento de Radiobiología por permitirme trabajar en sus laboratorios y en especial al M. en C. David Alcántara Díaz cuya asesoría fue esencial para el análisis microbiológico. Al Dr. Pedro Morales por el préstamo del microscopio y al centro de Información cuya ayuda, amabilidad y gentileza fue importante.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Por la beca otorgada para los estudios de maestría.

A todos aquellos con quienes tuve la dicha de interactuar, a mis amig@s, conocidos, compañeros, colegas, maestros que me brindaron consejos, palabras de aliento y motivación a través de una sonrisa. Gracias infinitas por permitirme conocerlos y aprender de cada uno de ustedes.

RESUMEN

Los residuos agrícolas predominantes en el Estado de México son los derivados de la cosecha del haba y del maíz, los cuales no son tratados adecuadamente y contribuyen al deterioro ambiental y de la salud del hombre. Estos residuos poseen un alto contenido de celulosa y hemicelulosa, la cual puede ser aprovechada para la obtención de productos de valor agregado siempre y cuando dichos carbohidratos sean transformados en azúcares de bajo peso molecular. El presente trabajo tiene como objetivo la producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de rastrojo de tallo y de maíz, determinando a su vez las condiciones de operación que favorecen la depolimerización de la lignocelulosa. Las hidrólisis se realizaron con H_3PO_4 variando la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de reacción, la cuantificación de azúcares se llevó a cabo mediante la técnica DNS y el sólido residual se analizó mediante espectroscopia de IR y gravimetría. Para la fermentación se utilizaron viales de 20 mL y las bacterias *Clostridium butyricum* y *Enterobacter cloacae*, el biohidrógeno se determinó mediante cromatografía de gases y el número de células se obtuvo con cuenta directa al microscopio.

Cada uno de los rastrojos mostró la mayor producción de azúcares con 7%v H_3PO_4 y 130°C después de 120 minutos, siendo el olote de maíz el material que alcanzó una mayor conversión de holocelulosa a azúcar (65.4%) y el mejor rendimiento; 42.7 g azúcar/100 g olote. La producción de azúcares de cada rastrojo se ajustó satisfactoriamente al modelo cinético de Saeman y de primer orden, mientras que la degradación de holocelulosa tuvo un comportamiento a fin con la ecuación cinética de orden uno. El análisis por IR mostró la degradación de carbohidratos debido a la interacción con el ácido.

El biohidrógeno derivado de la fermentación comenzó a producirse después de 11 horas, alcanzando rendimientos de 0.33 y 0.52 mol H_2 /mol hexosa para el tallo de haba y el olote respectivamente.

ABSTRACT

The predominant agricultural wastes in State of Mexico are faba bean stalk and corn stover, these residues are disposed in open dumps or they are burned contributing to negative environmental impact and affection in human health. Agricultural wastes are composed mainly of cellulose and hemicellulose, which can be used for value-add products generation if they are be properly treated and transformed into fermentable sugars. The aim of this work was to produce biohydrogen from faba bean stalk and corn stover, determining operational conditions that improve the depolymerization of the lignocellulosic fraction. Hydrolysis was carried out with H_3PO_4 , the analyzed factors were temperature, acid concentration and reaction time, while responses data were sugar yield, hydrolyzed percentage and mass loss of holocelulosic fraction. The total amount of sugar was determined by DNS method, residual solid was analyzed by IR spectroscopy and gravimetry. For fermentation, sealed vials of 20 mL of effective volumen was used as bioreactors, an inoculum of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter cloacae* was employed and the composition of biogas was determined by gas chromatography. Finally, the cell growht was monitored using a Petroff-Hausser counting chamber.

In every agricultural wastes the maximum sugar yield was found with 7%v H_3PO_4 , 130°C and 120 minutes. Corncob reached the highest holocelulose to saccharide conversion yield of 65.4%, value that corresponds to 42.7 g sugar/100 g corncob. The production of sugars behavior was adjusted to Saeman's model and first order kinetic equation, while holocelulose decomposition was studied using first order reaction. IR analysis showed the decomposition of holocelulosic fraction due to interaction between biomass and acid. Both, faba bean and corncob hydrolyzate's fermentation showed cell growth after 4 hours and pH declined at the end of the process. Furthermore, biohydrogen production started after 11 hours, reaching the maximum yield of 0.33 and 0.52 mol H_2 /mol hexose for faba bean stalk and corncob respectively.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE GENERAL	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tablas	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1. FUNDAMENTOS	3
1.1 Residuos sólidos	3
1.1.1 Residuos Agrícolas	3
1.1.2 Residuos de lignocelulosa	5
1.2 Degradación de lignocelulosa	7
1.2.1 Pretratamiento de lignocelulosa	8
1.2.2 Tipos de pretratamiento	9
1.2.3 Pretratamiento ácido	10
1.2.4 Azúcares fermentables e inhibidores	14
1.2.5 Hidrólisis de celulosa	16
1.3 Biohidrógeno	17
1.3.1 Mecanismos para la producción de biohidrógeno	17
1.3.2 Producción de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia	19
1.3.3 Ventajas y desventajas de la fermentación anaerobia	21
1.3.4 Factores que afectan la producción de biohidrógeno	22
1.3.5 Microorganismos productores de biohidrógeno	27
1.3.6 Perspectivas de la producción y aplicación del biohidrógeno	31
2. METODOLOGÍA	34
2.1 Preservación y crecimiento de cepas	34
2.2 Obtención y caracterización de residuos agrícolas	36
2.3 Hidrólisis ácida de los residuos agrícolas	38
2.3.1 Cinética de degradación de holocelulosa	39
2.4 Montaje y operación de biorreactores escala laboratorio	40
2.5 Determinaciones analíticas	42
3. RESULTADOS	44
3.1 Caracterización de los residuos agrícolas	44
3.1.1 Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de carbohidratos en residuos agrícolas vírgenes	45
3.1.2 Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de holocelulosa en desechos agrícolas hidrolizados	49

3.2	Hidrólisis ácida de tallo de haba	52
3.2.1	Degradación de holocelulosa, lignina y SVT's	52
3.2.2	Determinación de azúcares reductores y factor de severidad	56
3.2.3	Degradación de holocelulosa	62
3.2.4	Análisis IR del tallo de haba hidrolizado	66
3.3	Hidrólisis ácida del rastrojo de maíz	72
3.3.1	Determinación de azúcares reductores y factor de severidad	72
3.3.2	Degradación de holocelulosa	79
3.3.3	Análisis IR del rastrojo de maíz hidrolizado	82
3.4	Hidrólisis ácida del olote de maíz	85
3.4.1	Determinación de azúcares reductores y factor de severidad	86
3.4.2	Degradación de holocelulosa	92
3.4.3	Análisis IR del olote de maíz hidrolizado	96
3.5	Rendimientos citados para la recuperación de azúcares	100
3.6	Obtención de biohidrógeno a partir de hidrolizados	104
3.6.1	Fermentación de los hidrolizados de tallo de haba	104
3.6.2	Fermentación de los hidrolizados de olote	108
	CONCLUSIONES	115
	RECOMENDACIONES	117
	FUENTES CONSULTADAS	118
	ANEXOS	130
	Anexo A. Técnicas analíticas para sólidos	130
	Anexo B. Técnicas analíticas para líquidos	135
	Anexo C. Curvas de calibración con glucosa y xilosa	139
	Anexo D. Análisis por cromatografía de gases	141
	Anexo E. Recuperación de azúcares a partir de olote de maíz en un proceso de hidrólisis realizado durante 5 horas	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribución de la lignocelulosa en las paredes celulares de las plantas	7
Figura 1.2	Efecto del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica	8
Figura 1.3	Mecanismo de hidrólisis ácida	12
Figura 1.4	Estructura molecular de la xilosa y de la glucosa	14
Figura 1.5	Síntesis de inhibidores a partir de a) hexosas y b) pentosas	15
Figura 1.6	Representación del complejo celulosa-enzima-bacteria	29
Figura 2.1	Metodología establecida para el trabajo de investigación	34
Figura 2.2	Preparación de medio de cultivo anaerobio por Método de Hungate	35
Figura 2.3	Medio de cultivo estéril a) aerobio y b) anaerobio	35
Figura 2.4	Técnicas empleadas para a) extracción orgánica y b) holocelulosa	37
Figura 2.5	Metodología empleada para la hidrólisis ácida de los residuos agrícolas	38
Figura 3.1	Contenido de carbohidratos en los rastrojos vírgenes	45
Figura 3.2	Espectros de IR del Tallo de haba virgen c/e y s/e orgánica	47
Figura 3.3	Espectros de IR del rastrojo de maíz virgen c/e y s/e orgánica	48
Figura 3.4	Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado	49
Figura 3.5	Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de holocelulosa en el rastrojo de maíz hidrolizado	50
Figura 3.6	Espectros de IR del tallo de haba hidrolizado durante 30 minutos c/e y s/e orgánica	52
Figura 3.7	Degradación de los SVT's en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 3% H ₃ PO ₄	53
Figura 3.8	Degradación de la lignina en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 3% H ₃ PO ₄	53
Figura 3.9	Degradación de la holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 3% H ₃ PO ₄	54
Figura 3.10	Degradación de los SVT's en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 7% H ₃ PO ₄	54
Figura 3.11	Degradación de la lignina en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 7% H ₃ PO ₄	55
Figura 3.12	Degradación de la holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 7% H ₃ PO ₄	55
Figura 3.13	Recuperación de azúcares reductores a partir de tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	56
Figura 3.14	Modelo cinético de Saeman para la producción de azúcares a partir de tallo de haba en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	58
Figura 3.15	Modelo cinético de primer orden para la producción de azúcares a partir de	59

	tallo de haba en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	
Figura 3.16	Porcentaje de conversión holocelulosa-azúcar en el tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	61
Figura 3.17	Factores CSF determinados en la hidrólisis de tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	61
Figura 3.18	Relación entre los CSF y el azúcar recuperado a partir de tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	62
Figura 3.19	Porcentaje de tallo de haba hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	63
Figura 3.20	Degradación de holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	64
Figura 3.21	Modelo cinético de primer orden para la degradación de holocelulosa a partir de tallo de haba en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	65
Figura 3.22	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 2 y a los 10 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 3%v H ₃ PO ₄ y 100°C	66
Figura 3.23	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 2 y a los 10 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 7%v H ₃ PO ₄ y 100°C	68
Figura 3.24	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 3%v H ₃ PO ₄ y 100°C	69
Figura 3.25	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 7%v H ₃ PO ₄ y 100°C	70
Figura 3.26	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 3%v H ₃ PO ₄ y 130°C	71
Figura 3.27	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 7%v H ₃ PO ₄ y 130°C	71
Figura 3.28	Recuperación de azúcares reductores a partir de rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	73
Figura 3.29	Modelo cinético de Saeman para la producción de azúcares a partir de rastrojo de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	74
Figura 3.30	Modelo cinético de primer orden para la producción de azúcares a partir de rastrojo de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	76
Figura 3.31	Porcentaje de conversión holocelulosa-azúcar en el rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	77

Figura 3.32	Factores CSF determinados en la hidrólisis del rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	78
Figura 3.33	Relación entre los CSF y el azúcar recuperado a partir de rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	78
Figura 3.34	Porcentaje de rastrojo de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	79
Figura 3.35	Degradación de holocelulosa en el rastrojo de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	80
Figura 3.36	Modelo cinético de primer orden para la degradación de holocelulosa a partir de rastrojo de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	81
Figura 3.37	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 3%v H ₃ PO ₄ y 100°C	82
Figura 3.38	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 7%v H ₃ PO ₄ y 100°C	83
Figura 3.39	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 3%v H ₃ PO ₄ y 130°C	84
Figura 3.40	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 7%v H ₃ PO ₄ y 130°C	85
Figura 3.41	Recuperación de azúcares reductores a partir de olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	86
Figura 3.42	Modelo cinético de Saeman para la producción de azúcares a partir de olote de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	87
Figura 3.43	Modelo cinético de primer orden para la producción de azúcares a partir de olote de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	89
Figura 3.44	Porcentaje de conversión holocelulosa-azúcar en el olote a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	90
Figura 3.45	Factores CSF determinados en la hidrólisis del olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	91
Figura 3.46	Relación entre los CSF y el azúcar recuperado a partir de olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	92
Figura 3.47	Porcentaje de olote de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	93
Figura 3.48	Degradación de holocelulosa en el olote de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido	94

Figura 3.49	Modelo cinético de primer orden para la degradación de holoceulosa a partir de olote de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C	95
Figura 3.50	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 3%v H ₃ PO ₄ y 100°C	96
Figura 3.51	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 7%v H ₃ PO ₄ y 100°C	97
Figura 3.52	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 3%v H ₃ PO ₄ y 130°C	98
Figura 3.53	Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 7%v H ₃ PO ₄ y 130°C	99
Figura 3.54	Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de tallo de haba	105
Figura 3.55	Crecimiento del consorcio bacteriano durante la fermentación de los hidrolizados del tallo de haba	106
Figura 3.56	Comportamiento de las bacterias y del pH durante la fermentación de los hidrolizados del tallo de haba	107
Figura 3.57	Comportamiento de las bacterias y del H ₂ producido durante la fermentación de los hidrolizados del tallo de haba	107
Figura 3.58	Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de olote de maíz	108
Figura 3.59	Crecimiento del consorcio bacteriano durante la fermentación de los hidrolizados de olote de maíz	109
Figura 3.60	Comportamiento de las bacterias y del pH durante la fermentación de los hidrolizados de olote de maíz	110
Figura 3.61	Comportamiento de las bacterias y del H ₂ producido durante la fermentación de los hidrolizados de olote de maíz	
Figura B1	Potenciómetro "Conductronic PC18" calibrado a pH 4	135
Figura B2	Reducción del ácido 3-5 dinitro salicílico para la cuantificación de azúcares	136
Figura B3	Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores	137
Figura C1	Curvas de calibración en a) g / L y b) mol / L	140
Figura D1	Cromatografo utilizado para la determinación de biohidrógeno	141
Figura D2	Curva de calibración empleada en el análisis de H ₂	142
Figura E1	Ajuste logarítmico de CSF para los experimentos de hidrólisis a 5 horas con: a) 3% y b) 7%v H ₃ PO ₄	143
Figura E2	Modelo cinético de Saeman en los experimentos realizados a 5 horas con: a) 3%v y b) 7%v H ₃ PO ₄	144

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Composición química del rastrojo de haba	4
Tabla 1.2	Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas comunes	7
Tabla 1.3	Pretratamiento con ácido diluido de algunos materiales lignocelulósicos reportados en la literatura	12
Tabla 1.4	Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia	21
Tabla 1.5	Producción de biohidrógeno a partir de diferentes sustratos	30
Tabla 2.1	Composición del medio de cultivo empleado en la fermentación	41
Tabla 2.2	Técnicas analíticas	42
Tabla 3.1	Caracterización de los rastrojos vírgenes	44
Tabla 3.2	Porcentajes de holocelulosa y lignina en rastrojo virgen con y sin extracción	45
Tabla 3.3	Análisis estadístico del porcentaje de holocelulosa en función de la extracción orgánica	51
Tabla 3.4	Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de tallo de haba	57
Tabla 3.5	Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de rastrojo de maíz	75
Tabla 3.6	Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de olote de maíz	87
Tabla 3.7	Rendimientos citados para la producción de azúcares	101
Tabla 3.8	Rendimientos citados en la literatura para la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados	111
Tabla E1	Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción azúcares a partir de olote de maíz en una hidrólisis de 5 horas	144

INTRODUCCIÓN

Los residuos agrícolas generados en México no siempre son utilizados como alimento para ganado o composteo. Los residuos del cultivo de maíz están entre los principales contaminantes agrícolas, el olote genera la mayor cantidad de éstos con aproximadamente 25 millones de ton/año (SAGARPA, 2010). Otro cultivo predominante a nivel nacional es el sorgo, cuyo rastrojo tiene un alto potencial biotecnológico para la generación de biocombustibles. Por otra parte, en el Estado de México el haba es uno de los cultivos predominantes, el cual genera residuos (hojas, tallos y cáscaras) que al no ser aprovechados, pueden convertirse en focos de patógenos, como insectos y roedores (Hernández *et al.*, 2011; INEGI, 2009), además suelen disponerse en rellenos sanitarios o en tiraderos a cielo abierto, contribuyendo a la contaminación atmosférica por la generación de gases de efecto invernadero, de los cuales el metano (CH₄) es el más dañino, ya que de acuerdo a lo reportado por Howarth *et al.* (2009), tiene un potencial de calentamiento global de entre 72 y 105 veces superior al dióxido de carbono (CO₂). 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, debido al alto contenido de materia orgánica (Liu *et al.*, 2011).

Al mismo tiempo, la demanda de los combustibles fósiles ha aumentado 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 son en su mayoría, óxidos de nitrógeno (NO_x), óxidos de carbono (CO_x), compuestos de azufre (SO_x) y plomo (Pb), dichos gases además de contribuir al calentamiento global, ocasionan afecciones en la salud del hombre (Solís & López, 2003).

Ante la problemática que presentan los residuos agrícolas, así como la necesidad de incorporar combustibles no contaminantes que posean un alto poder calorífico y tengan un campo de aplicabilidad universal, se ha propuesto la producción de biocombustibles como una alternativa sustentable. Sin embargo, pocos han sido los

estudios enfocados a la producción de biohidrógeno a partir de este tipo de residuos, debido a su alto contenido de lignocelulosa, que dificulta la acción metabólica de los microorganismos, razón por la cual es necesario aplicar un pretratamiento que permita incrementar la digestibilidad del sustrato y con ello, incrementar la producción sustentable de combustibles, aprovechando al máximo los recursos brindados por los residuos agrícolas.

Con base a la problemática previamente mencionada, el presente trabajo tiene como objeto primordial determinar las mejores condiciones de pretratamiento para facilitar la fermentación para la producción de biohidrógeno utilizando residuos de haba y de maíz, empleando como base hipotética el supuesto de que los rendimientos se pueden incrementar con un pretratamiento que permita recuperar los azúcares monoméricos presentes en la celulosa y hemicelulosa de los residuos agrícolas.

El presente trabajo está conformado por tres apartados, de los cuales en el primero se presentan 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 apartado 2 se describe la metodología empleada en la investigación, la hidrólisis ácida de los residuos agrícolas, la puesta en marcha de los biorreactores escala laboratorio y las determinaciones analíticas a las fases sólida, líquida y gaseosa. Finalmente, el apartado 3 muestra los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Se presentan los análisis cinéticos de la producción de azúcares monoméricos y de la degradación de holocelulosa, el análisis IR de los sólidos hidrolizados y la producción de biohidrógeno.

1. FUNDAMENTOS

La contaminación se puede definir como la introducción de sustancias, materiales o energía que produce daño al ambiente y a la salud del hombre (Weiner *et al.*, 2003), se clasifica en contaminación del agua, aire y suelo, siendo los residuos sólidos los principales contaminantes del suelo (SEMARNAT, 2001).

1.1 Residuos Sólidos

Los residuos sólidos diferentes a los peligrosos y radioactivos son comúnmente denominados Residuos Sólidos Urbanos (RSU), los cuales consisten de todos los materiales sólidos y semisólidos descargados por la comunidad (Weiner *et al.*, 2003). En general, los residuos sólidos se pueden clasificar en tres tipos: residuos municipales o urbanos, industriales y residuos peligrosos, de los cuales los RSU son los generados en mayor proporción (Arellano, 2002). De acuerdo con la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), estos se clasifican en: peligrosos, RSU, incompatibles y de manejo especial (ME), los residuos de ME a su vez comprenden a los derivados de los materiales de construcción, de servicios de salud, agrícolas, pesqueros, forestales, silvícolas, avícolas, rocas, lodos de tratamiento de aguas residuales, tecnológicos, de la industria del transporte y centros comerciales (LGPGIR, 2015).

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, han sido pocos los trabajos dirigidos a fermentación anaerobia para la transformación de estos residuos a hidrógeno (Cao *et al.*, 2009).

El Estado de México es rico en diversidad climática, esto 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 (INEGI, 2009), 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. 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 anual total (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 (Cheng *et al.*, 2011). Los residuos de haba son considerados como materia prima potencial para la obtención de bioetanol y biogás, a partir de los hidrolizados del bagazo. La composición del rastrojo de haba fue determinada por Petersson *et al.* (2007) y los resultados se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 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 20,142,186 ton / año

(INEGI, 2009). Los residuos provenientes del cultivo de maíz constan de hojas, olote y tallos, los cuales están compuestos en su mayoría por lignocelulosa (Cao *et al.*, 2009). De acuerdo a lo reportado por la Secretaría 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 ton / 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 por celulosa (45%), hemicelulosa (35%) y lignina (20%) (Saha & Bothast, 1999).

1.1.2 Residuos de lignocelulosa

La biomasa lignocelulósica es el 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 y de la industria del papel y comida (Chayanon *et al.*, 2014). El material orgánico de lignocelulosa está compuesto principalmente por los biopolímeros celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales son matrices de homo y heterosacáridos que poseen diferentes propiedades, grados de cristalinidad y composición, dependiendo del tipo, especie y recurso de biomasa (Agbor *et al.*, 2011).

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 β -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 y la resistencia mecánica 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 (Kalia *et al.*, 2011). 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).

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 (Kalia *et al.*, 2011). La lignina puede separarse de la biomasa lignocelulósica aumentando el contacto entre microorganismos y holocelulosa, sin embargo, no puede ser degradada fácilmente por medios biológicos, razón por la cual la delignificación es considerada una fase primordial en el proceso de digestión anaerobia de materia lignocelulósica (Tahezadeh & Karimi, 2008). La Figura 1.1 muestra la distribución del material lignocelulósico en las plantas.

Saratale *et al.* (2008) y Chayanon *et al.* (2014), realizaron una recopilación de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en diferentes residuos agrícolas, sus resultados se muestran en la Tabla 1.2.

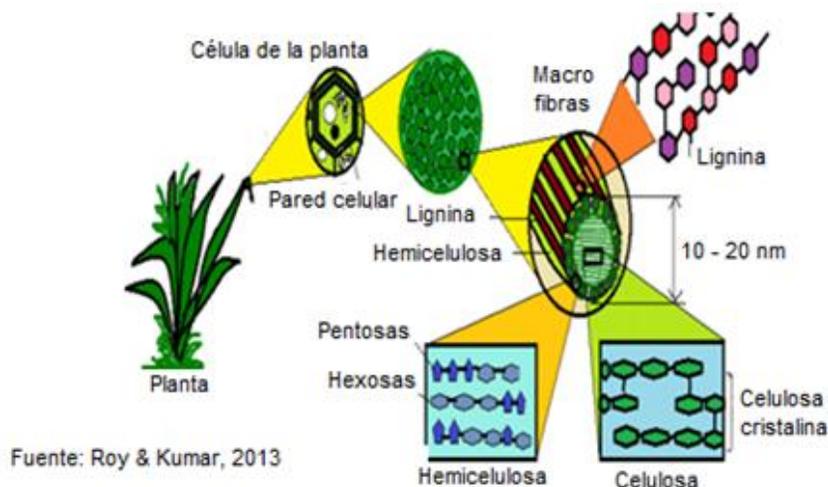


Figura 1.1 Distribución de la lignocelulosa en las paredes celulares de las plantas

Tabla 1.2 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas comunes

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	CELULOSA (%)	HEMICELULOSA (%)	LIGNINA (%)
^a Nuez	25-30	25-30	25-35
^a Pasto	25-40	35-50	10-30
^a Paja de trigo	33-38	26-32	17-19
^a Tallo de sorgo	27	25	11
^a Paja de arroz	32-47	19-27	5-24
^a Mazorca de maíz	45	35	15
^b Rastrojo de maíz	37.5	22.4	17.6
^b Bagazo de azúcar de caña	25	17	12
^b Rastrojo de arroz	32-47	19-27	7-24
^b Eucalipto	38-44	12-13	24-37
^b Tallo de girasol	31	17	29
^b Rastrojo de cebada	37	24	27

Fuente: ^aSaratale *et al.*, 2008; ^bChayanon *et al.*, 2014 .

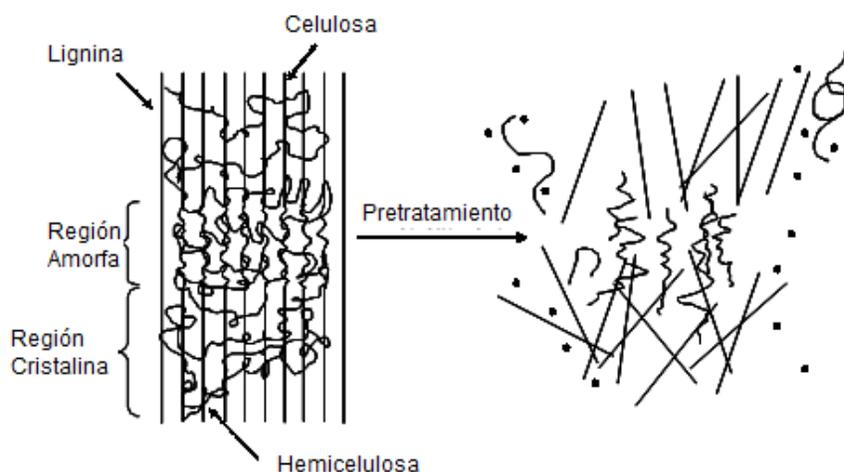
1.2 Degradación de lignocelulosa

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 el rendimiento de los procesos de digestión (Yi *et al.*, 2014). El proceso de hidrólisis generalmente incluye una etapa de pre-hidrólisis, en la cual se busca remover de manera parcial o total a la lignina y monomerizar a la hemicelulosa, así como una fase denominada hidrólisis, que tiene como objetivo degradar las cadenas lineales de celulosa a glucosa (Nanqi *et al.*, 2009).

1.2.1 Pretratamiento de lignocelulosa

La pre-hidrólisis se refiere al pretratamiento requerido para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica y hacer más accesible a la celulosa, a fin de facilitar la conversión de los carbohidratos en azúcares fermentables (Nanqi *et al.*, 2009). La Figura 1.2 muestra el efecto del pretratamiento sobre la materia orgánica. La selección del pretratamiento afecta el costo y el rendimiento de la hidrólisis subsecuente y de la fermentación (Saratale *et al.*, 2008). El pretratamiento ideal debe mejorar la fermentabilidad de los azúcares, al evitar la pérdida y degradación de los sacáridos, disminuir la producción de inhibidores, mejorar la hidrólisis de celulosa y tener bajos costos de operación y de requerimientos energéticos (Roy & Kumar, 2013).



Fuente: Saratale *et al.*, 2008

Figura 1.2 Efecto del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica

1.2.2 Tipos de pretratamiento

Los métodos de pretratamiento 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).

a) Pretratamientos físicos: Los tratamientos 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. Los principales tratamientos físicos son los mecánicos y los de irradiación, los cuales son utilizados para mejorar la biodegradabilidad de los residuos orgánicos (Tahezadeh & Karimi, 2008). Los procesos de irradiación hacen uso de rayos gamma, rayos de electrones y microondas para romper la estructura de la lignocelulosa, cambiando así las propiedades físicas y químicas de la celulosa (Cheng *et al.*, 2011).

b) Pretratamientos químicos: El tratamiento químico se ha convertido en el método más prometedor para mejorar la biodegradabilidad 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, 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 (Cheng *et al.*, 2011).

- 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 vapor a alta temperatura, líquidos calientes catalizados, oxidación húmeda catalizada, explosión de amonio y solventes de celulosa (Agbor *et al.*, 2011).
- 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). Las principales ventajas del tratamiento biológico son los bajos requerimientos energéticos, la aplicación en condiciones ambientales y la conservación de azúcares debida a la nula cantidad de inhibidores producidos (Taherzadeh & Karimi, 2008); por otra parte, las desventajas más notorias son la lentitud del proceso, los bajos rendimientos y el control estricto de las condiciones de crecimiento de los microorganismos, razones por las cuales no es considerado como un pretratamiento sustentable (Yi *et al.*, 2014).

1.2.3 Pretratamiento ácido

El pretratamiento ácido involucra la adición de ácidos diluidos o concentrados a la biomasa en procesos catalizados por temperatura (Badiei *et al.*, 2013). Dicho tratamiento puede realizarse a temperatura alta y baja concentración de ácido o a baja temperatura y alta concentración de ácido, el proceso con alta concentración de ácido presenta algunas ventajas sobre el proceso con ácido diluido, tales como mayor índice de depolimerización de carbohidratos, mínima formación de inhibidores y la no restricción para el uso de biomasa (Yoon *et al.*, 2014), sin embargo, las condiciones de operación deben ser bien controladas a fin de evitar corrosión (Yi *et al.*, 2014).

Por otra parte, el tratamiento con ácido diluido es uno de los métodos más utilizados en la pre-hidrólisis de lignocelulosa, siendo el ácido sulfúrico y el fosfórico los más empleados, este último presenta algunas ventajas como lo son su baja toxicidad, baja corrosión y bajo costo, además de que los productos derivados de su neutralización pueden ser aprovechados (López *et al.*, 2013). La principal desventaja del tratamiento con ácido diluido es la descomposición térmica de hexosas y pentosas, que da como resultado la formación de furfural e hidroximetil furfural, sustancias que inhiben la actividad metabólica de los microorganismos (Lenihan *et al.*, 2010).

De acuerdo con Zhang *et al.*, 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 1.1.



El segundo paso corresponde tanto a la competición 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 moléculas de agua. Por otro lado, Fan *et al.* (1987) describen 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 1.3 muestra el diagrama simplificado del mecanismo de hidrólisis ácida mediante la protonación del oxígeno glucosídico.

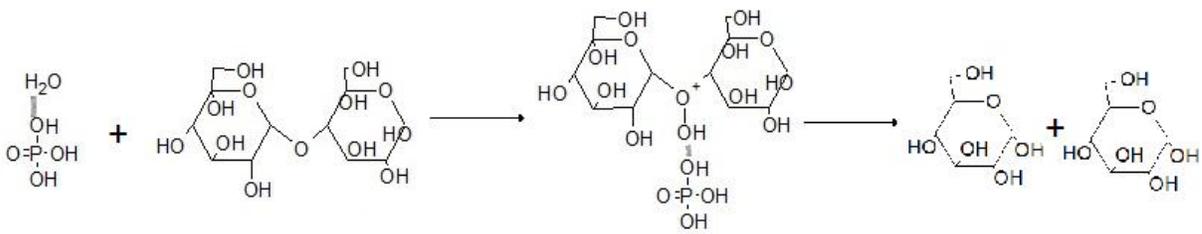


Figura 1.3 Mecanismo de hidrólisis ácida

La producción de monosacáridos a partir de rastrojo de maíz, cáscara de papa y bagazo de caña de azúcar fueron estudiados respectivamente por Cao *et al.* (2009), Lenihan *et al.* (2010) y Vasconcelos *et al.* (2013), obteniendo un porcentaje de recuperación mayor al 10%. Algunas otras investigaciones como la reportada por López-Linares *et al.* (2013), reportan rendimientos de 43.4 g de azúcar / 100 g de rastrojo de colza, lo cual muestra la factibilidad del tratamiento con ácido diluido seguido de una hidrólisis enzimática.

La Tabla 1.3 resume los resultados reportados en algunos trabajos referidos al pretratamiento de diversos tipos de biomasa mediante el contacto con ácido diluido, así como las condiciones de operación.

Tabla 1.3 Pretratamiento con ácido diluido de algunos materiales lignocelulósicos reportados en la literatura

MATERIA PRIMA	CONDICIONES DE TRATAMIENTO	g AZÚCAR / 100 g SUSTRATO	REFERENCIA
Rastrojo de maíz	121°C, 105 minutos, 2.13% (v/v) H ₂ SO ₄	12.23	Cao <i>et al.</i> , 2009
Cáscara de papa	135°C, 8 minutos, 6.25% (v/v) H ₃ PO ₄	55.5	Lenihan <i>et al.</i> , 2010
Bagazo de caña	122°C, 300 minutos, 4% (w/w) H ₃ PO ₄	23.2	Gámez <i>et al.</i> , 2006

Tabla 1.3 Pretratamiento con ácido diluido de algunos materiales lignocelulósicos reportados en la literatura (Continuación)

MATERIA PRIMA	CONDICIONES DE TRATAMIENTO	g AZÚCAR / 100 g SUSTRATO	REFERENCIA
Rastrojo de Colza	202°C, 5 minutos, 0.19% (v/v) H ₃ PO ₄	55.9 Posterior a ataque con enzima Cellic CTec3	López <i>et al.</i> , 2013
Bambú	170°C, 45 minutos, 6% (v/v) H ₃ PO ₄	23.9	Hong <i>et al.</i> , 2012
Bagazo de caña de azúcar	186°C, 24 minutos, 0.12% (v/v) H ₃ PO ₄	6.73	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2013
Rastrojo de cebada	160°C, 60 minutos, 1% (v/v) H ₃ PO ₄	29.1	Panagiotopoulos <i>et al.</i> , 2012
Eucalipto	190°C, 10 minutos, 0.75% (v/v) H ₃ PO ₄	19.6	Castro <i>et al.</i> , 2014

Lenihan *et al.* (2010), estudiaron el efecto de la temperatura y de la concentración de H₃PO₄ en la pre-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 valoración de un pretratamiento ácido depende de un parámetro denominado *Factor de Severidad Combinado* (CSF), el cual está definido como el efecto combinado de la temperatura, acidez y tiempo de reacción (Agbor *et al.*, 2011). El CSF se determina aplicando un cociente entre la cantidad total de azúcares y los inhibidores presentes en la fase líquida (Cao *et al.*, 2009), sin embargo, algunas investigaciones como las realizadas por Panagiotopoulos *et al.* (2012) y Castro *et al.* (2014), muestran que el CSF puede determinarse mediante la Ecuación 1.2.

$$CSF = \log \left[t * e^{\left(\frac{T-100}{14.75}\right)} \right] - pH \quad \text{Ec. 1.2}$$

En donde, t es el tiempo de contacto en minutos, T es 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 CSF 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 CSF corresponden a rendimientos diferentes.

1.2.4 Azúcares fermentables e inhibidores

La idea básica del pretratamiento de lignocelulosa es la obtención de azúcares fermentables provenientes de la celulosa y hemicelulosa, donde el componente principal de la celulosa es la glucosa, mientras que la xilosa es el monómero mayoritario de la hemicelulosa (Lenihan *et al.*, 2010). Tanto la glucosa como la xilosa son monosacáridos capaces de formar estructuras cíclicas (Figura 1.4) fácilmente fermentables por los microorganismos (Hniman *et al.*, 2011).

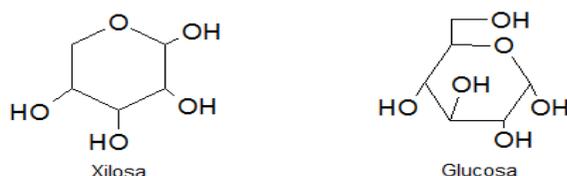


Figura 1.4 Estructura molecular de la xilosa y de la glucosa

Detrás de los azúcares monoméricos, algunos componentes tóxicos derivados del pretratamiento conocidos como inhibidores de crecimiento microbiano se producen (Lenihan *et al.*, 2010). 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 depolimerización de la lignina, como lo son los anillos aromáticos y poli aromáticos (Nanqi *et al.*, 2009).

La naturaleza y concentración de inhibidores depende de la materia prima, del pretratamiento, temperatura, pH, presión y tiempo de contacto.

Los tratamientos efectuados a altas temperaturas propician la deshidratación térmica de las hexosas y pentosas en moléculas de hidroximetil furfural y furfural respectivamente, los cuales a su vez se descomponen generando ácido fórmico, levulínico y acético (Shuvashish *et al.*, 2014). La Figura 1.5 resume la síntesis de inhibidores a partir de la descomposición térmica de los sacáridos.

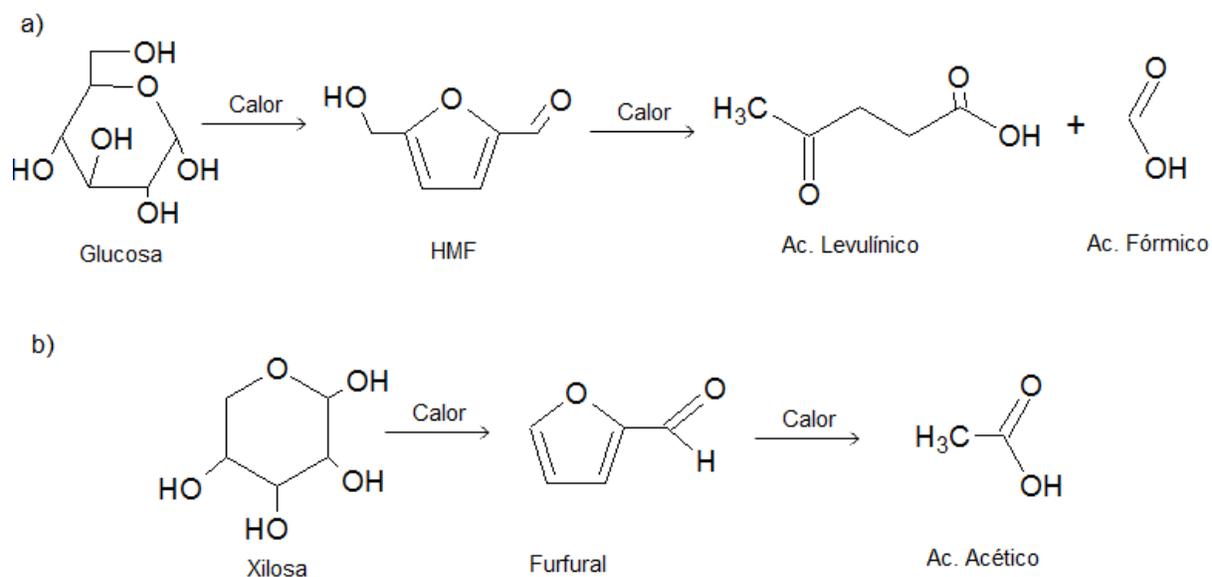
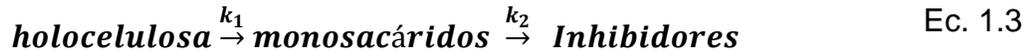


Figura 1.5 Síntesis de inhibidores a partir de a) hexosas y b) pentosas

El proceso de evaporación es utilizado para remover los inhibidores exceptuando los compuestos aromáticos, los cuales pueden ser adsorbidos mediante el uso de carbón activado (Lenihan *et al.*, 2010).

El modelo cinético para la producción de azúcares a partir de un tratamiento ácido se asocia a una serie de reacciones pseudo-homogéneas de primer orden. Algunos investigadores como Fan *et al.* (1987), Lenihan *et al.* (2010) y Gámez *et al.* (2006), han propuesto que la hidrólisis de lignocelulosa involucra la depolimerización de la

celulosa y hemicelulosa a azúcares monoméricos, los cuales posteriormente son degradados a inhibidores y ácidos orgánicos, tal y como se muestra en la Ecuación 1.3.



En donde k_1 y k_2 son las constantes cinéticas de depolimerización de carbohidratos y descomposición de monómeros respectivamente. 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.

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

Donde M es la concentración de monosacáridos y P_0 la concentración inicial de holocelulosa, ambas pueden expresarse en términos de g/L o g azúcar / g sustrato.

1.2.5 Hidrólisis de celulosa

La etapa de hidrólisis de celulosa es comúnmente conocida como “hidrólisis”, 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: la alta recuperación de azúcares, aplicación en condiciones ambientales y no producen inhibidores ni problemas por corrosión (Nanqi *et al.*, 2009). Al mismo tiempo, comparada con la hidrólisis bacteriana, la hidrólisis enzimática presenta rendimientos de recuperación de hexosas más altos y costos de producción mayores (Cheng *et al.*, 2011).

1.3 Biohidrógeno

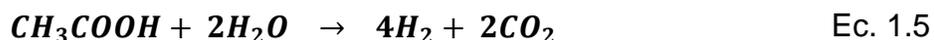
El hidrógeno (H₂) es un gas importante y fuente de energía promisoría que jugará un papel importante en la reducción de los gases de efecto invernadero, en procesos de combustión genera vapor de agua y es considerado como un energético limpio con alto poder calorífico, debido a que tiene aproximadamente 122 MJ/kg (Reith *et al.*, 2003). El H₂ obtenido como subproducto de las reacciones bioquímicas efectuadas por microorganismos es conocido como Biohidrógeno (Pandey *et al.*, 2013).

1.3.1 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 (Nanqi *et al.*, 2009); sin embargo, la fermentación anaerobia se presenta como la opción más factible para la producción de biocombustibles, en especial para la generación de biohidrógeno (Ya-Chieh *et al.*, 2012).

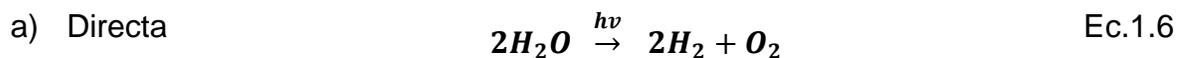
a) Fotofermentación. La fotofermentación se define como el proceso de producción de biohidrógeno a partir de sustratos orgánicos residuales llevado a cabo por organismos fotosintéticos (Reith *et al.*, 2003). Este proceso es particularmente estudiado en lixiviados provenientes de procesos de fermentación anaerobia, buscando obtener un valor agregado de los residuos líquidos (Hallenbeck & Ghosh, 2009). La fotofermentación alcanza altos rendimientos y una degradación completa de los ácidos orgánicos, es ambientalmente sustentable y aprovecha la energía solar y las reacciones metabólicas de los microorganismos para degradar materia orgánica en fase líquida (Dong-Hoon *et al.*, 2012). Entre los microorganismos más estudiados para la producción de H₂ mediante fotofermentación se encuentran las bacterias púrpuras tales como *Rhodobacter* (Show *et al.*, 2011), la cual debido a su estructura simple no tiene la capacidad de hidrolizar el agua, pero sí de producir biohidrógeno a partir de materia orgánica de

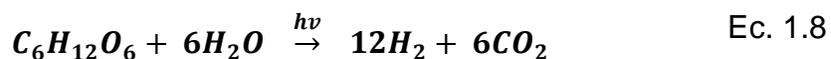
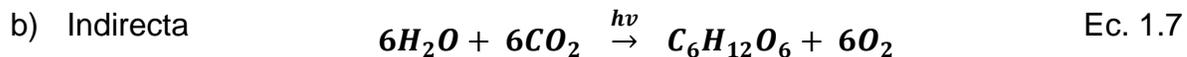
bajo peso molecular, como los ácidos orgánicos (Türker *et al.*, 2008). La producción de biohidrógeno mediante fotofermentación se muestra a través de la reacción 1.5.



Chen *et al.* (2008) diseñaron un experimento secuencial en el cual aprovecharon los ácidos orgánicos generados en un proceso de fermentación anaerobia para obtener H₂ en un reactor fotobiológico, el rendimiento al final del proceso fue de 14.2 mol H₂ / mol sacarosa, cuatro veces más alto que el máximo rendimiento obtenido mediante fermentación anaerobia.

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 H₂ molecular (Show *et al.*, 2011). 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 CO₂, los carbohidratos son oxidados para producir biohidrógeno (Das *et al.*, 2014). Las reacciones involucradas en los procesos de biofotólisis se muestran en las Ecuaciones 1.6, 1.7 y 1.8.



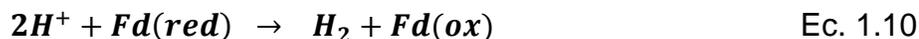


c) Fermentación anaerobia. La digestión anaerobia es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno (O_2) que da lugar a una mezcla de gases conocida como biogás, principalmente compuesto por CH_4 y CO_2 , así como a una suspensión acuosa o lodo que contiene componentes difíciles de degradar y los minerales inicialmente presentes en la biomasa (Veyna, 2007). La digestión anaerobia es un fenómeno encontrado de manera natural en ambientes con ausencia de oxígeno. Las primeras fases de este proceso son la hidrólisis y acidogénesis, etapas en las cuales la materia orgánica es degradada a H_2 (Xin *et al.*, 2010). La producción de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia es llevada a cabo por bacterias anóxicas capaces de degradar carbohidratos y producir H_2 molecular mediante reacciones bioquímicas dirigidas a acetato y butirato (Ya-Chieh *et al.*, 2012).

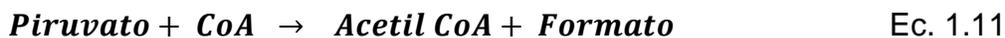
1.3.2 Producción de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia

La producción de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia involucra una serie de reacciones bioquímicas que concluyen con 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 (Show *et al.*, 2011). 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 Adenosina de Tri-Fosfato (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 Adenosina de Di-Fosfato (ADP), posteriormente el piruvato es oxidado a acetyl coenzima A, CO_2 y H_2 mediante la acción de la enzima “piruvato ferrodixina”, oxidoreductasa e hidrogenasa (Ghimire *et al.*, 2015). Para la producción de H_2 , el piruvato puede

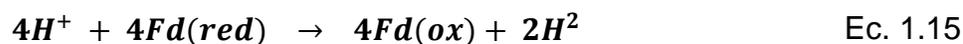
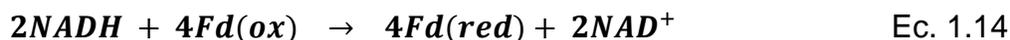
involucrar tres mecanismos bioquímicos diferentes, dependiendo del tipo de microorganismo y de sus respectivas enzimas (Show *et al.*, 2011). En microorganismos anaerobios estrictos y bacterias termofílicas, el piruvato es oxidado a acetil coenzima A mediante la acción de la oxidoreductasa piruvato ferrodixina, 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 1.9 y 1.10.



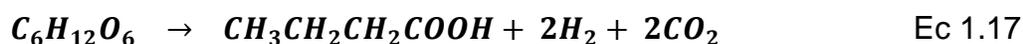
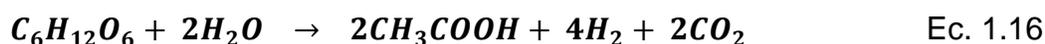
De acuerdo con Pandey *et al.* (2013), el segundo tipo de reacciones productoras de H₂ involucra el metabolismo de microorganismos facultativos mediante la acción de la enzima formato piruvato liasa (PFL), ambas reacciones se muestran en las Ecuaciones 1.11 y 1.12.



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 ha sido observado en microorganismos tanto anaerobios estrictos como facultativos (Show *et al.*, 2011). Las reacciones mostradas en las Ecuaciones 1.13, 1.14 y 1.15 muestran la producción de H₂ a partir de la enzima NADH.



Además del H₂, ácidos orgánicos de bajo peso molecular son generados como subproductos del metabolismo bacteriano (Ghimire *et al.*, 2015, Reith *et al.*, 2003). 4 moles de H₂ por mol de glucosa son formados cuando el piruvato es oxidado a acetato como único producto final del metabolismo (Ec. 1.16), mientras que la oxidación del piruvato a butirato (Ec. 1.17) produce solamente 2 moles de H₂ (Das *et al.*, 2014).



Diferentes tipos de hexosas, pentosas y carbohidratos producen diferentes cantidades de H₂, 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 (Türker *et al.*, 2008).

1.3.3 Ventajas y desventajas de la fermentación anaerobia

Reith *et al.* (2003) estudiaron las ventajas y desventajas que presenta la digestión anaerobia para la generación de biocombustibles comparada con procesos industriales convencionales. Dentro de las mayores ventajas se encuentra el bajo consumo de energía, la reducción de residuos orgánicos, y bajos costos de operación y construcción de equipos. Mientras que las principales desventajas son el arranque lento del proceso y la depuración posterior del biogás. Los resultados de su estudio se presentan en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Bajo consumo de energía	Alta sensibilidad de las bacterias metanogénicas
Reducción de residuos orgánicos	El arranque del proceso es lento, hasta que se alcanza estabilidad en el crecimiento microbiano

Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia (Continuación)

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Facilita la deshidratación de los lodos	Formación de compuestos de azufre
Estabiliza los residuos	Tratamiento posterior para depurar el CH ₄ obtenido y eliminación de los componentes de azufre.
Los costos de diseño y de construcción de los biorreactores son bajos	
El espacio requerido es menor que el del tratamiento convencional de residuos	
Retención completa de los nutrientes fertilizantes como el N, P y K.	

Fuente: Reith *et al.*, 2003

1.3.4 Factores que afectan la producción de biohidrógeno

La producción de biohidrógeno por fermentación anaerobia es un proceso muy complejo influenciado por varios factores tales como el inóculo, tipo de sustrato utilizado, tipo de reactor, nitrógeno, fosfato, iones metálicos, temperatura y pH (Wang & Wan, 2008). Para la generación de biohidrógeno, es necesaria la eliminación de los microorganismos productores de CH₄ y NH₃, ya que éstos consumen el H₂ que producen las bacterias acidogénicas (Canul, 2010). Los principales factores que afectan la producción de H₂ 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 anaerobia facultativa (Wang & Wan, 2008). Los cultivos puros brindan rendimientos más altos, sin embargo, el pH óptimo para la generación de biohidrógeno oscila entre 5 y 6 (Canul, 2010).

b) Cultivos mixtos. Las bacterias que son capaces de producir H₂ se encuentran en el ambiente, en sitios tales como el suelo, aguas residuales y compostas. El cultivo mixto de bacterias provenientes de estos sitios puede ser utilizado como inóculo para los procesos de producción de biohidrógeno por fermentación (Canul, 2010). Cuando se utilizan cultivos mixtos, el H₂ producido puede ser utilizado por las bacterias consumidoras de H₂, 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 (Wang & Wan, 2008). 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), 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 H₂ (Ghimire *et al.*, 2015).

c) Inhibición de microorganismos metanogénicos. Los microorganismos que compiten en el proceso de producción de biohidrógeno son los microorganismos metanogénicos, que en su metabolismo consumen H₂, éstos son procariotas anaerobios estrictos que poseen diversos tipos de paredes celulares y la mayoría se desarrollan en condiciones mesofílicas (Chen *et al.*, 2006). Se han utilizado diversos tipos de pretratamientos con el fin de eliminar a los microorganismos metanogénicos y de esta forma obtener la máxima producción de H₂. Entre los distintos tipos de pretratamientos que se han utilizado para obtener cultivos ricos en microorganismos hidrogénicos se encuentran el pretratamiento básico – ácido y térmico (Wang & Wei, 2009). Sin embargo, se ha observado que el pretratamiento térmico es un método eficiente para la remoción de los microorganismos consumidores de H₂. El cultivo dominante de *Clostridium* puede ser fácilmente obtenido por el tratamiento térmico del lodo, ya que las esporas formadas a altas temperaturas pueden ser activadas cuando las condiciones son adecuadas para su desarrollo (Canul, 2010).

d) Cambio de la presión parcial de H₂ y CO₂ en el biorreactor. El incremento de la presión parcial de H₂ en el espacio gaseoso durante el proceso de fermentación puede asociarse a un decremento de la producción de H₂. Cuando la presión parcial se incrementa en el espacio gaseoso del biorreactor el cultivo microbiano comienza la generación de alcohol, asociado a una menor cantidad de H₂ producido (Canul, 2010). El uso de gases inertes y de membranas de separación ha sido empleado recientemente como un método eficiente para reducir la presión parcial de H₂ en el biorreactor (Wang & Wei, 2009). La producción de etanol y ácido acético por los microorganismos productores de H₂ se muestra en la Ecuación 1.18.



Por otra parte, la presión parcial de CO₂ también afecta el rendimiento del proceso y la producción de biohidrógeno. Las células sintetizan formiato y succinato desde el CO₂, el cual actúa como un imán robando los electrones destinados a la producción de H₂ (Das *et al.*, 2014).

e) Inoculación de microorganismos. Algunos microorganismos anaerobios pueden producir biohidrógeno a partir de los carbohidratos de los desechos orgánicos. Dichos microorganismos pertenecen al género *Clostridium*, tales como *C. butyricum*, *C. termolacticum*, *C. pasteurianum*, *C. parapurificum* (Wang & Wan, 2008). La especie *Clostridium* produce gas H₂ durante su fase exponencial de crecimiento. Investigaciones en diversidad microbiana de una producción mesofílica de biohidrógeno a partir de lodo indican la presencia de la especie *Clostridia* en un 64.6% (Fang *et al.*, 2002).

f) 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 H₂ 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).

- g) 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, favoreciendo 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 H₂ (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), Zn, cobre (Cu) y 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 el Cr, Cu y Zn los elementos que más afección tienen sobre el metabolismo de los microorganismos acidogénicos (Das *et al.*, 2014).

- h) 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 H₂, que el inorgánico (Pandey *et al.*, 2013), de igual manera, se ha definido una relación óptima entre C:N la cual oscila entre 20 y 30 (Das *et al.*, 2014). Por otro lado, el ión fosfato (PO₄⁻³) es uno de los nutrientes inorgánicos más importantes requerido para la óptima producción de H₂, un exceso de fosfatos favorece la producción de biohidrógeno y de ácidos orgánicos volátiles (Show *et al.*, 2011).
- i) Concentración de ácidos orgánicos volátiles. Además de la producción de H₂ mediante fermentación anaerobia, metabolitos como etanol y los ácidos orgánicos volátiles son generados, 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). El incremento en la concentración de ácidos orgánicos volátiles aumenta la fuerza iónica del medio de cultivo causando lisis celular, al mismo tiempo, el exceso de protones permea la membrana celular de las bacterias productoras de H₂, corrompiendo el balance fisiológico de la célula (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).
- j) 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 H₂ (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 pH cercano a 5.5 (Chong *et al.*, 2009; Show *et al.*, 2011; Nanqi *et al.*, 2009). A pH mayor a 8 y menor a 4 no se ha reportado producción de H₂ (Yasin *et al.*, 2013).

k) 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). Muchos estudios han reportado que las temperaturas óptimas para la producción de H₂ son de 37°C en el rango mesofílico y 55°C en el termofílico (Wang & Wan, 2008). La temperatura del rango termofílico presenta los mejores rendimientos en la generación de biohidrógeno, sin embargo, se considera como temperatura óptima 37°C, debido al bajo requerimiento energético y a la mayor estabilidad del proceso (Canul, 2010).

1.3.5 Microorganismos productores de biohidrógeno

Los procesos mesofílicos son favorecidos debido al mínimo gasto energético, por otro lado, las fermentaciones termofílicas producen hidrógeno con mayores rendimientos y tasas de producción, además de inhibir a los microorganismos metanógenos y ser capaces de utilizar una amplia gama de sustratos (Nanqi *et al.*, 2009).

Existe un gran número de microorganismos capaces de producir hidrógeno 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 H₂ 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*" (Saratale *et al.*, 2008), la cual es una bacteria acidogénica anaerobia estricta que posee 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). Las bacterias *C. butyricum*, *C. welchii*, *C. pasteurianum*, *C. beijerincki* y *C. spp* han sido estudiadas debido a su capacidad para producir grandes cantidades de biohidrógeno a partir de azúcares fácilmente fermentables como hexosas y pentosas (Reith *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, depolimerizar celulosa y tener un metabolismo dirigido a H_2 , CO_2 , lactato, butirato, acetato y formato (Levin *et al.*, 2009).

Al igual que las bacterias *C. cellulovorans* y *C. cellulolyticum*, el microorganismo *Clostridium thermocellum* posee la capacidad de producir celulosomas, razón por la cual ha sido mayormente estudiado dentro del régimen termofílico (Qian *et al.*, 2012). La estructura de los celulosomas permite interacciones entre los componentes de la enzima, haciendo evidente que los mejores rendimientos de descomposición de celulosa son obtenidos cuando se forma un complejo entre celulosa, enzima y bacteria (Reed *et al.*, 2014). Un celulosoma es un complejo extra-celular de proteínas celulolíticas, multi-componente y macromolecular que regula la degradación de la celulosa, el cual permite la adhesión de las bacterias a las fibras de celulosa, iniciando así la hidrólisis de las zonas amorfas y cristalinas de dicho carbohidrato

(Levin *et al.*, 2009). La Figura 1.6 esquematiza la interacción entre enzimas, bacteria y las fibrillas de celulosa.

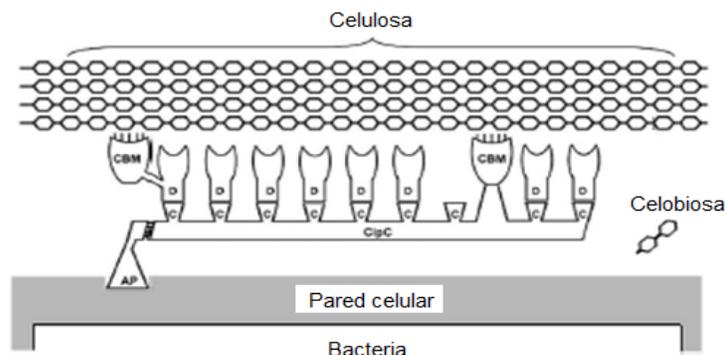


Figura 1.6 Representación del complejo celulosa-enzima-bacteria

El componente mayoritario del celulosoma es un poli péptido no enzimático que sirve de soporte a las subunidades enzimáticas, el cual se encuentra sobre la pared celular de la bacteria y es comúnmente conocido como “*scaffoldin*” (Levin *et al.*, 2009). En la Figura 1.5 se denotó como CipC.

Qian *et al.* (2012), investigaron la producción de H_2 a partir de tallos de maíz no tratados, empleando un consorcio de *Clostridium thermocellum* y *Clostridium thermosaccharolyticum*, los rendimientos reportados en su trabajo fueron 68.2 y 74.9 mL H_2 / g tallo de maíz, valores que demuestran el alto potencial que tiene la bacteria *Clostridium thermocellum* para fermentar compuestos ricos en lignocelulosa.

Además del *Clostridium*, otro género que presenta altos rendimientos para la producción de biohidrógeno es *Enterobacter sp.*, el cual puede fermentar carbohidratos en condiciones mesofílicas (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 (Reith *et al.*, 2003).

La producción de H₂ utilizando bacterias termofílicas e hiper-termofílicas ha sido identificada como un proceso de cinética favorable, que disminuye la contaminación del sustrato e inhibe la proliferación de bacterias metanogénicas (Chong *et al.*, 2009). Los cultivos termofílicos puros juegan un papel importante en la comprensión del uso directo de la celulosa como materia prima (Levin *et al.*, 2006), de los cuales los más estudiados han sido los géneros *Anaerocellum*, *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Dictyoglomus*, *Thermotoga*, *Spirocheta* y *Thermoanaerobacterium* (Reith *et al.*, 2003). La Tabla 1.5 resume algunos de los trabajos citados en la literatura, mostrando los rendimientos en la producción de biohidrógeno, los microorganismos utilizados y el sustrato empleado.

Tabla 1.5 Producción de biohidrógeno a partir de diferentes sustratos

SUSTRATO	MICROORGANISMO	MOL H ₂ / MOL HEXOSA	REFERENCIA
Glucosa	<i>Clostridium butyricum</i>	2.29	Lin <i>et al.</i> , 2007
Sacarosa	<i>Clostridium butyricum</i>	2.78	Liu & Shen, 2004
Rastrojo de arroz pretratado	<i>Clostridium butyricum</i>	0.91	Lo <i>et al.</i> , 2010
Jugo de azúcar de caña	<i>Clostridium butyricum</i>	1.33	Plangklang <i>et al.</i> , 2012
Residuos de frutas y verduras	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	2.74	Ávila, 2010
Glucosa	<i>Clostridium beijerincki</i>	1.97	Zhao <i>et al.</i> , 2011
Madera	<i>Clostridium thermocellum</i>	1.6	Levin <i>et al.</i> , 2006
Tallo de maíz	<i>Clostridium thermocellum</i>	0.45	Cheng <i>et al.</i> , 2011
Celulosa	<i>Clostridium thermocellum</i>	1.9	Lin <i>et al.</i> , 2007
Glucosa	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.2	Kumar <i>et al.</i> , 2000

Tabla 1.5 Producción de biohidrógeno a partir de diferentes sustratos (Continuación)

SUSTRATO	MICROORGANISMO	MOL H ₂ / MOL HEXOSA	REFERENCIA
Xilosa	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	2.24	Kadar <i>et al.</i> , 2004
Rastrojo de trigo	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	3.8	Ivanova <i>et al.</i> , 2009.
Galactosa	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.82	Ren <i>et al.</i> , 2009
Xilosa	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	2.19	Ren <i>et al.</i> , 2008
Rastrojo de maíz	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	2.24	Cao <i>et al.</i> , 2009
Glucosa	<i>Thermotoga neapolitana</i>	3	Ngo <i>et al.</i> , 2012
Cáscaras de papa	<i>Thermotoga neapolitana</i>	2.4	Mars <i>et al.</i> , 2010
Residuos de comida	<i>Lodos activados</i>	1.79	Hallenbeck & Ghosh, 2009
Residuos de comida	<i>Lodos activados</i>	2.5	Kim <i>et al.</i> , 2011
Residuos de comida	<i>Lodos activados</i>	1.82	Lee & Chung, 2010
Rastrojo de maíz	<i>Lodos activados</i>	2.84	Datar <i>et al.</i> , 2007
Rastrojo de maíz	<i>Lodos activados</i>	1.53	Liu & Cheng, 2010

1.3.6 Perspectivas de la producción y aplicación del biohidrógeno

Debido a su carácter no contaminante, el biohidrógeno ha sido considerado como una alternativa sustentable y sustituto de los combustible fósiles (Ya-Chieh *et al.*, 2012). Dicho combustible puede ser utilizado en máquinas de combustión, celdas de combustible y para la producción de electricidad, debido a que posee un alto poder calorífico (122 kJ/g) y genera agua como principal producto de combustión, características que convierten al H₂ en el combustible ideal (Xin *et al.*, 2010).

Se han reportado diversos trabajos referidos a la producción de biohidrógeno a partir de residuos vegetales y de comida obteniendo resultados prometedores: 1.82 mol H₂/mol hexosa (Lee & Chung, 2010), 2.5 mol H₂/mol hexosa (Kim *et al.*, 2011) y 1.79

mol H₂/mol hexosa (Hallenbeck & Ghosh, 2009). Sin embargo, pocos han sido los trabajos dirigidos a la obtención de H₂ utilizando residuos agrícolas, esto debido a su estructura rígida y a su alto contenido de lignocelulosa (Chayanon *et al.*, 2014). La estructura de la fracción lignocelulósica puede alterarse para incrementar la viabilidad metabólica de los microorganismos y con ello la producción de biocombustibles, utilizando métodos de pretratamiento físico, biológico y químico (Nanqi *et al.*, 2009), siendo este último tratamiento el más eficiente, ya que disminuye la cristalinidad de la celulosa, remueve la lignina e incrementa la biodegradabilidad del material orgánico (Shuvashish *et al.*, 2014).

Recientemente, la producción de H₂ a partir termófilos y termófilos extremos, ha tomado relevancia (Tam *et al.*, 2008). Algunas bacterias como *C. thermocellum*, *T. neapolitana*, *T. marítima*, *T. thermosaccharolyticum* y *C. saccharolyticus* son capaces de generar biohidrógeno a altas tasas de producción y altos rendimientos utilizando lignocelulosa (Ya-Chieh *et al.*, 2012).

Gadow y colaboradores en 2012 estudiaron la producción de biohidrógeno a partir de celulosa, utilizando un consorcio microbiano proveniente de lodos de plantas residuales, las fermentaciones se llevaron a cabo en condiciones mesofílicas, termofílicas e híper termofílicas, demostrando al final del proceso que las bacterias termofílicas e híper termofílicas producen H₂ a altos rendimientos, 2.73 y 3.43 (mol H₂ / mol hexosa) respectivamente. Tam *et al.* (2008), elaboraron diferentes medios de cultivo con la finalidad de optimizar el crecimiento de los microorganismos y la producción de biohidrógeno, utilizando las bacterias híper-termofílicas *T. marítima* y *T. neapolitana*, concluyendo que un medio hecho a base de sales de fosfato y extracto de soya permite un mejor metabolismo, ya que lograron obtener rendimientos de 1.67 y 1.84 (mol H₂ / mol hexosa) empleando glucosa como fuente de carbono.

Durante los últimos años se han buscado tecnologías que permitan mejorar la producción de biohidrógeno, entre las principales se encuentra el sistema acoplado entre fermentación anaerobia y bioelectrohidrogenesis, que es capaz de alcanzar rendimientos de 12 mol H₂ / mol hexosa (Nanqi *et al.*, 2009). Cheng y Logan (2007), acoplaron un proceso de bioelectrohidrogenesis obteniendo un rendimiento máximo de 8.2 mol H₂ / mol hexosa, este resultado sugirió que el sistema de fermentación anaerobia acoplado a bioelectrohidrogenesis representa el único proceso que permite convertir completamente la materia orgánica a H₂ en ausencia de luz solar.

El biohidrógeno obtenido puede ser utilizado en diferentes sectores energéticos. Calero (2011), mostró el potencial que tiene este combustible empleándolo en motores de combustión interna y calentadores domésticos. Por otro lado, en algunos países como Estados Unidos el biohidrógeno es utilizado principalmente en medios de transporte, celdas de combustible y motocicletas (Tarek *et al.*, 2014). Países como Indonesia, India y China han buscado implementar las tecnologías relacionadas con la producción de biohidrógeno para la generación de electricidad y calentamiento de hogares en zonas rurales (Susilaningih *et al.*, 2014).

2. METODOLOGÍA

Las etapas seguidas en el presente trabajo se muestran de manera esquemática en la Figura 2.1. La descripción de cada una de las actividades se detallada en los apartados posteriores.

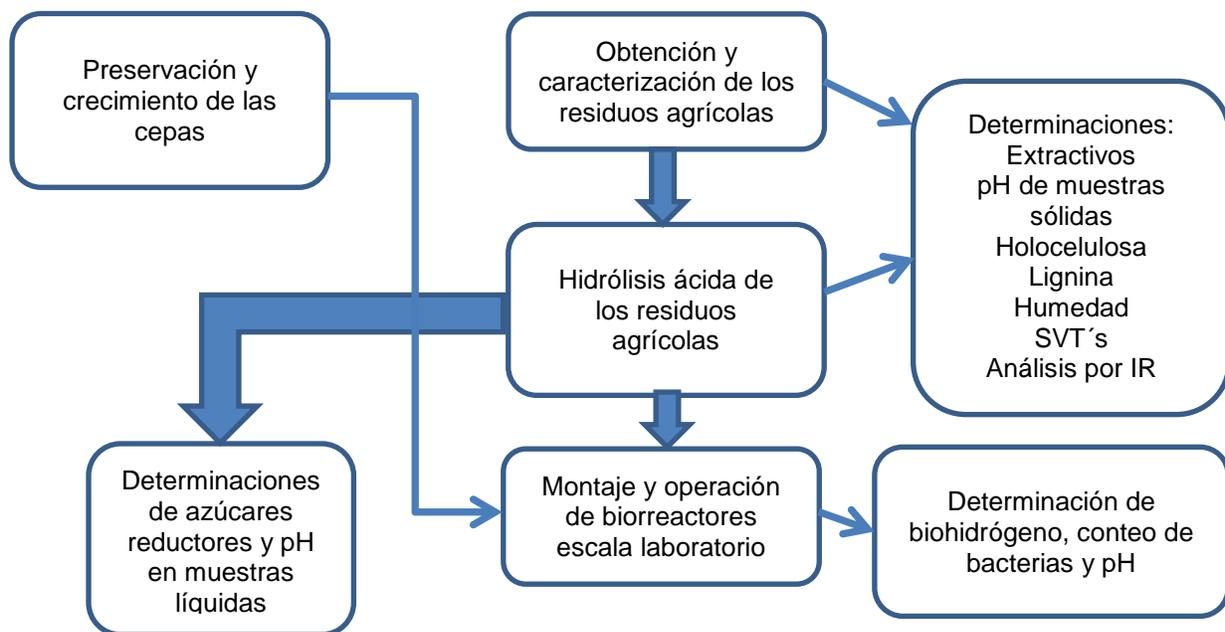


Figura 2.1 Metodología establecida para el trabajo de investigación

2.1 Preservación y crecimiento de cepas

Para preservar las bacterias primero se preparó el medio de cultivo añadiendo 2.975 g de tioglicolato con rezarsurina en 100 mL de agua desionizada y se agitó vigorosamente hasta que el medio viró de color azul pardo a rosa. La atmósfera libre de oxígeno se consiguió tomando como base el método de Hungate modificado (Terry *et al.*, 1974), para ello se adicionaron 10 mL de medio de cultivo en viales de 20 mL, los cuales se sellaron con un tapón de hule y un capuchón de aluminio. Posteriormente, los viales fueron calentados en una parrilla y con ayuda de una jeringa de insulina se burbujeó nitrógeno hasta que el color del medio se tornó amarillo (Figura 2.2). Para evitar una presión excesiva dentro de los viales, una

segunda jeringa fue colocada a fin de purgar los viales y disipar al ambiente el oxígeno, vapor de agua y nitrógeno en exceso.



Figura 2.2 Preparación de medio de cultivo anaerobio por Método de Hungate

La Figura 2.3 presenta el medio de cultivo de tioglicolato con rezarsurina en condiciones aerobias y anaerobias.

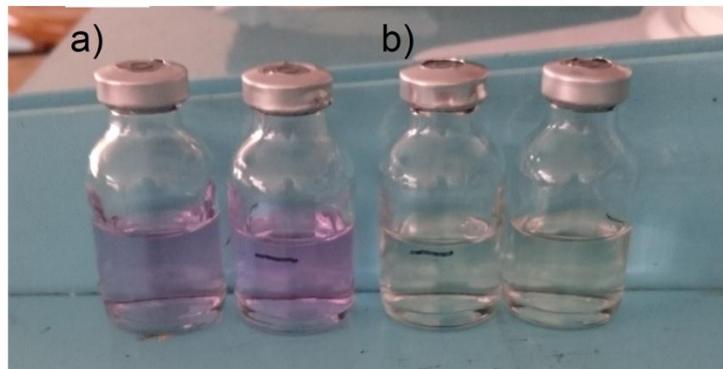


Figura 2.3 Medio de cultivo estéril a) aerobio y b) anaerobio

La rezarsurina en el medio de cultivo empleado juega un papel primordial al ser un indicador de la presencia de oxígeno. Si la atmósfera del medio es aerobia presenta

un color rosa, por otro lado si el ambiente es anaerobio, el color tiende a ser amarillo. Una vez alcanzada la condición anóxica dentro de los viales, se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 psi, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Las bacterias *C. butyricum* y *E. cloacae* fueron inoculadas en condiciones de asepsia en cada uno de los viales previamente preparados y esterilizados. Para ello se limpió con etanol al 70%v el área de trabajo, los viales y el material; se encendió un mechero bunsen y con ayuda de una jeringa de insulina se succionaron 0.10 mL de cada una de las cepas, adicionándolas posteriormente en los viales estériles. Los viales sembrados se incubaron a 32°C durante 24 horas. Finalmente, se almacenaron en refrigeración a 4°C. Esta metodología se llevó a cabo mes con mes hasta el término de la investigación.

2.2 Obtención y caracterización de residuos agrícolas

Debido a que los cultivos predominantes en el Estado de México son el haba y el maíz, los rastrojos de dichos cultivos fueron elegidos como materia prima para la producción de azúcares fermentables y de bihidrógeno. Dichos rastrojos se obtuvieron del municipio de Xalatlaco, perteneciente al Valle de Toluca, teniendo cuidado de que no tuvieran contacto con fertilizantes químicos ni plaguicidas. Posteriormente se almacenaron en bolsas herméticas y se trasladaron al Laboratorio de Pruebas Piloto (LPP) del Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA) del Instituto Tecnológico de Toluca (ITTol). El componente principal del rastrojo de haba fue el tallo, razón por la cual dicho componente se utilizó como un sustrato individual. Por otro lado, los residuos de maíz se clasificaron en: olote y rastrojo, esto debido a que el olote de maíz es considerado como uno de los principales contaminantes agrícolas de difícil degradación.

Con la finalidad de determinar el pH y el contenido de holocelulosa, lignina y Sólidos Volátiles Totales (SVT) en cada uno de los rastrojos antes de la hidrólisis ácida, así

como su análisis por espectroscopia de IR, los residuos agrícolas se secaron a 45°C durante 24 horas y se trituraron con ayuda de un molino mecánico marca “Azteca”, posteriormente se tamizaron a malla No. 60 durante 10 minutos y se recuperaron las partículas menores a 250 µm. Las metodologías empleadas para dichos análisis se detallan en el Anexo A.

Por otra parte, una extracción previa con solventes polares se realizó con la finalidad de eliminar compuestos intermediarios tales como la clorofila, terpenos y resinas, los cuales interfieren en la cuantificación de carbohidratos en fase sólida (Colín-Urieta *et al.*, 2007). A fin de determinar el efecto de la extracción orgánica sobre la cuantificación de holocelulosa y lignina, se determinó por duplicado las fracciones másicas de ambos carbohidratos en rastrojos vírgenes e hidrolizados durante 30, 60, 90 y 120 minutos utilizando una solución al 3%v de H₃PO₄ y una temperatura de 100°C. La extracción se llevó a cabo mediante reflujo soxhlet (Figura 2.4a), mientras que las técnicas del clorito y de digestión total de carbohidratos fueron empleadas para la determinación de holocelulosa (Figura 2.4b) y lignina respectivamente. Las técnicas se detallan en el los Anexos A4, A5 y A6. Finalmente, los rastrojos fueron analizados antes y después de la extracción orgánica mediante espectroscopia de IR.

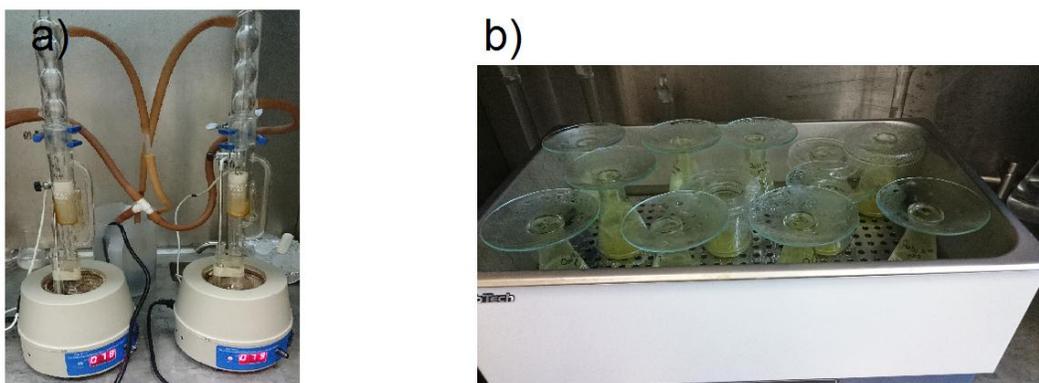


Figura 2.4 Técnicas empleadas para a) extracción orgánica y b) holocelulosa

2.3 Hidrólisis ácida de los residuos agrícolas

La hidrólisis ácida de los residuos agrícolas se llevó a cabo mediante la adición de H_3PO_4 a las concentraciones de 3 y 7%v y a las temperaturas de 100 y 130 °C, condiciones que fueron propuestas con base a lo reportado por Cao *et al.* (2009), Guerra-Rodríguez *et al.* (2012), Hong *et al.* (2012), Lenihan *et al.* (2010) y López-Linares *et al.* (2013). La Figura 2.5 resume la metodología empleada en la etapa de hidrólisis.

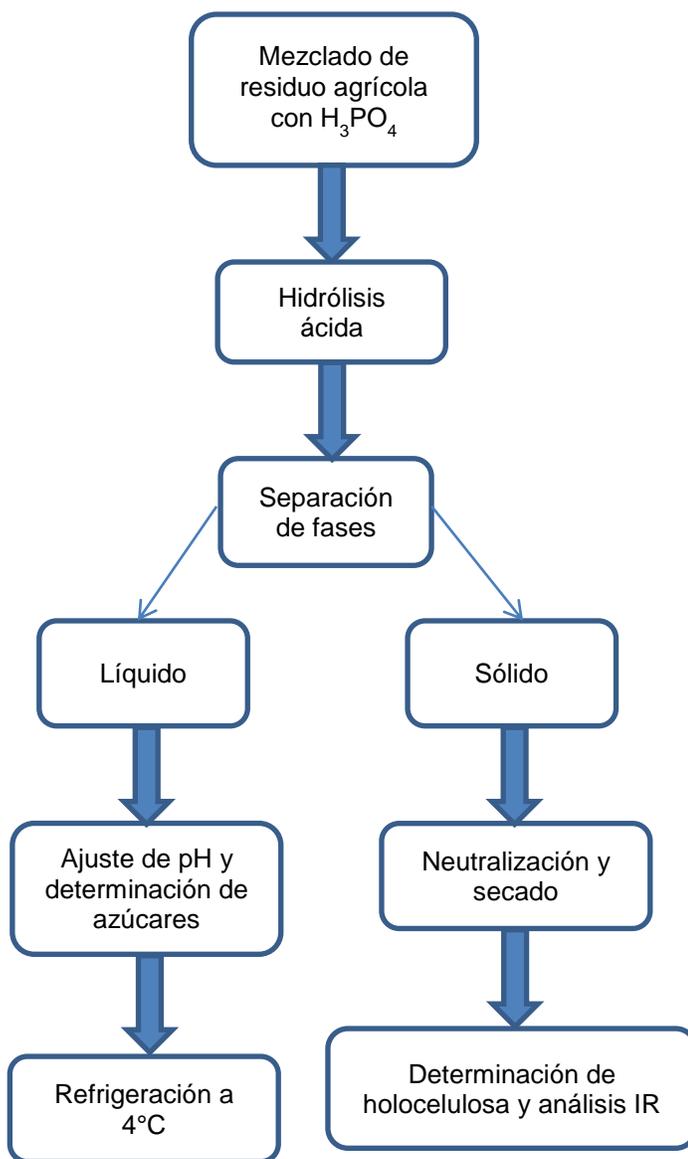


Figura 2.5 Metodología empleada para la hidrólisis ácida de los residuos agrícolas

Los sistemas empleados como reactores fueron frascos de 140 mL con tapas herméticas, en los cuales se adicionaron 5 g de sustrato y 75 mL de H_3PO_4 , manejando así una relación sólido-líquido de 1:15. Las fases dentro del frasco se homogeneizaron. Posteriormente los frascos se colocaron en un horno marca “Riossa Digital HCF-62” y se dejaron reaccionar durante 15, 30, 60, 90 y 120 minutos a la temperatura de operación definida. Cada una de las hidrólisis se llevó a cabo por duplicado. Al término de la hidrólisis los frascos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, la fase líquida se separó por filtración utilizando papel Whatman No. 40, se determinó su pH y aplicando la ecuación 1.2 se determinó el CSF para cada uno de los tiempos de cada experimento. Además se determinó el contenido de azúcares reductores en cada uno de los hidrolizados y se ajustó al modelo cinético de Saeman utilizando un análisis por regresión no lineal en el software Origin 8.6. Finalmente, se determinó su contenido de azúcares reductores y se refrigeró a 4 °C. Por otro lado, el sólido remanente de la hidrólisis ácida se llevó hasta pH neutro utilizando agua destilada a 75°C y se secó en una estufa a 45°C durante 48 horas. Finalmente se determinó su contenido de holocelulosa y se analizó por espectroscopía de IR.

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de los rastrojos agrícolas en presencia de ácido en tiempos de contacto cortos, se propuso un primer experimento de hidrólisis utilizando tallo de haba como materia prima a 100°C, agregando H_3PO_4 al 3 y 7%v. La reacción se efectuó durante 2, 6, 10 y 15 minutos, determinándose al final del proceso las dinámicas de degradación de lignina, holocelulosa y SVT.

2.3.1 Cinética de degradación de holocelulosa

El sólido remanente de la hidrólisis ácida se enjuagó con agua a 75°C hasta pH neutro y se secó en una estufa a 45°C durante 48 horas. Posteriormente, se pesó y se determinó el porcentaje de biomasa hidrolizada utilizando la ecuación 2.1.

$$\% \text{ Hidro} = 100 - \frac{W_f * 100}{W_i} \quad \text{Ec 2.1}$$

Donde % Hidro es el porcentaje de sólido hidrolizado después del tratamiento, W_f es el peso final de la biomasa y W_i el peso inicial. El porcentaje de holocelulosa se determinó en cada uno de los sólidos hidrolizados, posteriormente se calculó la cantidad de dicho carbohidrato en función del tiempo y se ajustó al modelo cinético de primer orden utilizando las ecuaciones 2.2 y 2.3.

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a - x) \quad \text{Ec 2.2}$$

$$\ln \frac{a}{a-x} = k_1 t \quad \text{Ec. 2.3}$$

En donde a es el contenido inicial de holocelulosa y x es la pérdida de carbohidrato dado al tiempo t . La ecuación cinética de primer orden se transformó a su forma lineal, se determinó la constante de velocidad de reacción y el coeficiente de correlación para cada uno de los experimentos.

2.4 Montaje y operación de biorreactores escala laboratorio

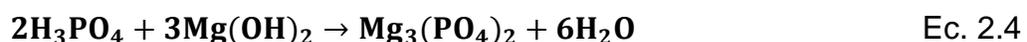
La producción de biohidrógeno se llevó a cabo a escala laboratorio, utilizando viales de 20 mL como biorreactores similares a los empleados para la conservación de los microorganismos. Las bacterias utilizadas para la producción de biohidrógeno fueron *C. butyricum* y *E. cloacae*, ambos microorganismos han sido reportados por Ávila (2010), Plangklang *et al.* (2012) y por Lin *et al.* (2007), como opciones viables para la producción de biohidrógeno en régimen mesofílico mediante fermentación anaerobia.

El medio de cultivo se seleccionó con base al trabajo realizado por Ávila (2010), el cual está formado por sales de fosfato y amonio que además de brindar nutrientes a las bacterias, posee la capacidad de fungir como solución amortiguadora. El medio de cultivo utilizado en la fermentación se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Composición del medio de cultivo empleado en la fermentación

REACTIVO	g / L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	4.5
K ₂ HPO ₄	10.5
Resarzurina	0.1

El hidrolizado que mostró el mejor rendimiento para la recuperación de azúcares tanto del tallo de haba como del olote, fue utilizado como sustrato para la fermentación. Para ello, se tomaron 20 mL de hidrolizado y mediante la reacción química mostrada en la ecuación 2.4 se determinó la cantidad de hidróxido de magnesio (Mg(OH)₂) necesaria para precipitar el exceso de fosfatos.



El Mg(OH)₂ se seleccionó ya que al reaccionar con H₃PO₄ genera fosfato de magnesio tribásico (Mg₃(PO₄)₂), el cual precipita al ser un compuesto insoluble en agua y puede ser utilizado como regulador metabólico así como suplemento alimenticio. Una vez precipitado el Mg₃(PO₄)₂, el sobrenadante se separó mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos, se determinó su volumen y se cuantificó su contenido de azúcares reductores empleando la técnica DNS.

En viales de 20 mL se adicionaron 10 mL de medio de cultivo y 350 µL de hidrolizado previamente tratado con Mg(OH)₂, cada uno de los viales se cerraron con el tapón de hule, se sellaron con capuchas de aluminio y utilizando el método de Hungate modificado se pusieron en condiciones anóxicas. Posteriormente, los viales se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C y a una presión de 1.1 kg/cm². Los viales fueron inoculados con 0.05 mL de *C. butyricum* y con 0.05 mL de *E. cloacae* manejando así una proporción 1:1 entre los microorganismos, posteriormente, los viales fueron colocados en un tanque de calentamiento con agitación el cual había sido previamente ajustado a 37°C y 40

rpm. A diferentes tiempos de contacto, se tomaron viales tanto de olote como de tallo de haba y se cuantificó el porcentaje de biohidrógeno generado, el pH y el crecimiento microbiano mediante la técnica de cuenta directa en microscopio (Anexo B3).

El análisis de biogás se llevó mediante Cromatografía de gases (CG), en un cromatografo “*Varian 3600*”, empleando una columna empacada, argón como fase móvil y un detector de conductividad térmica (TCD). El Anexo D muestra las condiciones de operación del cromatografo así como la curva de calibración empleada para la determinación de biohidrógeno.

2.5 Determinaciones analíticas

La Tabla 2.2 resume las técnicas analíticas e instrumentales empleadas en el presente trabajo de investigación, mientras que en los Anexos A y B se detalla cada una de las técnicas.

Tabla 2.2 Técnicas analíticas

ANÁLISIS	APLICABILIDAD	MÉTODO O TÉCNICA
pH	Análisis de lixiviados, hidrolizados y materia prima	NMX-AA-008-SCFI-2011 (SEMARNAT, 2014a)
Contenido de humedad	Análisis de los residuos agrícolas antes y después de la hidrólisis	NMX-AA-016-1984 de la (SEMARNAT, 2014b)
Sólidos Volátiles Totales (SVT)	Análisis de los residuos agrícolas antes de la hidrólisis, así como antes y después de la fermentación	Técnica 2540G del Standard Methods (APHA, 1998)
Holocelulosa	Análisis de los residuos agrícolas antes y después de la hidrólisis	Método del clorito (Wise <i>et al.</i> , 1946)
Lignina y extractivos	Eliminación de aceites y análisis de los residuos agrícolas antes de la hidrólisis	Método ASTM D1106-56 (Colín-Urieta <i>et al.</i> , 2007)
Determinación de azúcares	Rendimiento de conversión holocelulosa a azúcares	Método DNS (Miller, 1959)

Tabla 2.2 Técnicas analíticas (Continuación)

Análisis	Aplicabilidad	Método o técnica
Enlaces, grupos funcionales, celulosa, hemicelulosa y lignina	Análisis IR de los residuos antes y después de la hidrólisis	Método convencional para el análisis IR de muestras sólidas (Stuart, 2004)
H ₂ , CO ₂ y ácidos orgánicos volátiles	Caracterización de biogás y cuantificación de biohidrógeno y ácidos orgánicos obtenidos en las fermentaciones	Cromatografía de gases (Ávila, 2010)
Crecimiento microbiano	Cinética de crecimiento microbiano de cada una de las cepas	Cámara Petroff-Hausser (Madigan <i>et al.</i> , 2003)

3. RESULTADOS

El presente capítulo describe y discute la producción de azúcares reductores y la pérdida másica de holocelulosa para cada uno de los rastrojos, ajustando el comportamiento en función del tiempo a los modelos cinéticos de Saeman y de primer orden. Además comprende la producción de biohidrógeno, el crecimiento de las bacterias y la comparación de rendimientos con los citados en la literatura son discutidos.

3.1 Caracterización de los residuos agrícolas

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

Tabla 3.1 Caracterización de los rastrojos vírgenes

ANÁLISIS	OLOTE	RASTROJO DE MAÍZ	TALLO DE HABA
Humedad	4.52 ± 0.15%	4.40 ± 0.23%	3.27 ± 0.11%
SVT's	96.96 ± 0.07%	87.25 ± 0.47%	92.18 ± 0.18%
Holocelulosa	65.38 ± 0.11%	64.17 ± 0.66%	61.48 ± 0.30%
Lignina	7.11 ± 0.47	16.33 ± 0.11%	12.16 ± 0.66%
pH	5.63 ± 0.005	6.77 ± 0.053	5.60 ± 0.013

Los pH's determinados en el olote y en el tallo de haba resultaron similares entre sí, variando únicamente un 0.03%. El mayor contenido de holocelulosa se observó en el olote con un promedio de 65.38%, valor que resultó cercano al determinado en el rastrojo de maíz (64.17%). El tallo de haba fue el rastrojo con menor porcentaje de holocelulosa (61.48%), comparado con lo reportado por Petersson *et al.* (2007) resultó mayor, ya que ellos encontraron un porcentaje aproximado al 48.8% base seca. Por otra parte, la lignina en el tallo de haba fue de 12.16%, casi el mismo que el 14.4% determinado también por Petersson *et al.* (2007). En la Figura 3.1 se reportan los porcentajes de carbohidratos calculados en el olote, rastrojo de maíz y tallo de haba.

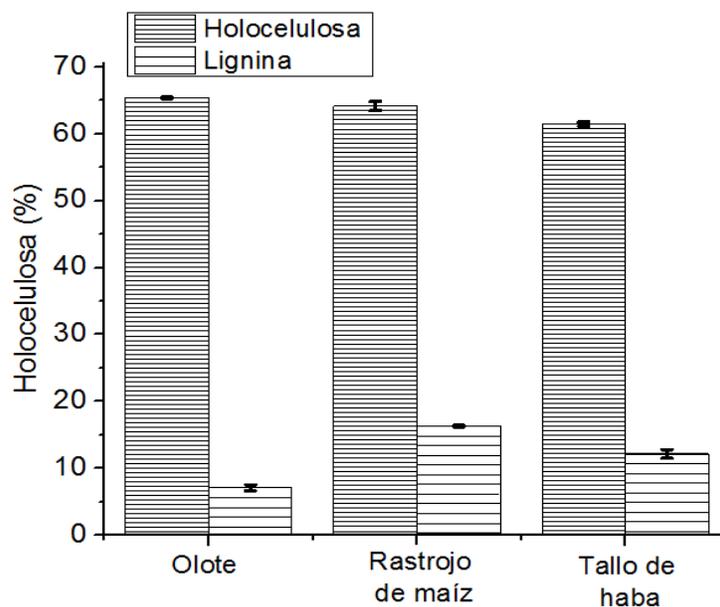


Figura 3.1 Contenido de carbohidratos en los rastrojos vírgenes

El rastrojo de maíz empleado por Cao *et al.* (2009) para la recuperación de sacáridos a partir de H_2SO_4 , estaba conformado principalmente por holocelulosa y lignina alcanzando porcentajes de 61.1% y 19.1% respectivamente, dichas fracciones másicas resultaron similares a las obtenidas en el presente trabajo; 64.17% de holocelulosa y 16.33% de lignina. Por otra parte, la composición del olote puede compararse con lo determinado por Li *et al.* (2016), quienes encontraron porcentajes de 68.2% y 15.4% para holocelulosa y lignina. La diferencia en el porcentaje de lignina con el 7.11% mostrado en la Tabla 3.1 puede atribuirse tanto a la naturaleza del rastrojo como al tipo de lignina encontrada. Finalmente, el porcentaje de SVT's de cada uno de los rastrojos fue superior a 85%, sugiriendo una cantidad mínima de minerales.

3.1.1 Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de carbohidratos en residuos agrícolas vírgenes

La extracción con solventes poco polares ha sido reportada por Colín-Urieta y colaboradores (2007) como una etapa previa a la determinación de holocelulosa y lignina, la cual tiene la finalidad de eliminar compuestos intermediarios tales como

clorofila, resinas y aceites que afecten la cuantificación de carbohidratos. Para identificar el efecto de la extracción sobre la determinación de holocelulosa y lignina, se contrastaron los porcentajes obtenidos en muestras de tallo de haba, olote y rastrojo de maíz no hidrolizados. La Tabla 3.2 resume los porcentajes de holocelulosa y lignina obtenidos en muestras con extracción (c/e) y sin extracción (s/e).

Tabla 3.2 Porcentajes de holocelulosa y lignina en rastrojo virgen con y sin extracción

MATERIA PRIMA	% HOLOCELULOSA	% LIGNINA
Tallo de haba c/e	61.48 ± 0.30	12.16 ± 0.66
Tallo de haba s/e	53.08 ± .03	14.38 ± 0.33
Rastrojo de maíz c/e	64.17 ± 0.66	16.33 ± 0.11
Rastrojo de maíz s/e	56.33 ± 1.01	17.19 ± 0.08
Olote c/e	65.38 ± 0.26	6.65 ± 0.24
Olote s/e	61.56 ± 0.11	7.58 ± 0.17

La materia orgánica que presentó la mayor discrepancia en las determinaciones de carbohidratos debida a la extracción fue el tallo de haba, ya que los porcentajes de holocelulosa de las muestras con y sin extractivos fueron respectivamente 61.48% y 53.08%, mostrando una diferencia de 8.4%, mientras que la desviación en el porcentaje de lignina en el tallo de haba fue de 2.21%. Por otro lado, la extracción no mostró un efecto significativo sobre el olote, detectándose que las diferencias en los porcentajes de lignina y holocelulosa fueron de 0.93% y 3.8% respectivamente.

Los porcentajes promedio de holocelulosa y lignina en el rastrojo de maíz tomando en cuenta el valor con y sin extracción fueron de 60.25% ± 3.92 y 16.76% ± 0.86% respectivamente, valores similares a los reportados por Chayanon *et al.* (2014), quienes calcularon un porcentaje de holocelulosa de 59.9% y de lignina de 17.6%.

En cada uno de los espectros mostrados en el presente trabajo, las letras H, C y L corresponden a hemicelulosa, celulosa y lignina respectivamente, así mismo, el

símbolo β hace referencia al enlace β 1-4 glucosídico propio de la celulosa y hemicelulosa. Para el análisis de los espectros se tomaron como base los trabajos de Cross *et al.* (1969), Gómora (2014), Hsu *et al.* (2010), Nikonenko *et al.* (2000), Schulz *et al.* (2007), Stuart (2004) y Xu *et al.* (2012). Los espectros de IR de las muestras de tallo de haba virgen antes y después de la extracción orgánica se presentan en la Figura 3.2.

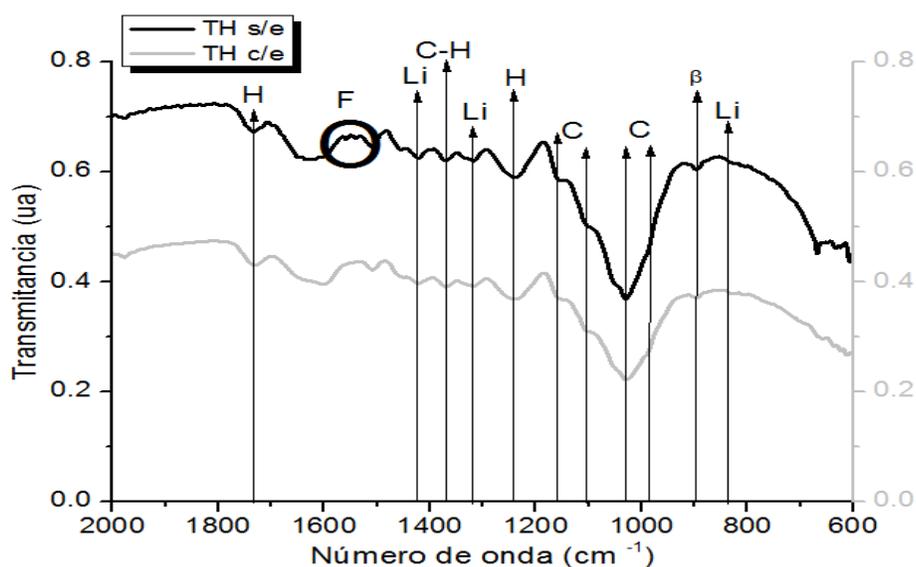


Figura 3.2 Espectros de IR del Tallo de haba virgen c/e y s/e orgánica

En ambos espectros se observaron las vibraciones a 983, 1036, 1102 y 1156 cm^{-1} correspondientes a los enlaces C-O y C-C de la celulosa, por otra parte la hemicelulosa se encontró a 1244 y 1726 cm^{-1} , esta última vibración corresponde a la absorción del enlace C=O propio de los grupos acetil. El enlace β 1-4 glucosídico (C-O-C) presente en la celulosa y hemicelulosa se observó a 896 cm^{-1} . Por otra parte, el anillo aromático de la lignina se encontró a 1511 y 1590 cm^{-1} , mientras que los enlaces C-H de la parte alifática se presentaron en 1425 cm^{-1} . La diferencia más importante entre los espectros mostrados en la Figura 3.2 fue la presencia de dos bandas de absorción a 1560 y 1537 cm^{-1} ambas denotadas con la letra F observadas en el tallo de haba sin extracción, las cuales de acuerdo con Heneczowski *et al.*

(2001) son propias de los metabolitos secundarios poliaromáticos, encontrados en las plantas en forma de flavonoides.

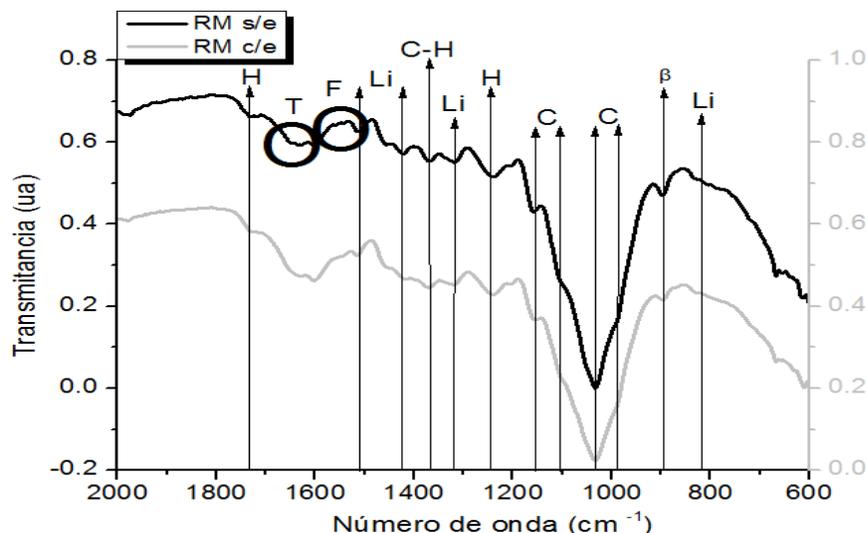


Figura 3.3 Espectros de IR del rastrojo de maíz virgen c/e y s/e orgánica

Los espectros de IR del rastrojo de maíz antes y después de la extracción orgánica se muestran en la Figura 3.3. Al igual que los espectros del tallo de haba, los espectros del rastrojo mostraron una predominancia de las vibraciones características de celulosa, lignina y hemicelulosa. La presencia de flavonoides en el rastrojo que no fue sometido a extracción se encontró a los mismos valores de 1560 y 1537 cm^{-1} , además se observó una banda de vibración a 1644 cm^{-1} denotada como "T" la cual de acuerdo al trabajo de Schulz *et al.* (2001), se atribuye a la presencia del enlace C=C de los mono terpenos.

Debido a que algunas de las vibraciones características de los mono terpenos se encuentran en un rango de 1000 a 1300 cm^{-1} , un análisis más minucioso sobre dichos componentes no pudo realizarse, ya que las vibraciones de celulosa no permitió observarlas en un intervalo de 950 a 1200 cm^{-1} . Por otra parte, la clorofila considerada como un intermediario importante no puede ser detectada mediante espectroscopia IR. Un análisis gravimétrico o mediante espectroscopia Raman

permitiría observar la eliminación de dicho compuesto después de la extracción orgánica.

3.1.2 Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de holocelulosa en desechos agrícolas hidrolizados

Las mayores desviaciones se encontraron en la determinación de holocelulosa en rastrojo de maíz, ver tabla 3.2, los errores son de 10.1 y 6.66% y para la lignina del tallo de haba sin y con extracción son de 3.3 y 6.6 % respectivamente.

Comparando los resultados de holocelulosa con y sin extracción para tallo de haba y rastrojo de maíz, los valores se incrementaron en aproximadamente 8%, en cambio para el olote la diferencia fue de tan solo 3.8 %, esto puede deberse a que el olote es un sustrato con bajo contenido de clorofila, terpenos y resinas. Las Figuras 3.4 y 3.5, reportan los resultados con sus respectivas barras de error de holocelulosa obtenidos con y sin extracción para las muestras hidrolizadas de tallo de haba y de rastrojo de maíz.

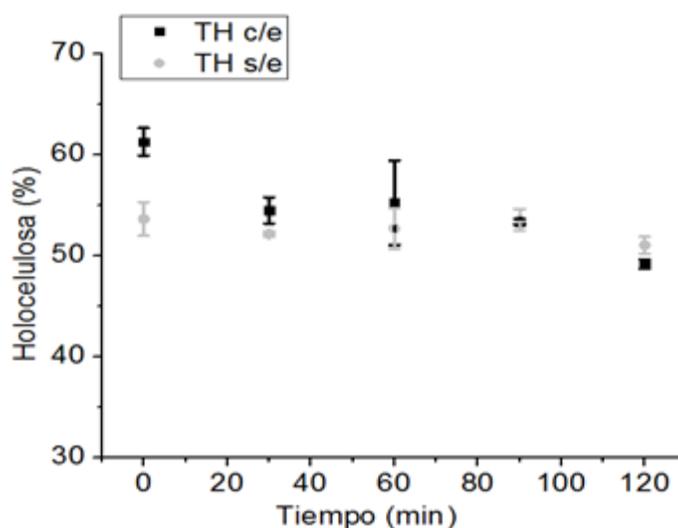


Figura 3.4 Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado

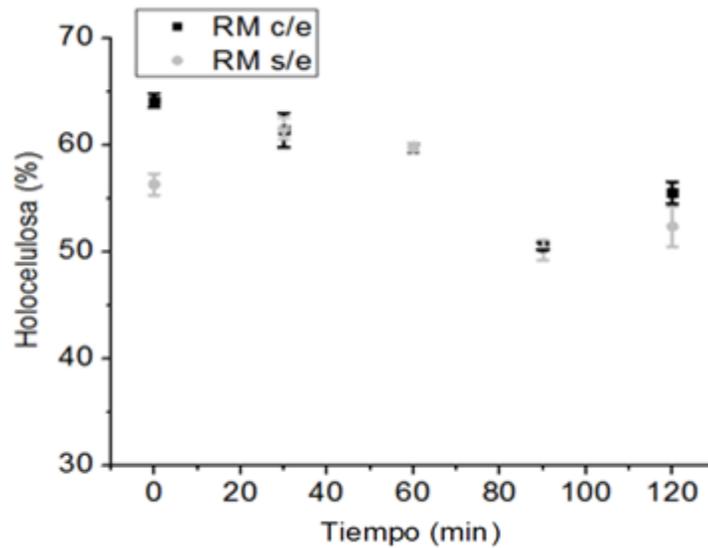


Figura 3.5 Efecto de la extracción orgánica sobre la determinación de holocelulosa en el rastrojo de maíz hidrolizado

El contenido de holocelulosa en las muestras de rastrojo de maíz con y sin extracción orgánica después de la hidrólisis ácida no mostraron diferencia significativa, ya que los errores determinados con base a la desviación estándar de los porcentajes de holocelulosa antes y después de la extracción orgánica exceptuando la muestra de 120 minutos fueron menores al 0.5%. La diferencia de medias entre los porcentajes de holocelulosa con y sin extracción para cada uno de los rastrojos se llevó a cabo mediante la prueba t-student, los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado en la plataforma SPSS 13.0 con una significancia del 0.05 se muestran en la Tabla 3.

Las medidas de correlación que muestran la interacción en el comportamiento de los datos con y sin extracción arrojaron los valores de 0.470 y 0.778 para el tallo de haba y rastrojo de maíz respectivamente, haciendo notar que el comportamiento en función del tiempo de la fracción holocelulósica del rastrojo de maíz fue similar tanto en las muestras extraídas como sin extracción. Por otra parte, el análisis estadístico determinó que no existen diferencias significativas entre las muestras con y sin

extracción, ya que las significancias calculadas para ambos rastrojos resultaron mayores a 0.05.

Tabla 3.3 Análisis estadístico del porcentaje de holocelulosa en función de la extracción orgánica

ANÁLISIS	% HOLOCELULOSA	% DESVIACIÓN	CORRELACIÓN	SIG.	T-STUDENT	SIG.
TH ce	54.72	4.36	0.430	0.470	0.711	0.516
TH se	53.46	2.21				
RM ce	58.28	5.34	0.778	0.121	1.466	0.216
RM se	56.04	4.800				

Finalmente, los espectros de IR del tallo de haba y del rastrojo de maíz hidrolizados a partir de 30 minutos con y sin extracción no mostraron la presencia de flavonoides ni de mono terpenos, sugiriendo que la hidrólisis ácida descompone los intermediarios presentes en los residuos agrícolas. Este comportamiento se había reportado anteriormente en el trabajo de Vasconcelos *et al.* (2013), quienes estudiaron la hidrólisis del rastrojo de caña en presencia de ácido fosfórico y observaron que además de recuperar azúcares, el tratamiento ácido remueve en su totalidad a los extractivos.

La Figura 3.6 muestra los espectros de IR del tallo de haba hidrolizado durante 30 minutos, donde la abreviatura c/e hace referencia a la muestra con extracción y s/e al tallo sin extracción. Las vibraciones observadas en su mayoría corresponden a celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo las más intensas y de mayor amplitud las pertenecientes a celulosa (950 – 1200 cm⁻¹).

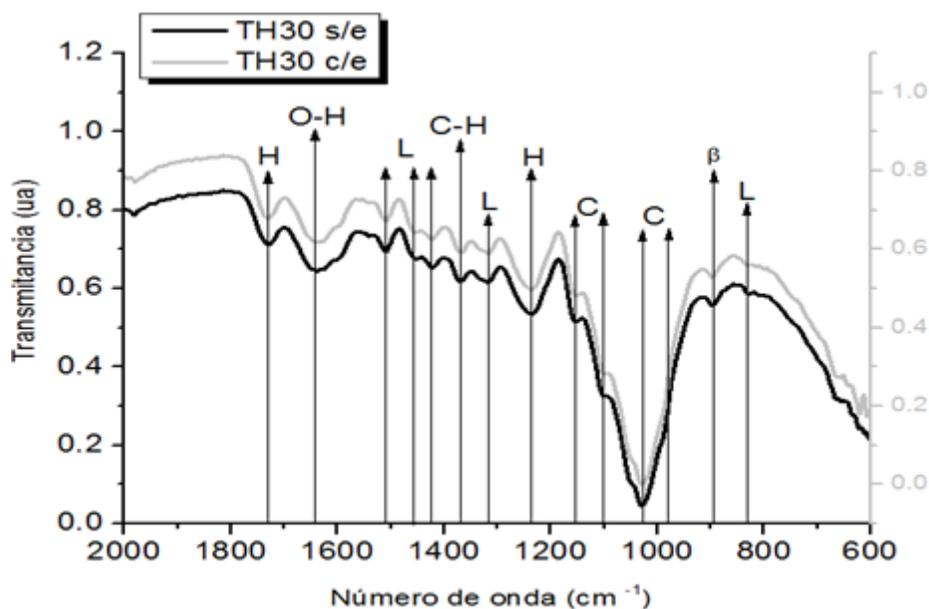


Figura 3.6 Espectros de IR del tallo de haba hidrolizado durante 30 minutos c/e y s/e orgánica

3.2 Hidrólisis ácida de tallo de haba

La cinética de producción de azúcares, la degradación de holocelulosa, un análisis IR del sólido remanente, así como los primeros ensayos de hidrólisis se muestran en los siguientes apartados.

3.2.1 Degradación de holocelulosa, lignina y SVT's

El primer ensayo de hidrólisis se realizó sobre tallo de haba a 100°C, 3%v de H₃PO₄ y tiempos de contacto de 2, 6, 10 y 15 minutos, los porcentajes de holocelulosa, lignina y SVT's se ajustaron a base 100 tomando como base los valores obtenidos en el tallo de haba no hidrolizado. En cada uno de los casos se observó 2 fases de degradación, la primera de ellas rápida, entre los 0 y 2 minutos, mientras que la segunda etapa se presentó a partir de los 6 minutos. La Figura 3.7 muestra los porcentajes de SVT's determinados en dicho experimento.

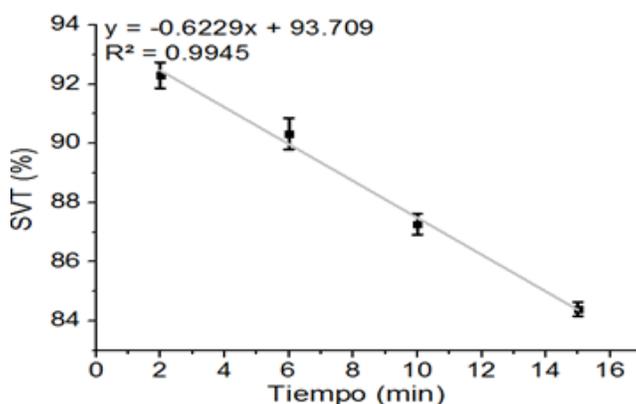


Figura 3.7 Degradación de los SVT's en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 3% H_3PO_4

La disminución en el porcentaje de SVT's fue de 8% entre los 2 y 15 minutos de reacción, la fase de estabilización no se observó en el gráfico de la Figura 3.7, tendencia similar presentó la dinámica del contenido de lignina, la cual disminuyó de 90% a 77.2% después de 15 minutos de reacción (Figura 3.8).

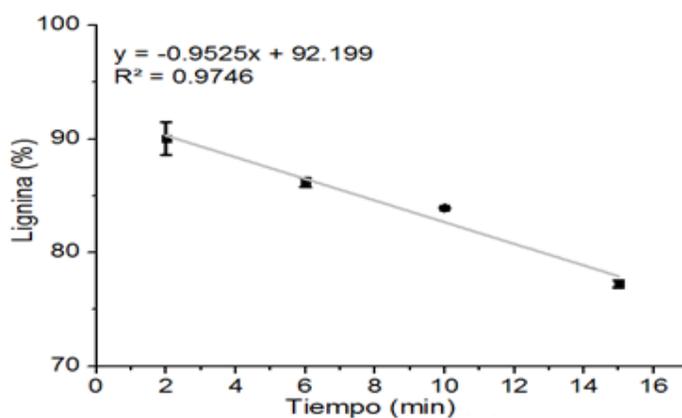


Figura 3.8 Degradación de la lignina en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 3% H_3PO_4

Finalmente, la holocelulosa presentó una disminución con respecto a una base porcentual 100 de 87.7% a 77.7% de los 2 a los 10 minutos (Figura 3.9), en cambio a los 15 minutos su contenido se estabilizó.

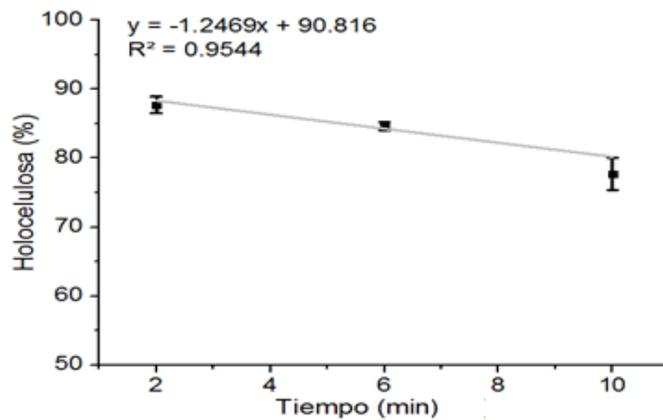


Figura 3.9 Degradación de la holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 3% H₃PO₄

Un segundo experimento de hidrólisis de tallo de haba se realizó a 100 °C y 7% (v/v) de H₃PO₄, utilizando los mismos tiempos de reacción. La Figura 3.10 muestra la dinámica de descomposición de SVT's en función del tiempo de contacto.

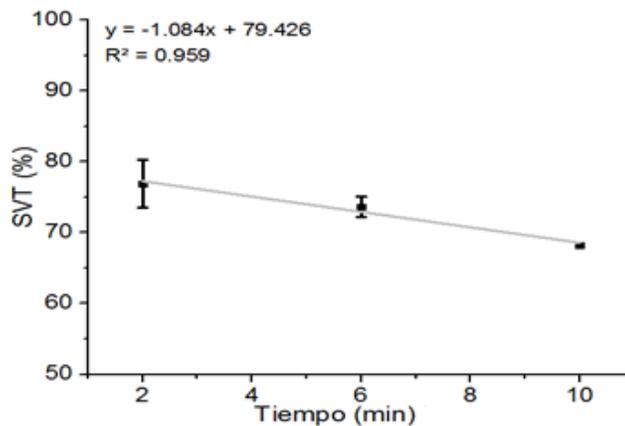


Figura 3.10 Degradación de los SVT's en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 7% H₃PO₄

La disminución de los SVT's y de la lignina en función del tiempo de contacto, mostró dos fases de degradación, la primera de ellas entre los 0 y los 2 minutos de reacción alcanzando una disminución del 24.1%, por otro lado, la fase lenta comenzó a partir de los 2 minutos terminando a los 10 minutos de reacción, el porcentaje de SVT's en

la fase lenta disminuyó de 76.9% a 68.2%. La lignina mostró una disminución en su porcentaje masa de 9.97% en la fase rápida de degradación, en cambio, en la fase lenta se observó una disminución del 90.03% al 78.18% de los 2 a los 10 minutos de reacción. La dinámica de degradación de lignina se observa en la Figura 3.11. Finalmente, la depolimerización de holocelulosa mostrada en la Figura 3.12, presentó una fase de degradación desde el principio del experimento hasta los 10 minutos de tiempo de reacción, disminuyendo su composición de 100% a 88.53%.

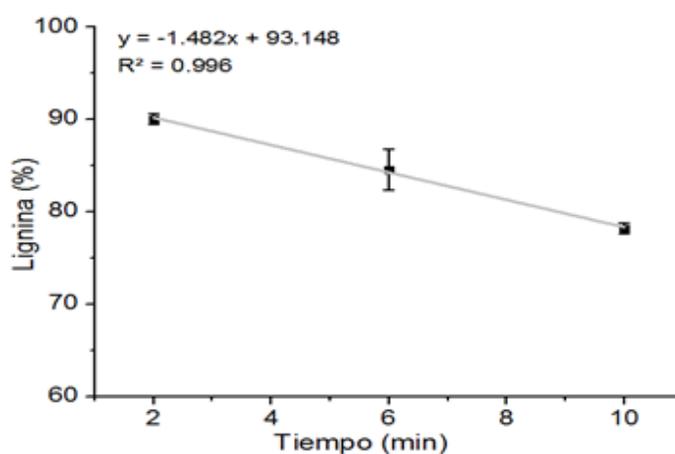


Figura 3.11 Degradación de lignina en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 7% H_3PO_4

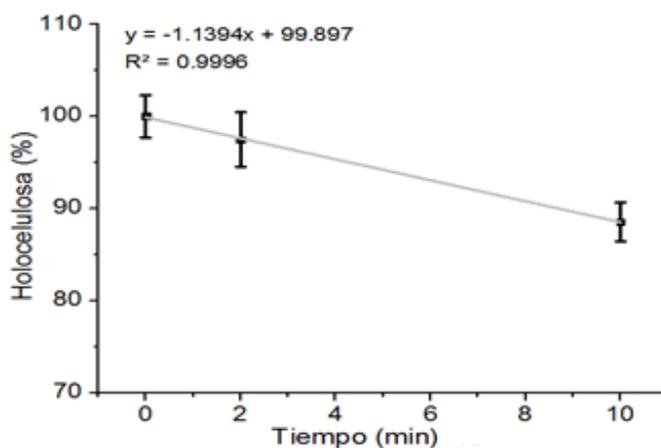


Figura 3.12 Degradación de holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado a 100°C y 7% H_3PO_4

3.2.2 Determinación de azúcares reductores y factor de severidad

La cuantificación de azúcares reductores se llevó a cabo utilizando la metodología descrita en el apartado 2.3.2, los valores determinados con ayuda de la curva de calibración estaban dados en g de azúcar por litro de solución. Con la finalidad de determinar los rendimientos de conversión holocelulosa-sacárido y ajustar la producción al modelo cinético de Saeman, la cantidad de azúcares recuperados se reporta en términos de g de azúcar por cada 5 g de rastrojo. La Figura 3.13 muestra la producción de azúcares a partir de tallo de haba en cada uno de los experimentos realizados.

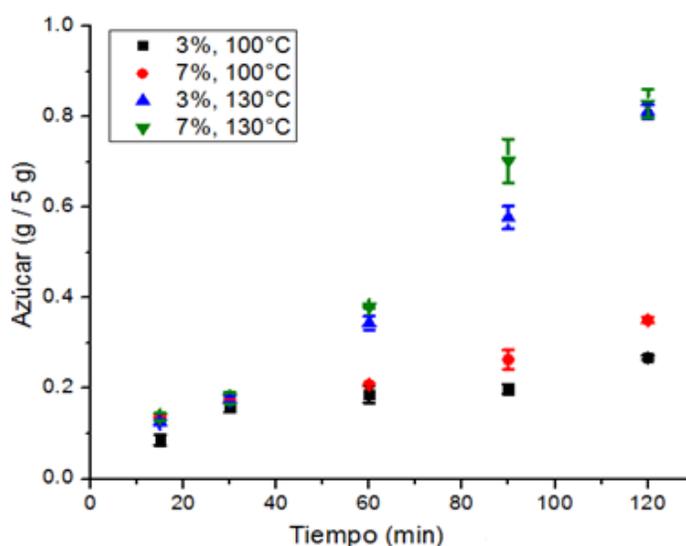


Figura 3.13 Recuperación de azúcares reductores a partir de tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Los porcentajes mostrados en la etiqueta de la Figura 3.13 hacen referencia a la concentración del H_3PO_4 en volumen. La mayor producción de azúcares se observó en el experimento realizado con 7% H_3PO_4 y 130°C, alcanzando después de 120 minutos una recuperación de 0.83 g / 5 g, valor que corresponde a un rendimiento de conversión de 27.08% con respecto al contenido inicial de holocelulosa y de 16.6% en función a la biomasa. El experimento efectuado con 3% H_3PO_4 y 130°C, mostró una producción de 0.81 g / 5 g, mientras que los experimentos realizados a 100°C

con 3 y 7% H_3PO_4 alcanzaron respectivamente una recuperación de azúcares de 0.26 y 0.35 g / 5 g. De acuerdo con la Figura 3.13, tanto en el experimento con 3% como con 7% H_3PO_4 , el aumento de la temperatura de proceso incrementó significativamente la producción de azúcares, mientras que la concentración del ácido tuvo un efecto mínimo sobre el rendimiento ya que la diferencia observada entre los experimentos con 3% y 7% H_3PO_4 a 130°C fue de 0.018 g / 5 g y de 0.083 g / 5g para los experimentos realizados a 100°C.

La producción de azúcares de cada uno de los experimentos se ajustó al modelo cinético de Saeman, para ello se utilizó la ecuación 1.4 y se determinó la masa inicial de holocelulosa. Tal y como se observa en la Figura 3.14, los ajustes realizados en los experimentos a 100°C mostraron después de 90 minutos una menor recuperación de azúcares, la cual se atribuye a la deshidratación térmica de los mismos. Por otra parte, los experimentos efectuados a 130°C mostraron un incremento proporcional al tiempo de reacción. El modelo de Saeman involucra dos constantes cinéticas, la primera referida a la conversión de holocelulosa a azúcares y la segunda a la degradación térmica de los azúcares recuperados en la primera etapa, ambas constantes de velocidad resultaron positivas para el experimento a 100°C, mientras que a 130°C la constante de descomposición térmica fue negativa. La Tabla 3.4 resume los datos cinéticos y estadísticos del modelo de Saeman.

Tabla 3.4 Datos cinéticos y estadísticos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de tallo de haba

Experimento	K_1 (min^{-1})	K_2 (min^{-1})	R^2
3% y 100°C	2.19×10^{-3}	2.262×10^{-2}	0.981
7% y 100°C	3.09×10^{-3}	3.296×10^{-2}	0.949
3% y 130°C	1.93×10^{-3}	-3.49×10^{-3}	0.992
7% y 130°C	2.19×10^{-3}	-2.93×10^{-3}	0.987

Al igual que lo reportado anteriormente por Guerra-Rodríguez *et al.* en 2012 y por Gámez *et al.* en 2006, se observó en los experimentos realizados a 100°C y a 130°C,

que ante un incremento en la concentración del ácido las constante de velocidad aumentaron.

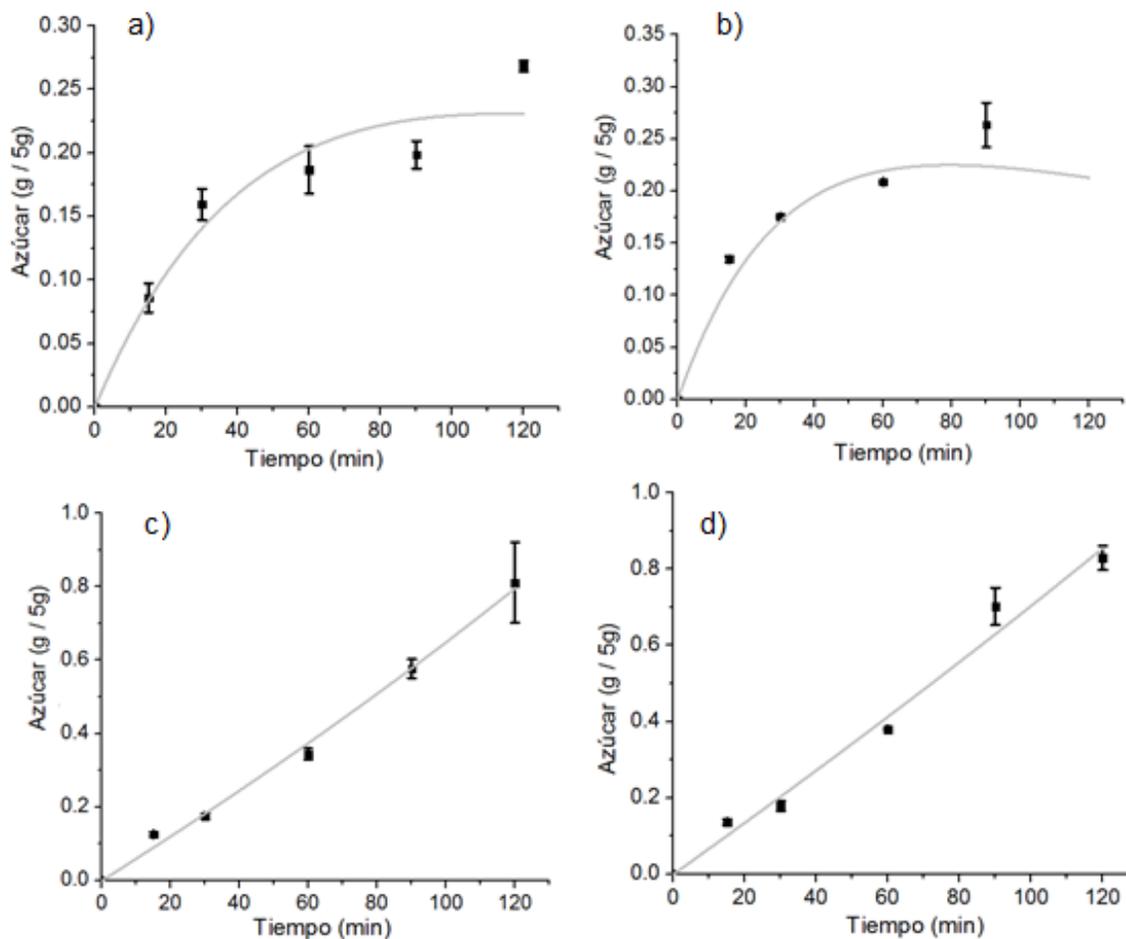


Figura 3.14 Modelo cinético de Saeman para la producción de azúcares a partir de tallo de haba en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

Los datos experimentales obtenidos en cada una de las hidrólisis no mostraron una fase de estabilización para los tiempos de operación utilizados, el modelo cinético de Saeman puede simplificarse considerando únicamente la constante de velocidad propia de la producción de azúcares, igualando a 0 la constante cinética k_2 y aplicando álgebra la expresión puede presentarse de acuerdo a la Ecuación 3.1.

$$M = P_o(1 - e^{-k_1t})$$

Ec. 3.1

En donde P_o equivale a la concentración inicial de holocelulosa, la cual de acuerdo con su fracción másica corresponde a 3.065 g de holocelulosa por cada 5 g de tallo de haba. La Figura 3.15 muestra los ajustes hechos con el modelo cinético de primer orden.

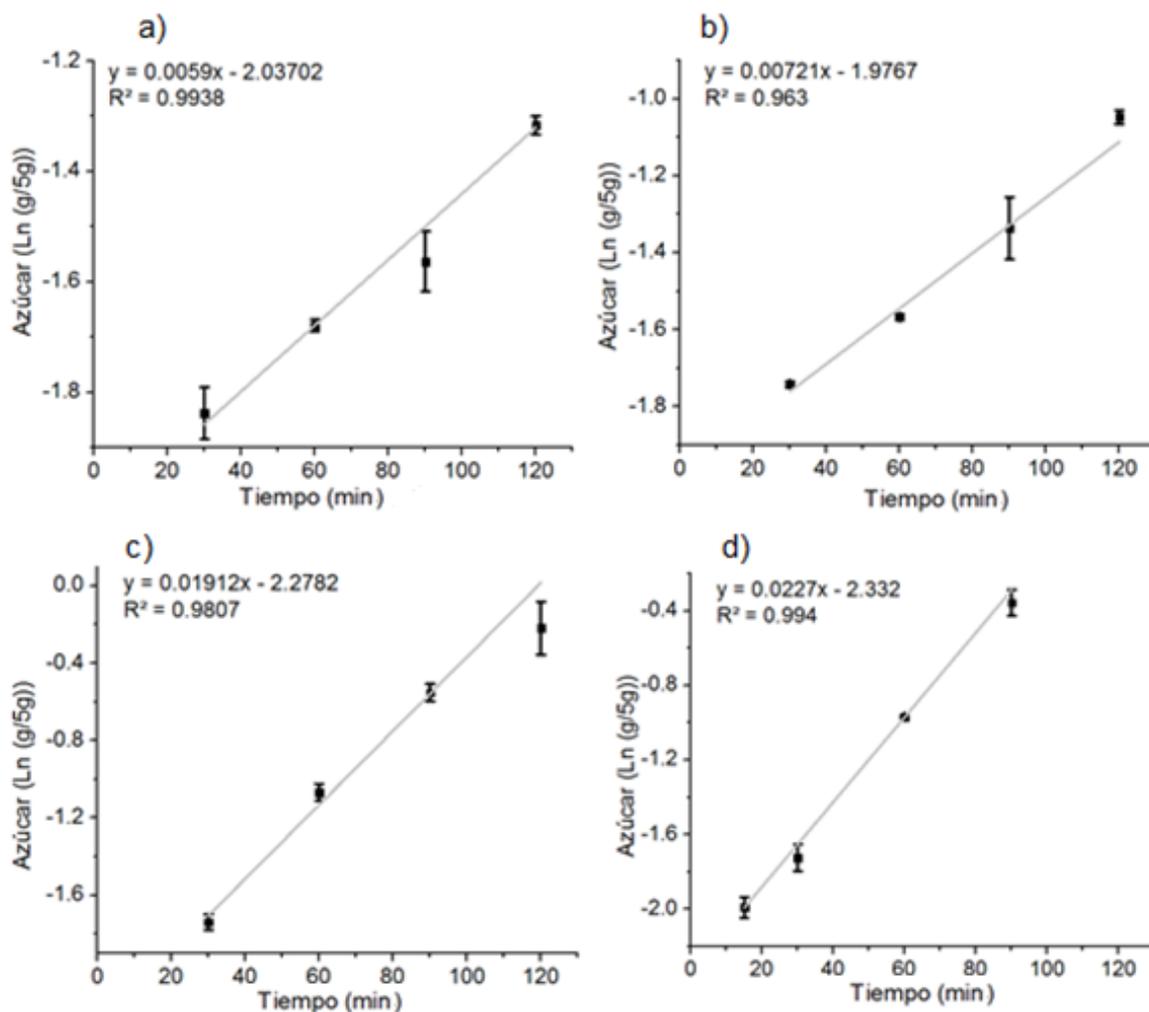


Figura 3.15 Modelo cinético de primer orden para la producción de azúcares a partir de tallo de haba en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

Las pendientes de cada una de las rectas corresponden a las constantes de velocidad obtenidas mediante el uso de la ecuación de primer orden, las cuales verifican la tasa de producción de azúcares en función del tiempo, ya que el experimento con menor rendimiento arrojó la constante cinética más baja (Figura 3.15 a), mientras que la mayor producción observada en el experimento con 7%v H_3PO_4 y 130°C mostró la constante cinética mayor (0.0227 min^{-1}). De acuerdo con la ecuación de Arrhenius, el incremento en la temperatura favoreció a la constante cinética, sin embargo, a fin de determinar los parámetros termodinámicos es necesario el estudio de una temperatura más para cada una de las concentraciones.

El porcentaje de conversión holocelulosa-sacárido se calculó tomando como base el contenido de holocelulosa en el tallo de haba antes de la hidrólisis, dicho porcentaje mostró para cada uno de los experimentos el mismo comportamiento que la producción de azúcares. El rendimiento mayor de conversión en el tallo de haba fue de 27.03% calculado en la hidrólisis con 7%v H_3PO_4 , 130°C y 120 minutos, valor similar al determinado a 130°C y 3%v H_3PO_4 (26.45%). Tal y como se observa en la Figura 3.16 el rendimiento de conversión holocelulosa-sacárido más bajo fue 8.75% calculado en el experimento a 100°C con 3% H_3PO_4 .

Finalmente, el factor CSF se determinó para todos los tiempos de cada uno de los experimentos utilizando la ecuación 1.2. La variable que afecta más a dicho factor es el tiempo, ya que el comportamiento del CSF se ajusta adecuadamente a un modelo logaritmo utilizando solamente al tiempo como variable de estudio. Los valores menores del CSF se calcularon en el experimento con 3%v H_3PO_4 y 100°C, por otra parte, los mayores coeficientes CSF se observaron en la hidrólisis a 130°C con 7%v H_3PO_4 . Los valores del CSF se correlacionan con los azúcares recuperados, ya que las mayores cantidades de azúcares reductores corresponden a los coeficientes CSF más altos. La Figura 3.17 muestra el comportamiento de los CSF para cada uno de los experimentos.

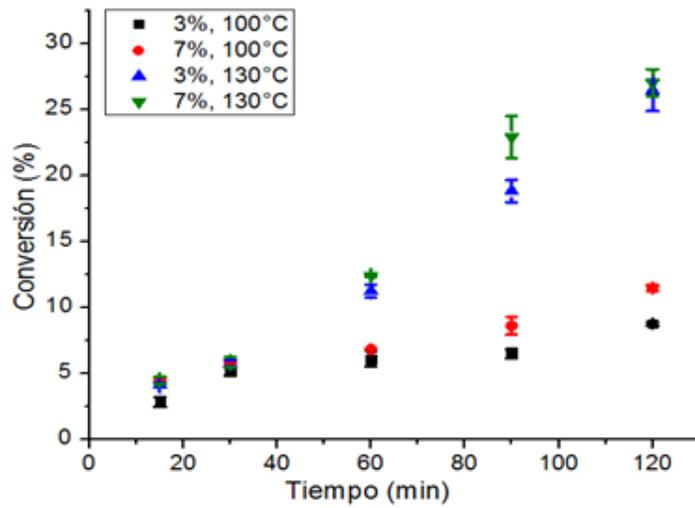


Figura 3.16 Porcentaje de conversión holocelulosa-azúcar en el tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

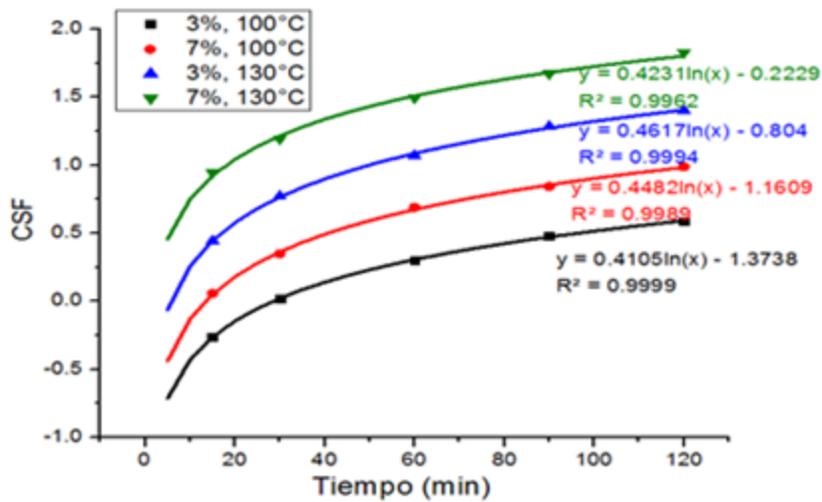


Figura 3.17 Factores CSF determinados en la hidrólisis de tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

La Figura 3.18 muestra la correlación entre los coeficientes CSF y el azúcar recuperado después de la hidrólisis ácida, en donde se observa en cada uno de los experimentos que la producción de azúcares se incrementa exponencialmente a medida que el valor CSF aumenta. Este comportamiento puede atribuirse a la

naturaleza del rastrojo, ya que se ha reportado que en materiales lignocelulósicos la recuperación de azúcares se incrementa con un aumento en el tiempo de contacto, lo cual repercute en valores mayores del coeficiente CSF (Yoon *et al.*, 2014).

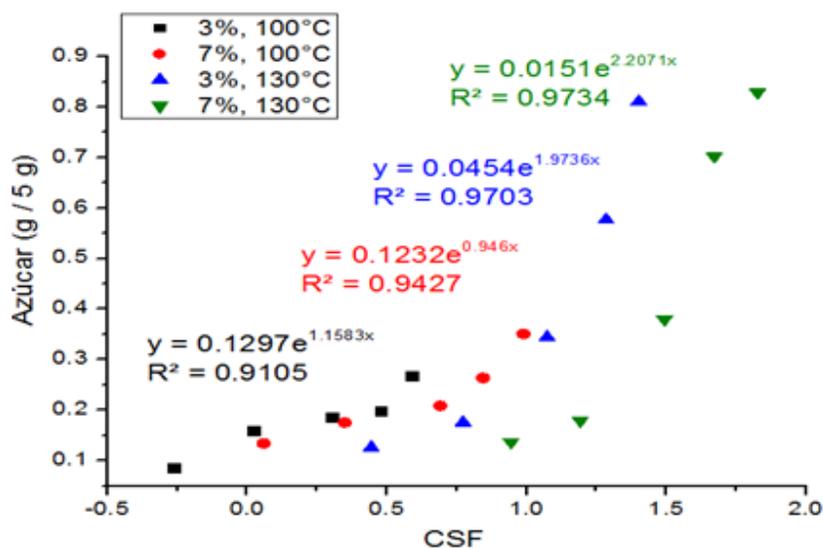


Figura 3.18 Relación entre los CSF y el azúcar recuperado a partir de tallo de haba a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

3.2.3 Degradación de holocelulosa

Tomando como base el peso seco de los sólidos remanentes de la hidrólisis, se determinó el porcentaje de biomasa degradada y posteriormente la descomposición de la holocelulosa en función de las condiciones de operación. Tal y como se observa en la Figura 3.19, el mayor porcentaje de biomasa hidrolizada correspondió a los experimentos realizados a 130°C alcanzando un porcentaje respectivo de 48% y 46% para las concentraciones de 3%v y 7%v H₃PO₄, mientras que las hidrólisis efectuadas a 100°C tan solo hidrolizaron el 24% y 25% con 3%v y 7%v H₃PO₄ respectivamente.

Al igual que en la recuperación de sacáridos, la biomasa hidrolizada tuvo un incremento al aumentar la temperatura de 100°C a 130°C favoreciendo en un 20%

aproximadamente la hidrólisis del rastrojo, sin embargo, un aumento en la concentración del ácido no favoreció la hidrólisis, sugiriendo así que la temperatura y el tiempo de reacción son los factores más importantes para la hidrólisis y recuperación de azúcares a partir de tallo de haba.

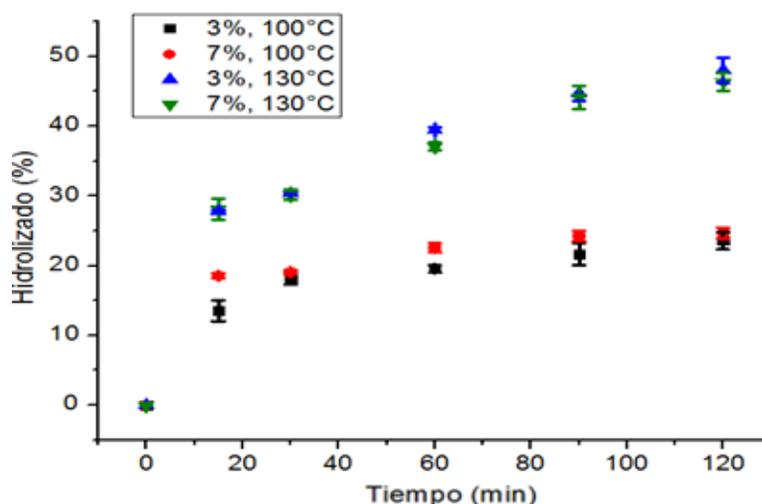


Figura 3.19 Porcentaje de tallo de haba hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

La degradación de holocelulosa en función del tiempo de contacto con el ácido se determinó en cada uno de los experimentos, para ello se calculó su respectivo porcentaje en base seca y se multiplicó por la masa residual de la hidrólisis. La Figura 3.20 muestra la degradación de holocelulosa en cada uno de los experimentos.

La menor cantidad de holocelulosa hidrolizada fue de 0.995 g, la cual se observó en el experimento realizado con 3%v H_3PO_4 y 100°C, valor que corresponde a un porcentaje de holocelulosa hidrolizada de 32.47%. Con 7%v H_3PO_4 dicho porcentaje se incrementó hasta 35.81% después de 120 minutos, sin embargo, los mayores índices de hidrólisis de holocelulosa se observaron a 130°C alcanzando porcentajes de 49.05% y de 44.42% para las concentraciones de ácido de 3%v y 7%v

respectivamente. Pese a que estos dos últimos experimentos tuvieron porcentajes similares de biomasa hidrolizada, la cantidad de holocelulosa al final del proceso resultó diferente, esto puede atribuirse tanto a la falta de homogeneidad del tallo de haba como a la mayor concentración del ácido que puede favorecer la depolimerización de la lignina y el incremento en la solubilidad de compuestos secundarios. El experimento llevado a cabo con 7%v H_3PO_4 y $130^\circ C$ resultó el más eficiente para la transformación de la holocelulosa presente en el tallo de haba a azúcares reductores, ya que en comparación con el experimento realizado a 3%v H_3PO_4 y $100^\circ C$ degradó una menor cantidad de dicho carbohidrato y su producción de azúcares resultó la más alta (0.83 g / g olote).

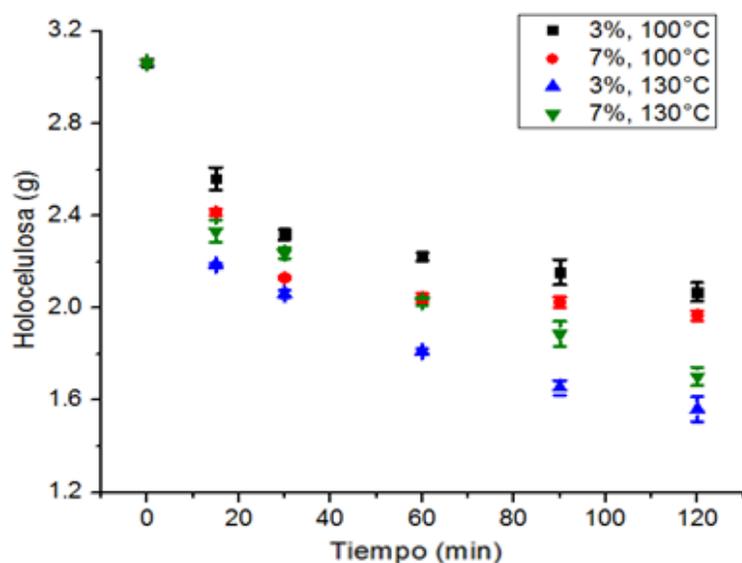


Figura 3.20 Degradación de holocelulosa en el tallo de haba hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Los ajustes cinéticos de la degradación de holocelulosa en función de las condiciones de hidrólisis se muestran en la Figura 3.21. La pendiente de cada una de las rectas corresponde a la constante de velocidad dada por el modelo cinético de primer orden.

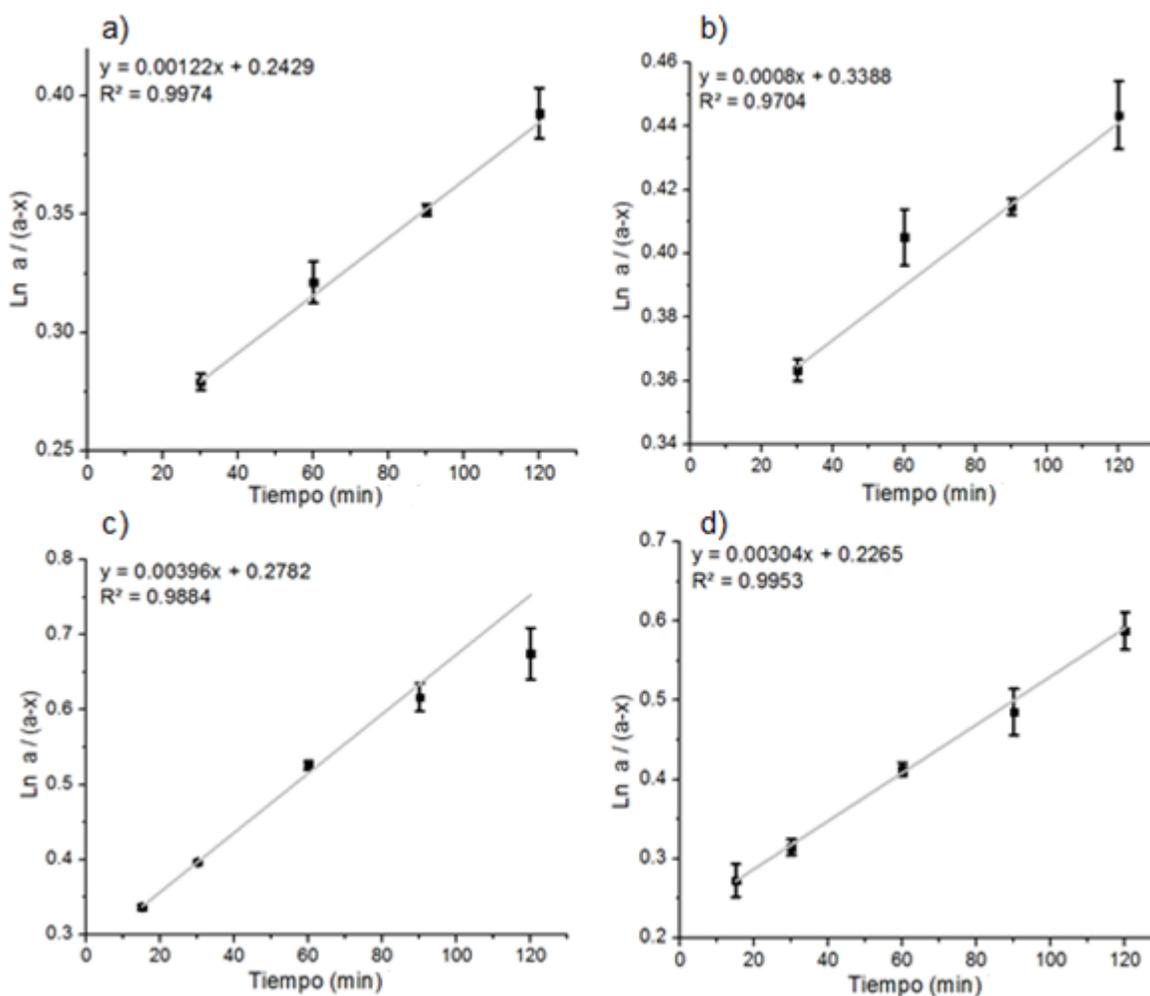


Figura 3.21 Modelo cinético de primer orden para la degradación de holocelulosa a partir de tallo de haba en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

El experimento con 3%v H_3PO_4 y 130°C tuvo la constante cinética mayor ($3.96 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), valor que va de la mano con la máxima degradación de holocelulosa mostrada en función del tiempo. Por otra parte, el experimento realizado a 100°C y 7%v H_3PO_4 mostró la constante de velocidad más baja ($8.51 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$). Sin embargo, en los experimentos efectuados a 130°C se observó una degradación rápida desde el inicio del proceso hasta los 15 minutos de tiempo de contacto, en contraste, los experimentos llevados a 100°C mostraron la fase de degradación rápida entre los 15

y los 30 minutos, esto puede deberse a que el incremento en la temperatura favorece la ruptura de los enlaces β 1-4 glucosídicos lo cual permite estabilizar la degradación de la fase rápida después de 15 minutos en los experimentos a 130°C, este supuesto se verifica con las constantes de velocidad, las cuales resultaron mayores en los procesos realizados a dicha temperatura. La presencia de una fase de degradación rápida de celulosa y hemicelulosa mediante hidrólisis ácida había sido reportada anteriormente y adecuada dentro del modelo cinético de Saeman, de acuerdo con Guerra-Rodríguez *et al.* (2012), Gámez *et al.* (2006) y Sarkar *et al.* (2013), la fracción fácilmente degradable se observó en los primeros minutos.

3.2.4 Análisis IR del tallo de haba hidrolizado

Para visualizar el efecto del H_3PO_4 sobre el tallo de haba en función del tiempo de contacto, las muestras sobrantes de la hidrólisis se analizaron mediante espectroscopia de IR.

a) Experimentos preliminares. La Figura 3.22 muestra los espectros de IR de las muestras tomadas a los 2 y 10 minutos de la hidrólisis a 100°C con 3%v H_3PO_4 .

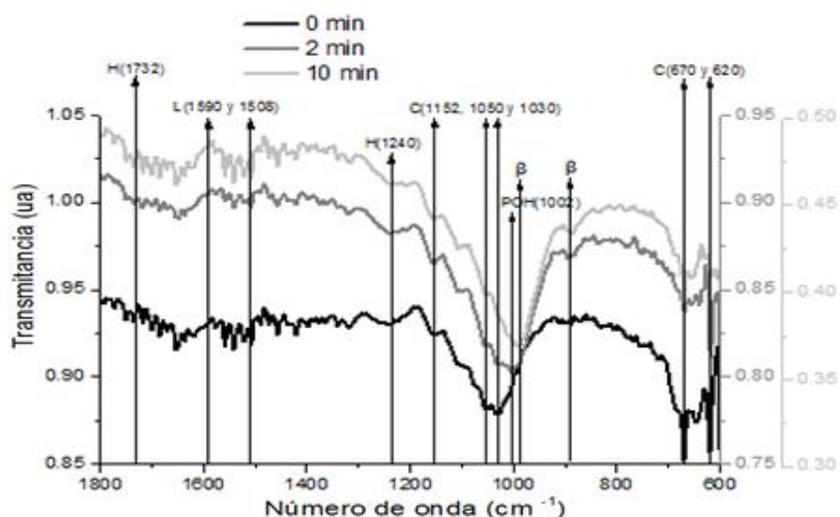


Figura 3.22 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 2 y a los 10 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 3%v H_3PO_4 y 100°C

Las frecuencias de absorción propias del enlace β -glucosídico (898 y 986 cm^{-1}) aparecen a partir de los 2 minutos de reacción, es decir, el tallo de haba comienza a hidrolizarse de inmediato dando origen a oligosacáridos con enlaces $\beta 1-4$ o $\beta 1-3$ en el caso de la hidrólisis de hemicelulosa, en el mismo tiempo de reacción el enlace P-O-H ubicado a una frecuencia de 1002 cm^{-1} apareció debido a la interacción entre el ácido fosfórico y el tallo de haba, dicha banda de absorción tiene una intensidad baja que puede ser atribuida al lavado de la muestra orgánica una vez terminada la reacción de hidrólisis. De acuerdo a lo descrito por Stuart (2004), las frecuencias de vibración principales de la lignina se encuentran en 1590 y 1510 cm^{-1} . En el caso de la celulosa la frecuencia correspondiente a 620 cm^{-1} disminuye al incrementar el tiempo de reacción, no así la banda de 670 cm^{-1} , la cual disminuye drásticamente a los 2 minutos de reacción pero incrementa a los 10 minutos, este comportamiento puede atribuirse a la generación de enlaces de fosfato de celulosa (P-O-C), los cuales se forman al poner en contacto celulosa cristalina o amorfa con ácido fosfórico, reacción que es reversible en presencia de agua. La frecuencia de absorción de 898 cm^{-1} puede deberse también a la presencia de enlaces P-O-C. La banda de absorción de 1030 cm^{-1} correspondiente a celulosa se hace menos intensa después de 10 minutos de reacción. Finalmente las bandas características de hemicelulosa (1732 y 1240 cm^{-1}) presentaron baja intensidad en los tres espectros, lo cual permite inferir que la fracción másica de hemicelulosa es más pequeña que la de la celulosa antes y después de la hidrólisis.

La Figura 3.23 muestra los espectros de IR de las muestras tomadas antes y después de 2 y 10 minutos de hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 100°C . Las vibraciones características de hemicelulosa (1732 y 1242 cm^{-1}) disminuyeron su intensidad a medida que la reacción avanzó, la banda de 1242 cm^{-1} desaparece casi en su totalidad después de 10 minutos de tiempo de contacto. Al igual que la hemicelulosa, el enlace C-C-H presentó una disminución a medida que el tiempo de contacto aumentó, mismo comportamiento logró detectarse a 1460 y 1370 cm^{-1} .

¹, vibraciones que de acuerdo con Xu *et al.* (2012) corresponden al enlace C-H de la lignina. Por otra parte el enlace β glucosídico se observó en cada uno de los espectros, manteniendo una intensidad similar en cada uno de ellos. Los enlaces propios de la celulosa se detectaron a 1030, 1050, 1106 y 1155 cm^{-1} , sin embargo, tanto la intensidad como la amplitud de las bandas de vibración no mostraron cambios significativos.

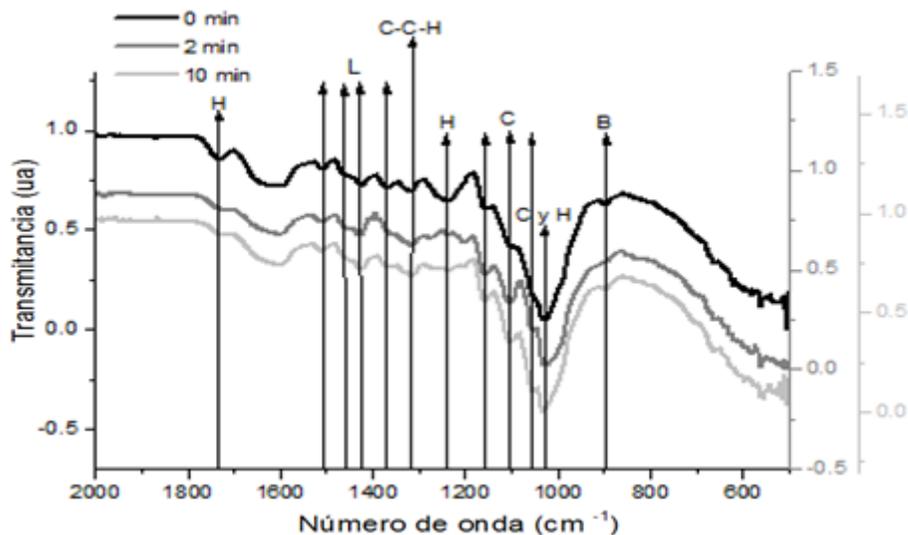


Figura 3.23 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 2 y a los 10 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 7%v H_3PO_4 y 100°C

b) Hidrólisis con 3%v H_3PO_4 y 100°C . Los espectros de IR de las muestras tomadas antes y después de 60 y 120 minutos de hidrólisis con 3%v H_3PO_4 a 100°C se muestran en la Figura 3.24. Tanto las vibraciones características de hemicelulosa como de celulosa no presentaron cambios en cuanto a la intensidad y amplitud de sus bandas, sin embargo, en la vibración ubicada a 1590 cm^{-1} correspondiente al anillo aromático de la lignina se observó una ligera disminución de su intensidad a medida que la reacción avanzó, comportamiento contrario presentó la banda de vibración perteneciente a celulosa situada a 670 cm^{-1} , la cual se hizo más definida después de 60 minutos de contacto, al mismo tiempo la vibración de 832 cm^{-1} aumentó su intensidad. Los enlaces O-H observados a 1640 cm^{-1} corresponden a

humedad residual y el enlace β 1-4 glucosídico se observó en cada uno de los espectros a 898 cm^{-1} . Las vibraciones propias de celulosa y hemicelulosa en este experimento no mostraron cambios importantes, esto puede asociarse a la baja producción de azúcares reductores determinados en los licores hidrolizados.

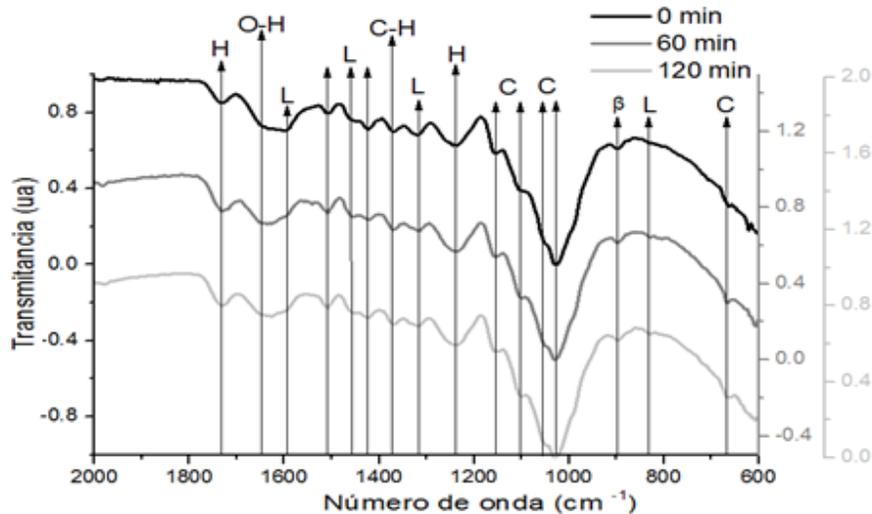


Figura 3.24 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 3%v H_3PO_4 y 100°C

Hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 100°C . La Figura 3.25 muestra los espectros de IR de los sólidos remanentes de la hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 100°C después de 60 y 120 minutos de contacto. La banda de vibración situada a 1008 cm^{-1} correspondiente al enlace P-O-H se observó en las muestras hidrolizadas, esto puede atribuirse al contacto entre el tallo de haba y el H_3PO_4 , el cual quedó en el sólido aún después del lavado con agua destilada caliente. Las bandas características de celulosa no mostraron cambios importantes en su intensidad, sin embargo, se observó un desplazamiento de la vibración propia de hemicelulosa de 1732 a 1750 cm^{-1} después de la hidrólisis ácida, las cuales han sido identificadas por Xu *et al.* (2013) y por Schulz *et al.* (2007) como los enlaces C=O y éster de la hemicelulosa respectivamente. El enlace C-H característico de la lignina, celulosa y hemicelulosa encontrado a 1340 cm^{-1} , se detectó después de

la hidrólisis ácida, mientras que el enlace β 1-4 glucosídico se observó en cada una de las muestras a un valor de 898 cm^{-1} .

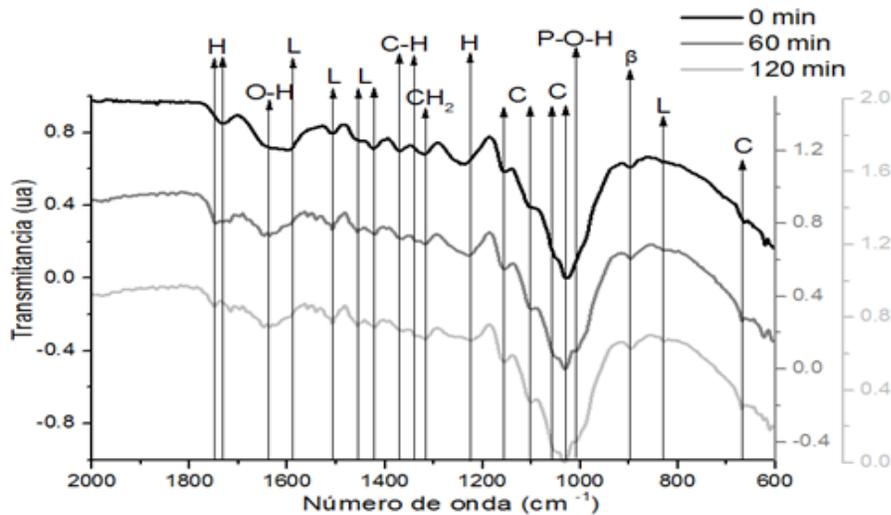


Figura 3.25 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 7%v H_3PO_4 y 100°C

- c) Hidrólisis con 3%v H_3PO_4 y 130°C . Tal y como se observa en la Figura 3.26, tanto las bandas características de hemicelulosa como de celulosa no mostraron cambios después de la hidrólisis, sin embargo, las vibraciones propias de la lignina situadas en 1590 y en 1422 cm^{-1} , así como el enlace C-H observado a 1370 cm^{-1} , mostraron un decremento en la intensidad del pico a medida que el tiempo avanzó.
- d) Hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 130°C . El enlace CH_2 perteneciente a la celulosa y hemicelulosa fue detectado en cada uno de los espectros de IR a un número de onda de 1320 cm^{-1} , el cual al igual que las banda características de celulosa ubicadas en la región de 1000 a 1200 cm^{-1} , disminuyó su intensidad después de 60 minutos de hidrólisis, por otra parte, comportamiento similar al observado en la banda de hemicelulosa situada en 1240 cm^{-1} , la cual disminuyó su intensidad después de 120 minutos. Al igual que en los experimentos anteriormente

descritos, las bandas características de la lignina observadas a 1590 y 1422 cm^{-1} bajaron de intensidad a medida que el tiempo de contacto aumento. La Figura 3.27 muestra los espectros de IR de los sólidos hidrolizados con 7%v H_3PO_4 y 130°C.

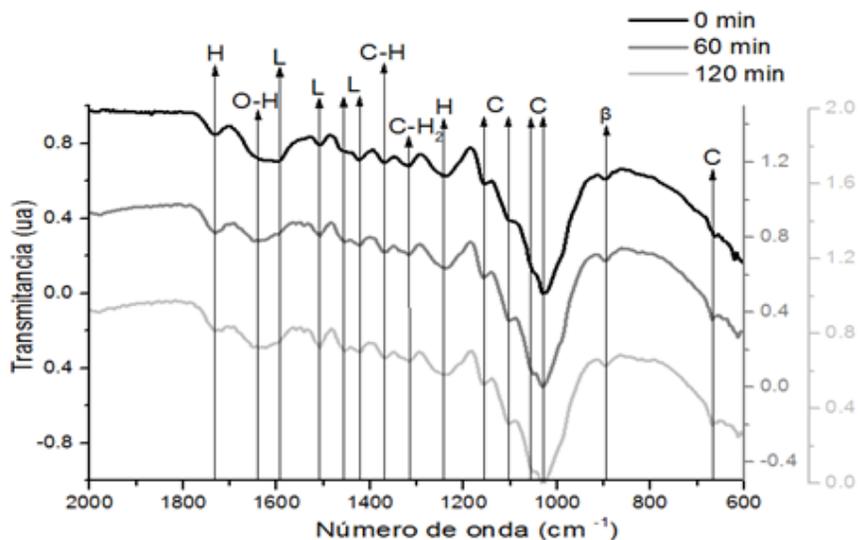


Figura 3.26 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 3%v H_3PO_4 y 130°C

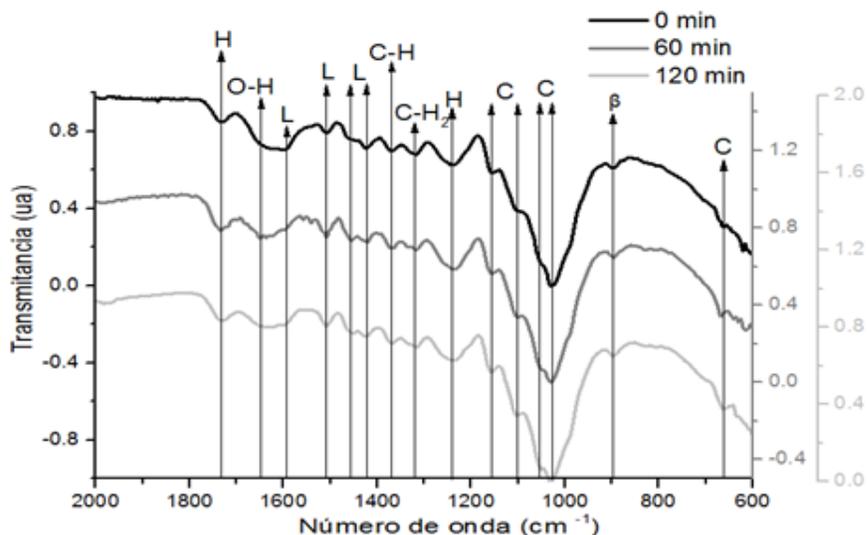


Figura 3.27 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de tallo de haba con 7%v H_3PO_4 y 130°C

El análisis IR del tallo de haba hidrolizado sugiere una degradación de los carbohidratos a medida que el tiempo de contacto con el ácido aumentó. En cada uno de los experimentos realizados se observó una disminución de las bandas características de lignina, lo cual se asocia a una pérdida másica de dicho carbohidrato. Este comportamiento había sido reportado anteriormente por Hsu *et al.* (2010), quienes trabajando con bagazo de arroz en presencia de ácido sulfúrico a una temperatura de 160°C observaron una disminución másica de la lignina a partir de la desaparición de sus bandas de IR más importantes (1590, 1510 y 1420 cm^{-1}). Por otro lado, Li *et al.* (2016) y Gaur *et al.* (2016) estudiando respectivamente el rastrojo de maíz y el tallo de algodón en presencia de ácido sulfúrico, observaron que después de la hidrólisis ácida los materiales analizados mediante IR no mostraban las bandas propias de hemicelulosa (1735 y 1240 cm^{-1}) y las vibraciones características de celulosa situadas en la región de 1000 a 1200 cm^{-1} presentaron intensidades menores a las del material no hidrolizado.

La presencia de las bandas características de hemicelulosa en el tallo de haba hidrolizado puede atribuirse a la naturaleza del rastrojo, a la falta de homogeneidad y agitación en el sistema que imposibilitó un mejor contacto entre las fases, así como al ácido empleado, el cual como se ha reportado por Lenihan *et al.* (2010) posee un poder catabólico menor al ácido sulfúrico.

3.3 Hidrólisis ácida del rastrojo de maíz

El presente apartado muestra la producción de azúcares reductores, la degradación de holocelulosa, los ajustes cinéticos y el análisis por IR del rastrojo de maíz.

3.3.1 Determinación de azúcares reductores y factor de severidad

Al igual que en la hidrólisis del tallo de haba, el experimento con menor rendimiento en la recuperación de azúcares fue el realizado con 3%v H_3PO_4 y 100°C, mientras que las condiciones de proceso que favorecieron más a la producción de sacáridos fueron la alta concentración de ácido (7%v) y la alta temperatura (130°C). El

experimento llevado a cabo con 3%v H_3PO_4 y 130°C, alcanzó su rendimiento máximo después de 90 minutos de reacción (0.81 g / 5 g rastrojo), a tiempos posteriores se observó una caída en la producción la cual de acuerdo con Fan *et al.* (1987) y Guerra-Rodríguez *et al.* (2012), puede atribuirse a que la velocidad de desintegración térmica de los azúcares previamente recuperados es mayor a la velocidad de producción. El rendimiento mayor fue observado a 7%v H_3PO_4 y 130°C después de 120 minutos de reacción alcanzando un valor de (1.52 g / 5 g rastrojo), el cual resultó cuatro y cinco veces superior al obtenido en los experimentos a 100°C con 7%v y 3%v H_3PO_4 respectivamente, los cuales alcanzaron rendimientos de 0.47 y 0.33 g de azúcar por cada 5 g de olote. Tal y como se observa en la Figura 3.28, el experimento con 3%v y 130°C resultó el más eficiente hasta antes de los 60 minutos, sin embargo, después de 90 minutos pese a incrementar su producción de azúcares el efecto combinado de la temperatura y la alta concentración del ácido catalizó el rendimiento del experimento con 7%v y 130°C haciéndolo el más efectivo. Por otro lado, los experimentos efectuados a 100°C tuvieron el mismo comportamiento entre sí y los rendimientos más bajos, sugiriendo que la temperatura de hidrólisis es un factor importante para la recuperación de azúcares a partir de rastrojo de maíz.

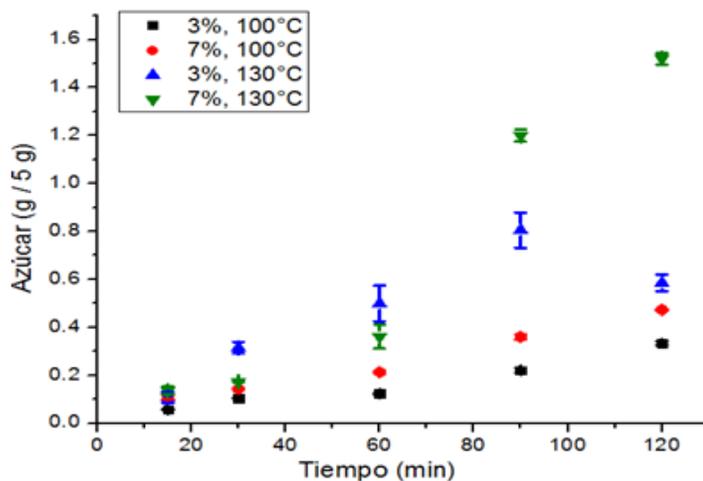


Figura 3.28 Recuperación de azúcares reductores a partir de rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Con base a la fracción másica de holocelulosa, se determinó una masa total inicial de 3.209 g de dicho carbohidrato por cada 5 g de rastrojo de maíz, valor que fue utilizado en el modelo de Saeman para predecir la producción de azúcares en función del tiempo. Los ajustes cinéticos obtenidos se muestran en la Figura 3.29.

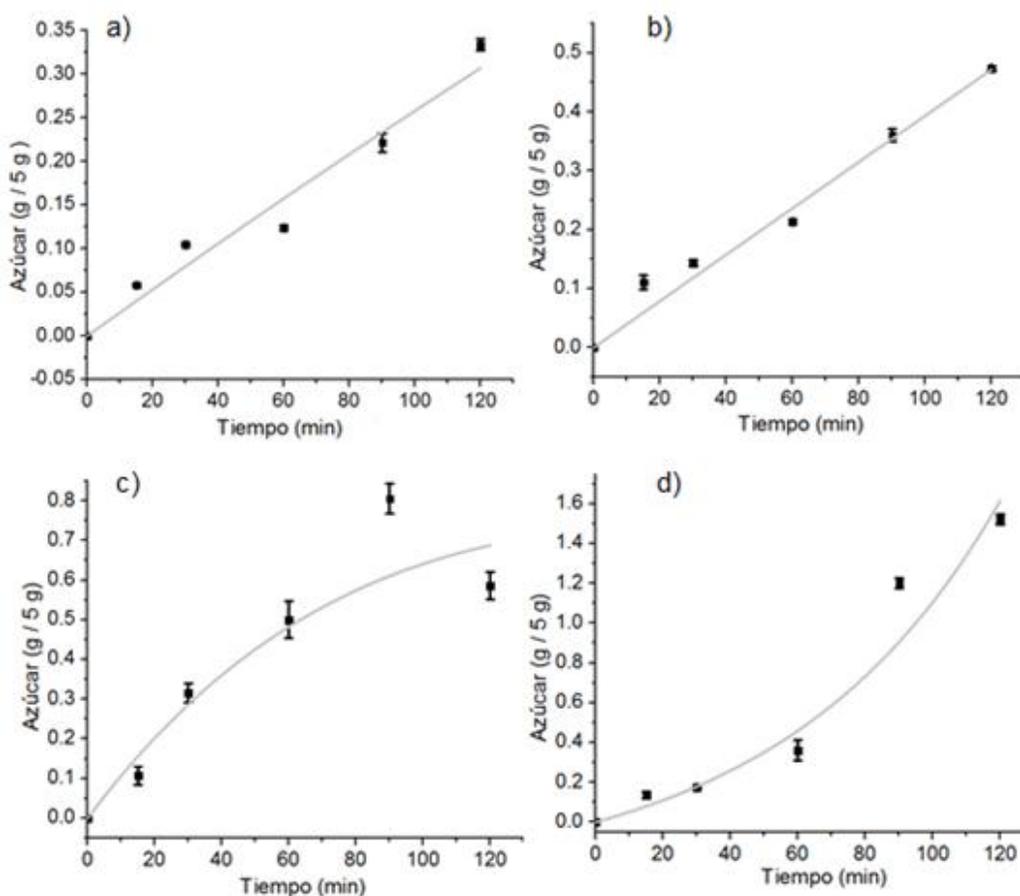


Figura 3.29 Modelo cinético de Saeman para la producción de azúcares a partir de rastrojo de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

Los datos estadísticos y cinéticos obtenidos a partir de los ajustes mostrados en la Figura 3.29 se resumen en la Tabla 3.5. La constante cinética k_1 en los experimentos realizados a 100°C mostró un incremento al aumentar la concentración del ácido de 3%v a 7%v, sin embargo, las constantes de velocidad k_2 resultaron muy diferentes

entre sí, lo cual puede atribuirse a que en ambos experimentos no se observó un decaimiento en la concentración de azúcares. La mayor velocidad de producción se determinó en el experimento con 3%v y 130°C, el cual alcanzó una constante de velocidad k_1 de $3.54 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, en contra parte, el experimento realizado con 3%v y 100°C mostró la constante cinética de producción de azúcares más baja con tan solo un valor de $8.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. En el experimento con 3%v y 130°C se calculó la constante cinética k_2 mayor ($8.08 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), dicho valor va acorde con el comportamiento de la producción de azúcares en función del tiempo de contacto, ya que el máximo rendimiento se alcanzó después de 90 minutos y posteriormente se observó un decaimiento en la concentración de azúcares, es decir, la constante de velocidad k_2 supera a k_1 a partir de los 90 minutos para dicho experimento.

Tabla 3.5 Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de rastrojo de maíz

EXPERIMENTO	K_1 (MIN ⁻¹)	K_2 (MIN ⁻¹)	R ²
3% y 100°C	8.4×10^{-4}	4.7×10^{-5}	0.965
7% y 100°C	1.23×10^{-3}	-1.08×10^{-3}	0.996
3% y 130°C	3.54×10^{-3}	8.08×10^{-3}	0.951
7% y 130°C	1.48×10^{-3}	-1.59×10^{-2}	0.980

La producción de azúcares de cada uno de los experimentos se ajustó también al modelo cinético de primer orden de acuerdo con la ecuación 3.1, dichos ajustes se muestran en la Figura 3.30. La pendiente de cada una de las rectas corresponde a la constante cinética dada en min^{-1} , mientras que la ordenada al origen es una extrapolación del logaritmo de la concentración inicial de azúcares, la cual resultó con un valor cercano a 0.08 g. Las constantes de velocidad más bajas se determinaron en los experimentos realizados a 100°C, obteniendo los valores de 1.25×10^{-2} y $1.1405 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para las concentraciones de 3%v y 7%v respectivamente. La constante cinética mayor fue de $2.502 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, calculada en el experimento con 7%v y 130°C. Los experimentos llevados a cabo con 3%v H_3PO_4 mostraron una fase de producción de azúcares rápida entre el inicio del experimento

y los 15 minutos, posteriormente dicha producción se estabilizó y se ajustó al modelo cinético de primer orden, al mismo tiempo, debido a que el experimento con 3%v y 130°C alcanzó la fase de decaimiento, para el análisis de la producción de azúcares no se consideró la muestra de 120 minutos, la constante de velocidad determinada en este experimento fue de $1.417 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

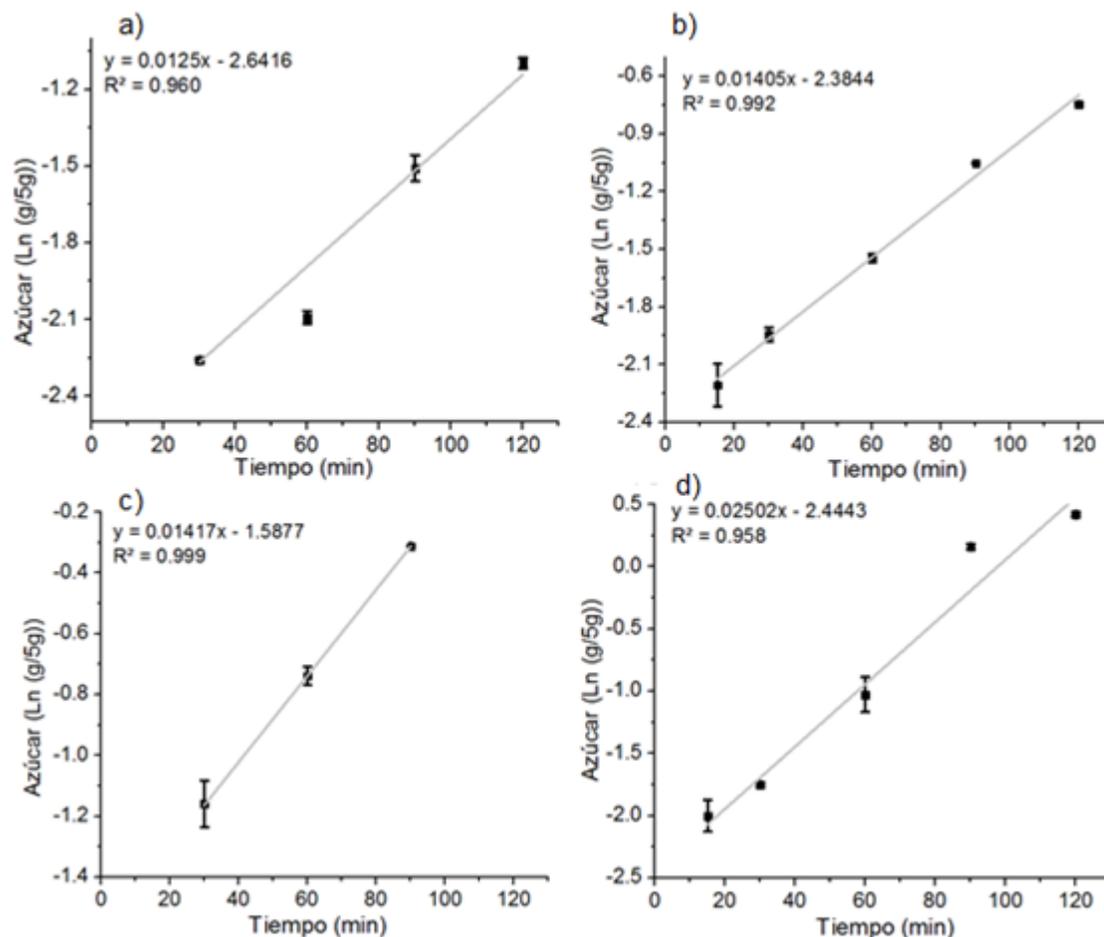


Figura 3.30 Modelo cinético de primer orden para la producción de azúcares a partir de rastrojo de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

La conversión holocelulosa-sacárido más alta fue de 47.40% y se determinó en el experimento con 7%v H_3PO_4 y 130°C, al mismo tiempo este valor corresponde a un

rendimiento de 30.42% con respecto a la biomasa inicial. El experimento con menor conversión fue el llevado a cabo con 3%v y 100°C, alcanzando un rendimiento de 10.40% en función a la holocelulosa y de tan solo 6.67% con respecto a la cantidad total de rastrojo. La Figura 3.31 muestra los porcentajes de conversión holocelulosa-azúcar de cada uno de los experimentos efectuados con rastrojo de maíz.

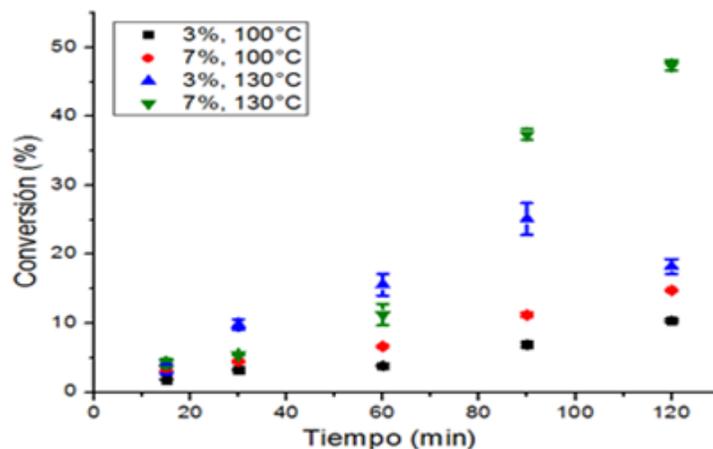


Figura 3.31 Porcentaje de conversión holocelulosa-azúcar en el rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Los factores CSF de cada uno de los experimentos realizados con rastrojo de maíz se incrementaron de manera logarítmica a medida que el tiempo de contacto aumentó. Al igual que en la hidrólisis de tallo de haba los valores mayores del CSF se determinaron en el experimento con 7%v y 130°C, mientras que los coeficientes menores fueron calculados para la hidrólisis con 3%v y 100°C. La Figura 3.32 muestra los CSF determinados después de la hidrólisis con rastrojo de maíz.

Tal y como se observa en la Figura 3.33, la recuperación de azúcares aumentó exponencialmente con un incremento de los coeficientes CSF, sin embargo, el experimento con 3%v y 130°C mostró este comportamiento solo hasta antes de los 90 minutos ya que a tiempos posteriores se observó una caída en la producción de azúcares, el coeficiente CSF que dio el mejor rendimiento (16.11 g / 100 g rastrojo)

para dicho experimento fue de 1.42, valor que resultó cercano a lo reportado por Castro *et al.*, quienes trabajaron un CSF de 1.46 alcanzando una recuperación de azúcares de 14 g por cada 100 g de eucalipto, la diferencia en los rendimientos puede deberse tanto a la naturaleza del rastrojo como a las condiciones de operación.

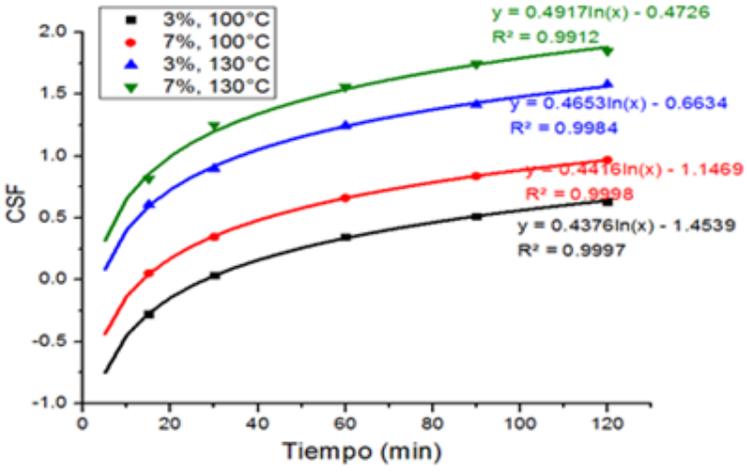


Figura 3.32 Factores CSF determinados en la hidrólisis del rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

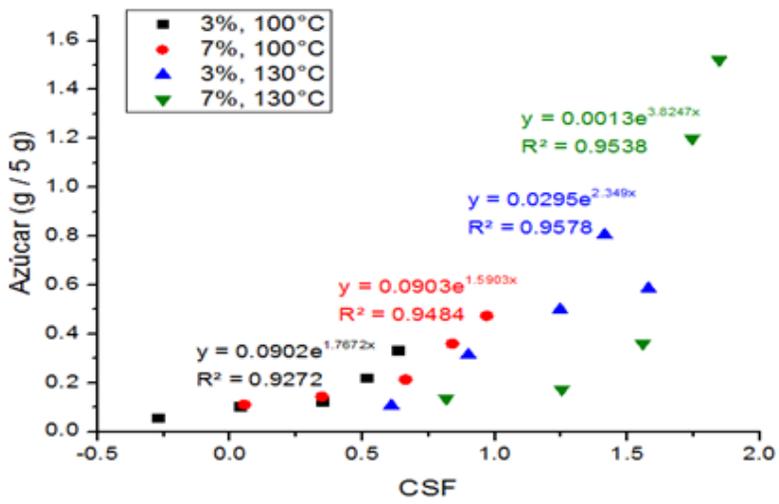


Figura 3.33 Relación entre los CSF y el azúcar recuperado a partir de rastrojo de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Durante la fase de producción de azúcares, los valores del CSF se pueden relacionar con la eficiencia de hidrólisis, ya que un incremento en dicho valor propicia un mayor rendimiento de azúcares, sin embargo, una vez alcanzada la máxima recuperación el incremento de los valores CSF pueden asociarse a un aumento en la producción de inhibidores.

3.3.2 Degradación de holocelulosa

Los porcentajes de rastrojo de maíz hidrolizado dados por las condiciones de hidrólisis se muestran en la Figura 3.34. Todos los experimentos mostraron un comportamiento similar hasta los 30 minutos de reacción, a tiempos posteriores los porcentajes de biomasa hidrolizada se desfasaron mucho entre cada experimento. El experimento con 7%v y 130°C mostró el mayor porcentaje de biomasa hidrolizada después de 120 minutos, alcanzando un valor de 58.51%, el cual resultó similar al calculado después de 90 minutos para el mismo experimento (56.2%). Los menores porcentajes de rastrojo hidrolizado se observaron en el experimento con 3%v y 100°C, lo cual va acorde con su mínima cantidad de azúcares producidos.

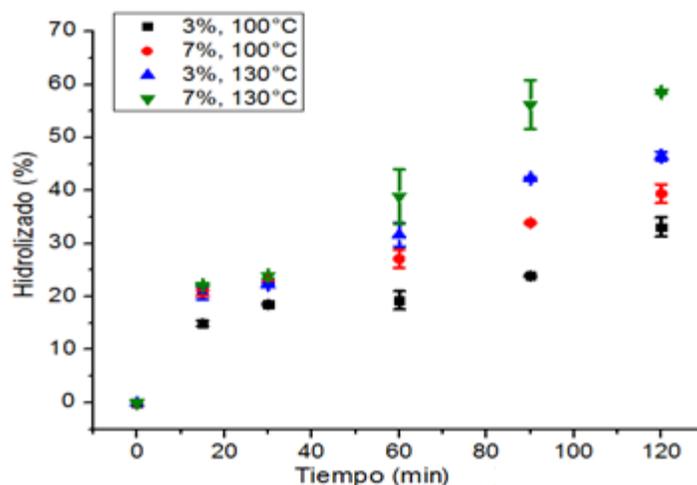


Figura 3.34 Porcentaje de rastrojo de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

La cantidad de holocelulosa hidrolizada en los experimentos realizados a 100°C resultó muy similar entre sí, alcanzado degradaciones de 1.458 y de 1.456 g para las concentraciones de 3% y 7% respectivamente. Pese a degradar la misma cantidad de holocelulosa, el experimento con 7% H₃PO₄ mostró una mayor recuperación de azúcares que el experimento con 3%, lo cual puede atribuirse a que el exceso de iones fosfato favorece la formación del complejo ácido-celulosa incrementando así la monomerización del carbohidrato. Por otra parte, el experimento llevado a cabo con 7% y 130°C redujo la concentración inicial de holocelulosa en un 57.47% dejando al final de la hidrólisis un remanente de 1.365 g de holocelulosa. La masa de este carbohidrato degradada en dicho experimento correspondió a 1.844 g, valor que en comparación con la producción de azúcares (1.5210 g) resultó superior, la diferencia puede deberse a la deshidratación térmica de los azúcares así como a la producción de ácido acético a partir de los grupos acetil de la hemicelulosa (Shuvashish *et al.*, 2014). La Figura 3.35 muestra la masa de holocelulosa en función del tiempo de contacto para cada uno de los experimentos realizados con rastrojo de maíz.

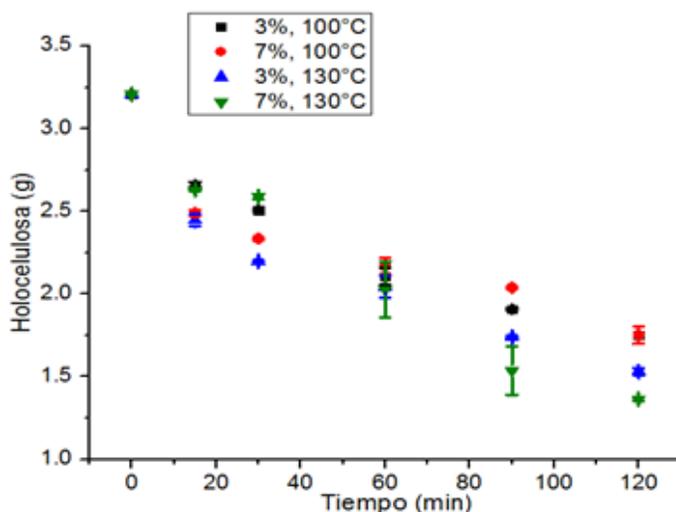


Figura 3.35 Degradación de holocelulosa en el rastrojo de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Los ajustes al modelo cinético de primer orden se presentan en la Figura 3.36. Los valores mayores de las constantes cinéticas se calcularon en los experimentos realizados a 130°C, los cuales alcanzaron velocidades de 4.31×10^{-3} y $6.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para las concentraciones de 3% y 7% respectivamente.

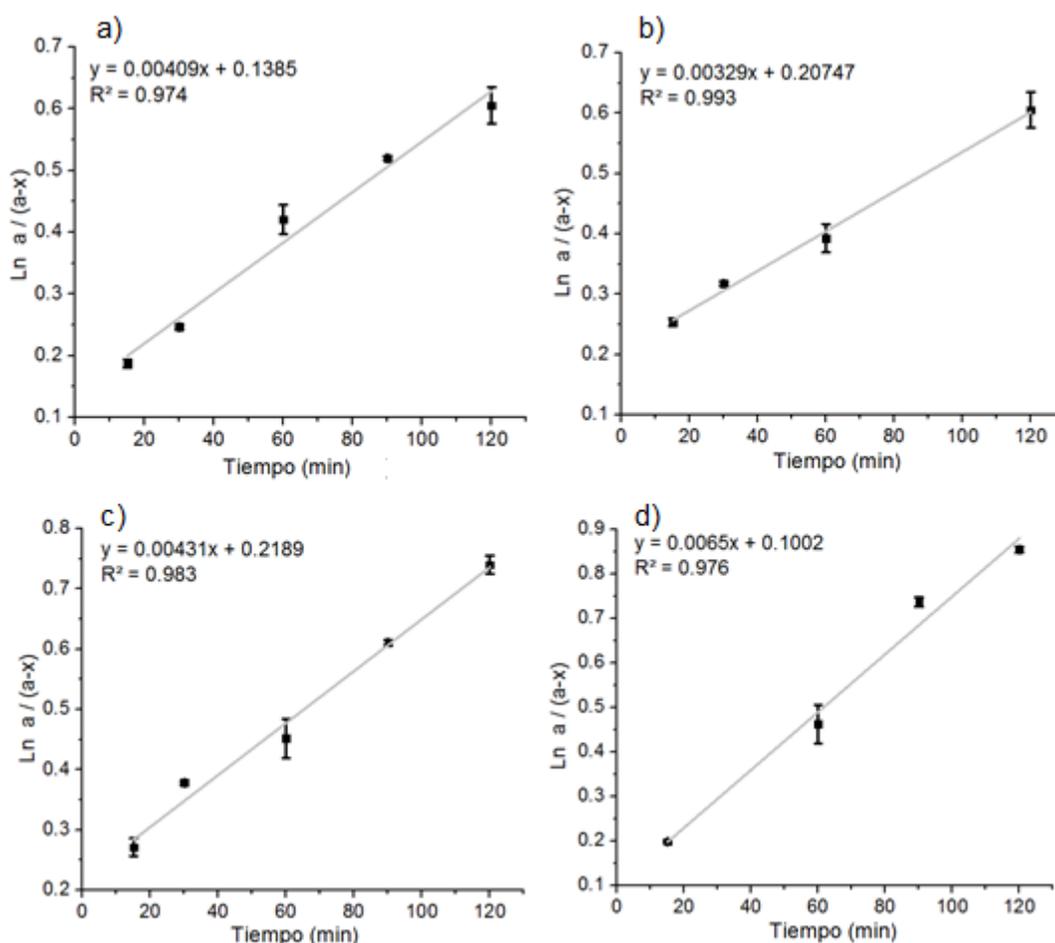


Figura 3.36 Modelo cinético de primer orden para la degradación de holoceulosa a partir de rastrojo de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

En contra parte, los experimentos a 100°C pese a haber degradado la misma cantidad de holocelulosa, mostraron constantes cinéticas diferentes, a 3% se determinó una velocidad de $4.09 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ mientras que a 7% se calculó 3.29×10^{-3}

min^{-1} , la diferencia en las constantes puede atribuirse a la presencia de una fase de degradación rápida observada entre los 0 y los 15 minutos de reacción, en la cual el experimento realizado con 3% mostró una menor disminución de holocelulosa asociada a dicha fase. En cada uno de los ajustes realizados se alcanzaron coeficientes de correlación R^2 superiores a 0.97 y una ordenada al origen entre 0.10 y 0.22, la cual se asocia a la concentración inicial de holocelulosa.

3.3.3 Análisis IR del rastrojo de maíz hidrolizado

En esta sección se presentan los espectros de IR de los sólidos remanentes de la hidrólisis del rastrojo de maíz, al igual que los IR's del tallo de haba la nomenclatura C, L y H corresponde a celulosa, lignina y hemicelulosa respectivamente.

a) Hidrólisis con 3%v H_3PO_4 y 100°C . La Figura 3.37 muestra los espectros de IR del rastrojo de maíz antes y después de 60 y 120 minutos de hidrólisis.

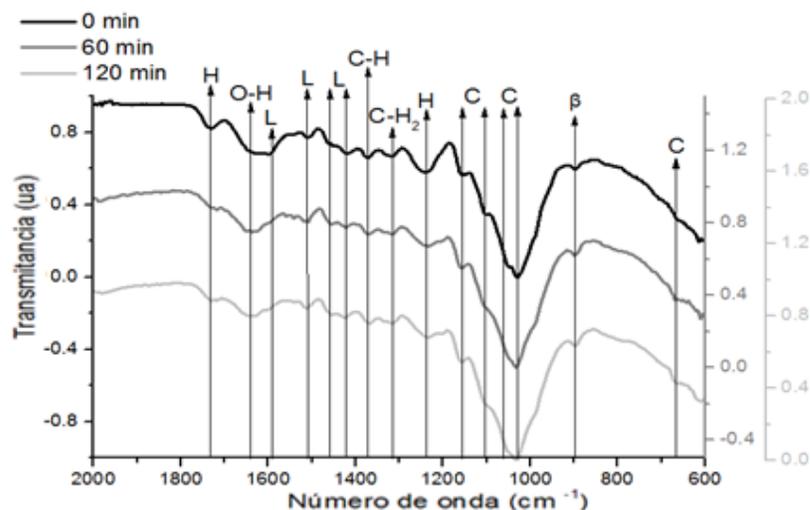


Figura 3.37 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 3%v H_3PO_4 y 100°C

Las vibraciones características de la hemicelulosa ubicadas en 1732 y 1238 cm^{-1} disminuyeron después de la hidrólisis, mismo comportamiento se detectó en las

bandas características de la lignina situadas en 1590 y en 1422 cm^{-1} . La vibración del enlace CH_2 observada a 1315 cm^{-1} bajo de intensidad después de 60 minutos de reacción, mientras que la zona correspondiente a la celulosa (1000 – 1200 cm^{-1}) no mostró cambios en la intensidad ni amplitud de las bandas, sugiriendo que la producción de azúcares en este experimento se debe principalmente a la depolimerización de la hemicelulosa.

b) Hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 100°C. La Figura 3.38 muestra los espectros de IR de los sólidos hidrolizados con 7%v y 100°C.

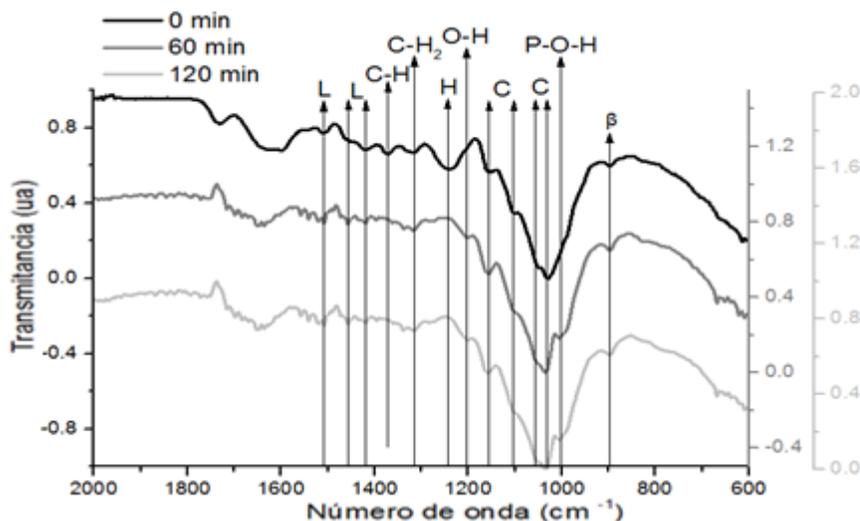


Figura 3.38 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 7%v H_3PO_4 y 100°C

Al igual que en el experimento redactado anteriormente, la producción de azúcares puede asociarse principalmente a la monomerización de la hemicelulosa, ya que una de sus vibraciones características (1422 cm^{-1}) disminuyó después de 60 minutos de hidrólisis. De acuerdo con lo reportado por Xu *et al.* (2013), el enlace O-H observado a 1200 cm^{-1} y detectado en las muestras de rastrojo de maíz hidrolizado corresponde a hemicelulosa y celulosa, la presencia de dicha vibración puede atribuirse a la desaparición de la banda característica de

hemicelulosa ubicada en 1422 cm^{-1} , la cual debido a su intensidad y amplitud se sobrepone a la vibración del enlace O-H. El enlace P-O-H se observó a 1002 cm^{-1} y la intensidad de la banda de vibración del enlace C-H disminuyó en las muestras hidrolizadas.

c) Hidrólisis con 3%v H_3PO_4 y 130°C . La intensidad de las bandas de vibración de la hemicelulosa disminuyó drásticamente con la hidrólisis ácida, a partir de los 60 minutos de tiempo de reacción se observó la presencia del enlace O-H propio de la celulosa y hemicelulosa a un valor de 1200 cm^{-1} . Las bandas características de la lignina ubicadas en 1590, 1510 y 1460 cm^{-1} disminuyeron su intensidad, mientras que las bandas características de la celulosa se hicieron más definidas y delgadas. Los espectros mostrados en la Figura 3.39 sugieren una depolimerización importante de la hemicelulosa y una monomerización parcial de la glucosa, al mismo tiempo parte de la lignina se solubilizó en el proceso de hidrólisis y la vibración del enlace β 1-4 glucosídico probablemente permaneció sin cambio por el alto contenido de celulosa en el sólido remanente.

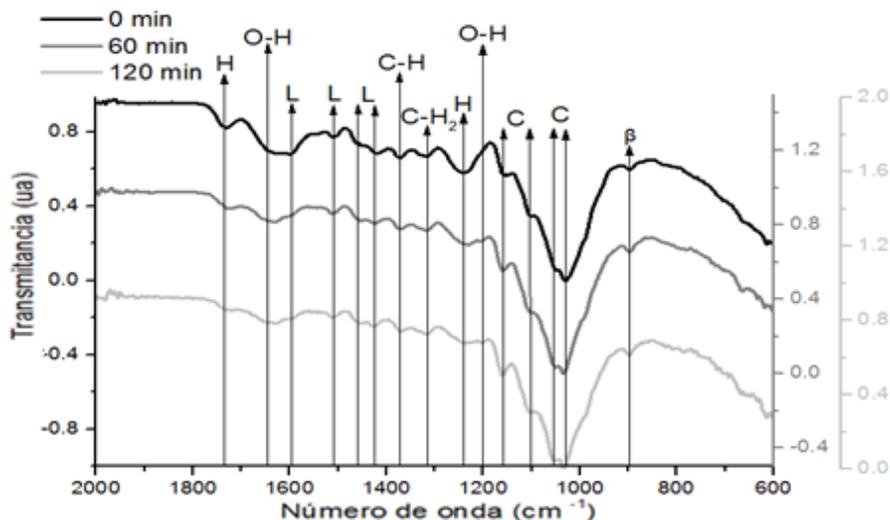


Figura 3.39 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 3%v H_3PO_4 y 130°C

d) Hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 130°C . A excepción del experimento realizado con 3% y 100°C , el enlace O-H característico de la celulosa y hemicelulosa apareció a 1200 cm^{-1} después de la hidrólisis ácida. Las vibraciones propias de la lignina observadas en 1590 , 1510 y 1460 cm^{-1} disminuyeron su intensidad a medida que el tiempo de contacto aumentó. Tal y como se observa en la Figura 3.40, las vibraciones de la celulosa bajaron ligeramente de intensidad y su amplitud disminuyó, después de 120 minutos de tiempo de contacto se observó a 1054 cm^{-1} una banda más definida correspondiente al enlace C-O-C de la celulosa. Las bandas situadas en 1732 y 1238 cm^{-1} son características de la hemicelulosa, después de la hidrólisis ácida con 7% H_3PO_4 y 130°C la intensidad de dichas vibraciones disminuyó significativamente, lo cual permite inferir que los azúcares recuperados provienen principalmente de la fracción hemicelulósica del rastrojo de maíz.

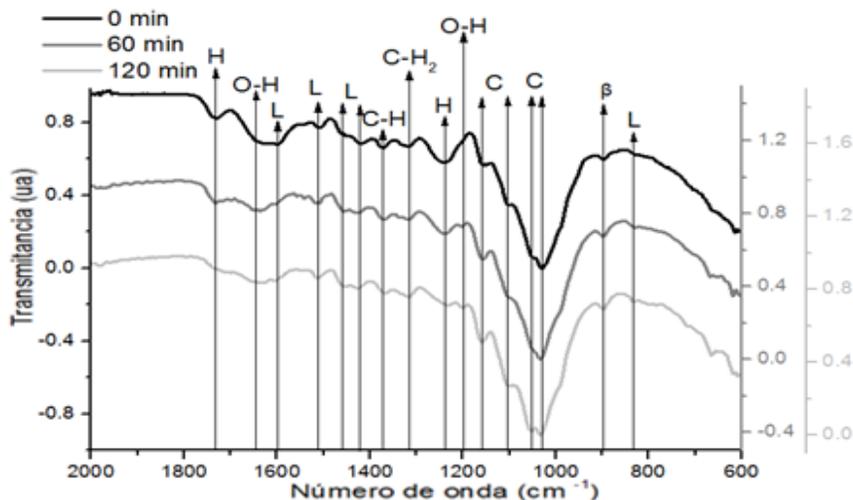


Figura 3.40 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de rastrojo de maíz con 7%v H_3PO_4 y 130°C

3.4 Hidrólisis ácida del olote de maíz

El presente apartado muestra la producción de azúcares reductores, la degradación de holocelulosa, los ajustes cinéticos y el análisis por IR del olote de maíz.

3.4.1 Determinación de azúcares reductores y factor de severidad

La recuperación de azúcares a partir de olote de maíz se muestra en la Figura 3.40. Al igual que en la hidrólisis de tallo de haba y de rastrojo de maíz, el experimento que mostró la mayor recuperación de azúcares fue el realizado con 7%v H_3PO_4 y 130°C, sin embargo, de los tres rastrojos el olote presentó el mejor rendimiento alcanzando una producción de 2.14 g por cada 5 g de olote. El experimento efectuado a 3%v y 100°C mostró el rendimiento más bajo con tan solo una recuperación de 0.35 g por cada 5 g de olote. La producción de azúcares en los experimentos llevados a cabo a 130°C tuvo un comportamiento parecido hasta antes de los 60 minutos, en donde las concentraciones de azúcar resultaron similares entre sí, a tiempos posteriores la recuperación de azúcares en el experimento con 7%v H_3PO_4 y 130°C se incrementó de manera exponencial.

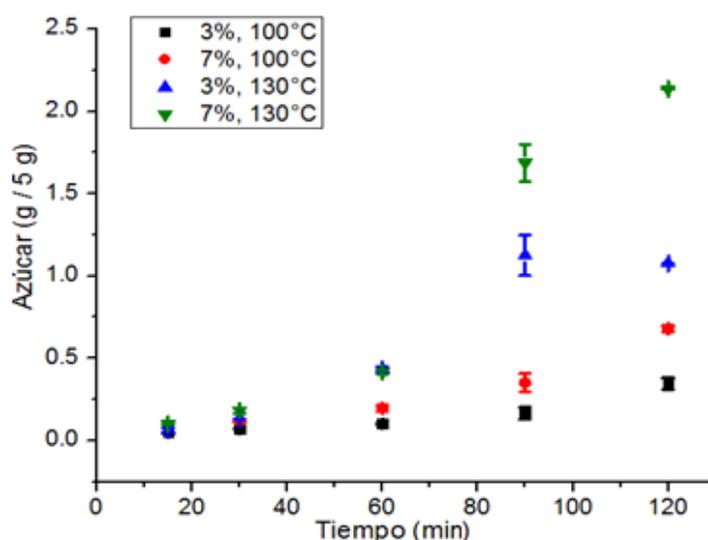


Figura 3.41 Recuperación de azúcares reductores a partir de olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

El ajuste de la recuperación de azúcares al modelo de Saeman se muestra en la Figura 3.42, mientras que los parámetros cinéticos y estadísticos son resumidos en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de olote de maíz

EXPERIEMENTO	K_1 (MIN ⁻¹)	K_2 (MIN ⁻¹)	R^2
3% y 100°C	4.74×10^{-4}	-8.05×10^{-3}	0.945
7% y 100°C	8.597×10^{-4}	-1.003×10^{-2}	0.966
3% y 130°C	1.58×10^{-3}	-1.125×10^{-2}	0.929
7% y 130°C	1.53×10^{-3}	-1.961×10^{-2}	0.941

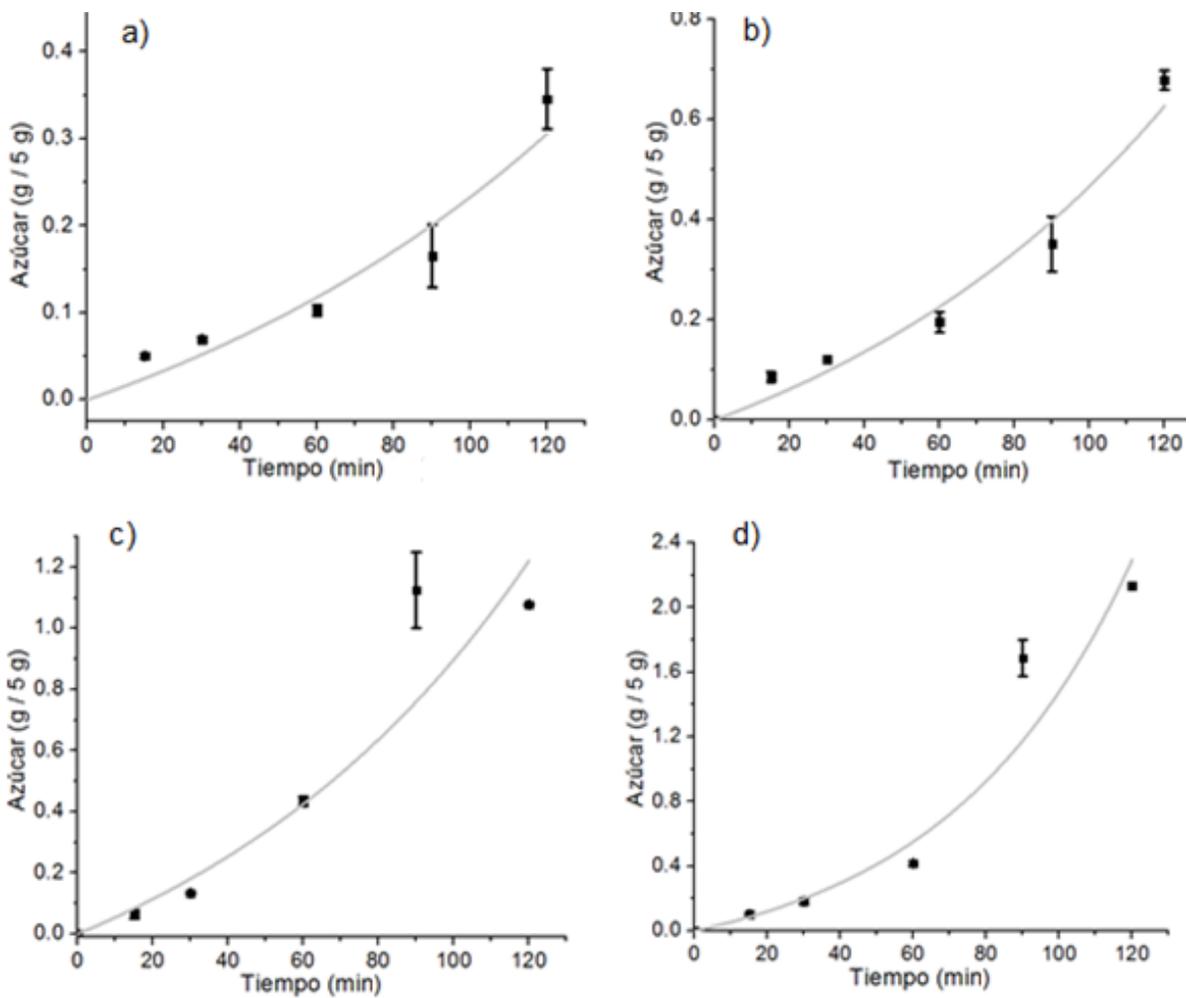


Figura 3.42 Modelo cinético de Saeman para la producción de azúcares a partir de olote de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

La constante k_1 asociada a la producción de azúcares mostró valores mayores en los experimentos realizados a 130°C , sin embargo, en la hidrólisis hecha con 3%v H_3PO_4 y 130°C se observó la velocidad de producción más alta. Pese a que la constante cinética k_1 de dicho experimento fue la mayor, su producción de azúcares en función del tiempo de contacto resultó menor en comparación con el experimento a 7%v y 130°C (Figura 3.41), esto puede atribuirse al valor obtenido de la constante de velocidad k_2 , el cual fue negativo en ambos experimentos y menor para el experimento con 3%v y 130°C . Los valores negativos de la constante k_2 se asocian a la falta de producción de inhibidores, es decir, entre más grande sea el valor negativo la constante de producción de azúcares resulta mayor. Por otra parte, las constantes k_1 de los experimentos llevados a cabo a 100°C mostraron un incremento en su valor al aumentar la concentración del ácido, comportamiento que había sido previamente reportado por Guerra-Rodríguez *et al.* en 2012 y por Gámez *et al.* en 2006 trabajando con rastrojo de paja y bagazo de caña de azúcar respectivamente. Los datos también se ajustaron al modelo cinético de primer orden y se presentan en la Figura 3.43.

Los experimentos realizados a 100°C mostraron un incremento en la constante cinética de 1.727×10^{-2} a $1.91 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ al aumentar la concentración de ácido de 3% a 7%v, por otra parte, en ambas concentraciones se observó un incremento considerable de la constante de velocidad al aumentar la temperatura de operación, comportamiento que va acorde con lo estipulado en la ecuación de Arrhenius. Las ordenadas al origen obtenidas en los experimentos realizados con 7%v H_3PO_4 fueron muy similares entre sí (-2.69 ± 0.09), las cuales resultaron a su vez mayores que las determinadas en las hidrólisis con 3%v H_3PO_4 , esto sugiere la presencia de una etapa de producción rápida de azúcares catalizada por el exceso de iones PO^{-3} .

El experimento llevado a cabo con 3%v H_3PO_4 y 130°C pese a no tener el mejor rendimiento de recuperación de azúcares, mostró la mayor velocidad de producción con una constante cinética de $3.80 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, lo cual es debido a que dicho

experimento alcanzó su máxima producción después de 90 minutos de tiempo de contacto mientras que el resto de los experimentos lo hizo después de 2 horas.

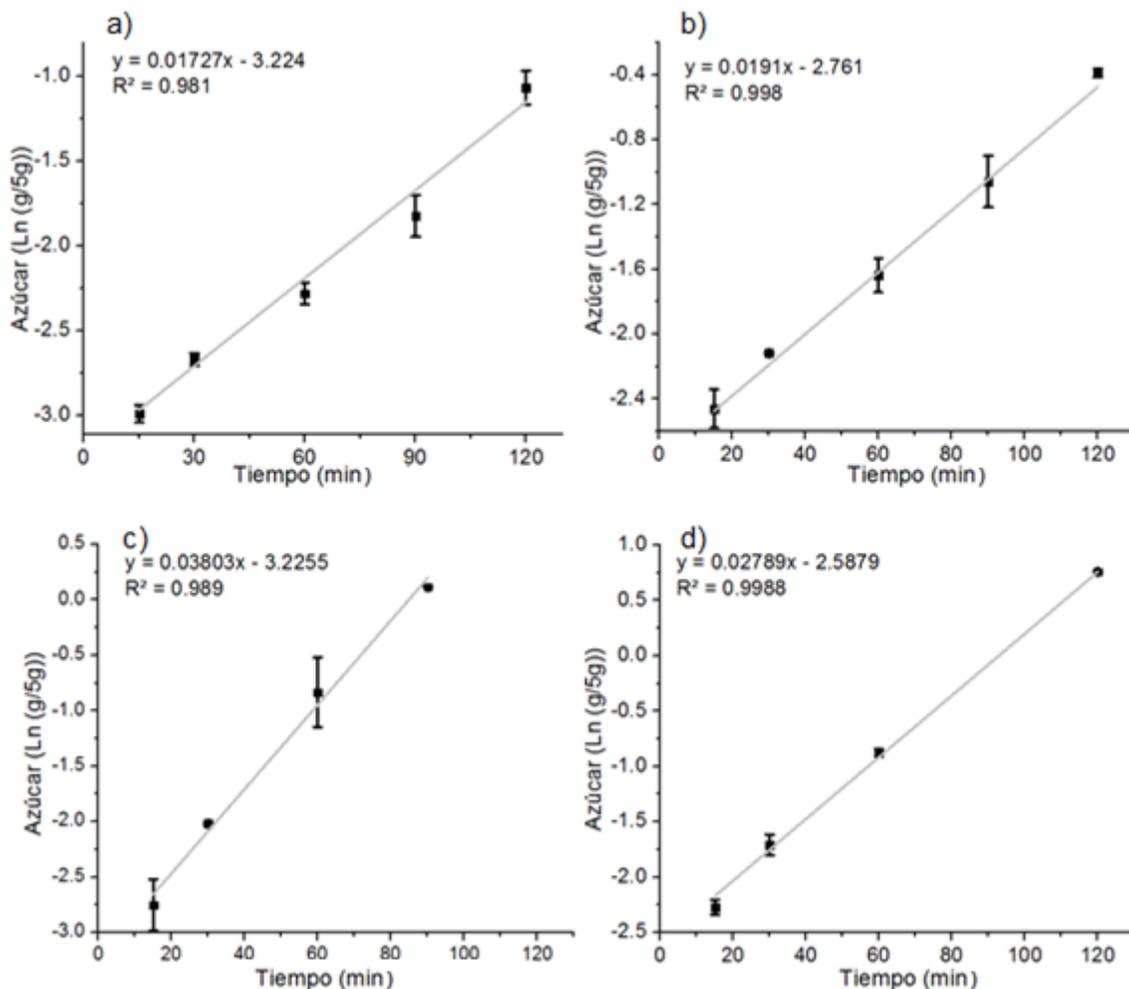


Figura 3.43 Modelo cinético de primer orden para la producción de azúcares a partir de olote de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

El olote de maíz fue el rastrojo que mayor cantidad de azúcares produjo, alcanzando una conversión de olote a azúcar de 42.72% en el experimento realizado con 7%v H_3PO_4 y 130°C, mientras que el porcentaje de conversión con respecto al contenido inicial de holocelulosa fue de 65.4%, valor que resultó superior a lo reportado por

Vasconcelos *et al.* (2013), quienes calcularon una conversión del 56.38% utilizando un pretratamiento ácido con 0.20%v H_3PO_4 , 8 minutos y 186°C, así como una hidrólisis enzimática con *Celluclast* durante 72 horas. En contra parte, Siripong *et al.* (2014), quienes estudiaron la hidrólisis enzimática de las especias *Achyranthes aspera* y *Sida acuta* obtuvieron porcentajes de conversión de 86.2% y 82.2% respectivamente, partiendo de un pretratamiento con H_3PO_4 concentrado al 80% durante 1 hora y 60°C. La Figura 3.44 muestra los porcentajes de conversión calculados en la hidrólisis del olote de maíz.

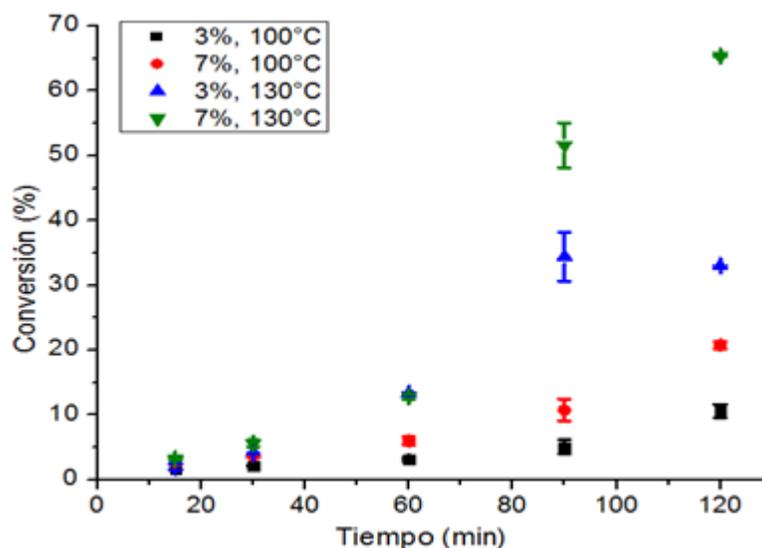


Figura 3.44 Porcentaje de conversión holocelulosa-azúcar en el olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Los factores CSF de cada uno de los experimentos realizados con olote de maíz mostraron una tendencia logarítmica en función del tiempo de reacción, de igual manera tal y como se observa en la Figura 3.45, el experimento con valores mayores del CSF fue realizado con 7%v y 130°C, mientras que las coeficientes más bajos se calcularon en la hidrólisis con 3%v y 100°C, lo cual va acorde con los experimentos con mejor y menor rendimiento respectivamente.

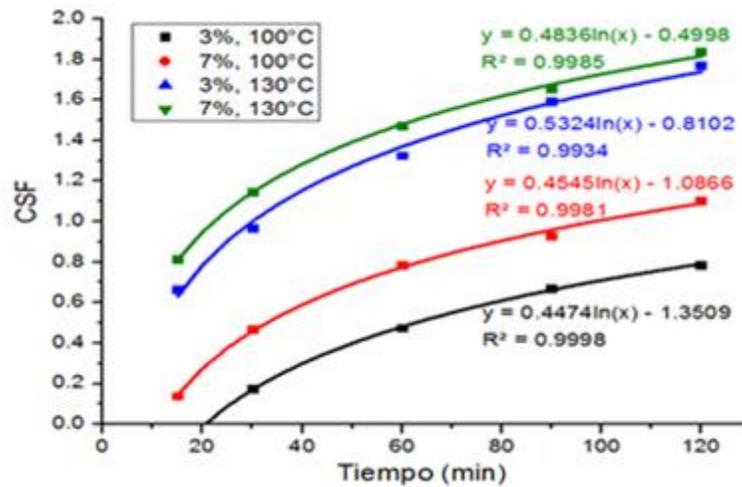


Figura 3.45 Factores CSF determinados en la hidrólisis del olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

La cantidad de azúcares se incrementó de forma exponencial en función de los coeficientes CSF, sin embargo, tal y como se observa en la Figura 3.46, el experimento efectuado con 3%v y 130°C mostró dicho comportamiento solo hasta los 90 minutos, ya que posteriormente la cantidad de azúcar disminuyó al incrementar el valor del CSF. Ante esto se puede inferir que los coeficientes CSF son una medida indirecta de la eficiencia de hidrólisis, ya que a valores mayores la producción de azúcares a partir de biomasa lignocelulósica aumenta, este supuesto no puede aplicarse de manera universal ya que depende de las condiciones de hidrólisis, así como de la naturaleza del ácido y de la materia orgánica.

Los coeficientes CSF determinados en los experimentos con 7%v y 130°C para el tallo de haba, rastrojo de maíz y olote fueron respectivamente 1.827, 1.847 y 1.837, pese a su similitud la cantidad de azúcares producidos fue muy diferente, esto puede atribuirse a la estructura de los rastrojos, a posibles compuestos intermediarios como arena o tierra que pudieron estar presentes al momento de hidrolizar, así como a la fracción másica y monómero primario de la hemicelulosa y lignina.

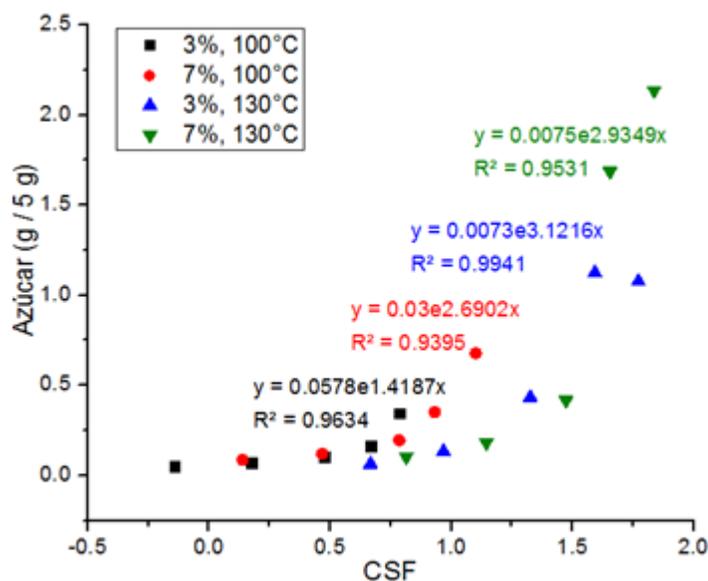


Figura 3.46 Relación entre los CSF y el azúcar recuperado a partir de olote de maíz a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

En vista de que el olote fue el rastrojo que produjo la mayor cantidad de azúcares monoméricos, se propusieron dos experimentos de hidrólisis a 100°C durante 5 horas, utilizando H₃PO₄ al 3% y 7%v. La tasa de producción en función del tiempo, así como su comportamiento cinético se describen en el Anexo E.

3.4.2 Degradación de holocelulosa

El porcentaje de olote hidrolizado de cada uno de los experimentos se muestra en la Figura 3.47. El experimento realizado con 7%v y 130°C presentó la mayor cantidad de olote hidrolizado, mostrando un porcentaje de degradación de 56.31%, el cual resultó superior al determinado con tallo de haba (46.30%) y ligeramente inferior al calculado con rastrojo de maíz (58.51%). Los residuos provenientes del cultivo de maíz, tuvieron porcentajes de descomposición similares, sin embargo, dicho valor disminuyó para el caso del tallo de haba, comportamiento que puede ser atribuido a la naturaleza de los rastrojos, a la interacción y acomodo de las cadenas de carbohidratos y al monómero principal de la hemicelulosa y lignina.

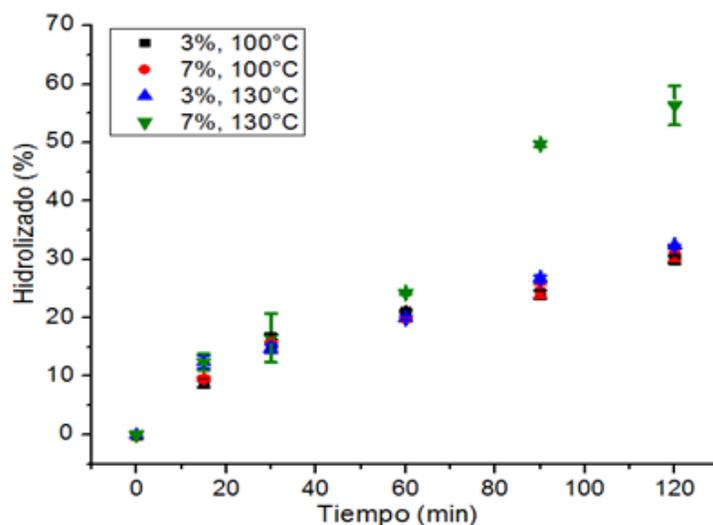


Figura 3.47 Porcentaje de olote de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

Por otra parte, el resto de las hidrólisis efectuadas con olote mostraron un comportamiento similar para cada uno de sus tiempos de contacto, de los cuales el sólido hidrolizado durante 120 minutos del experimento con 3%v y 130°C alcanzó la mayor degradación con un porcentaje de 32.41%, mientras que el menor porcentaje fue de 29.98% determinado en la hidrólisis con 3%v y 100°C. Tal y como se observa en la Figura 3.48, al igual que el porcentaje de hidrolizado, la mayor cantidad de holocelulosa degradada se determinó en el experimento realizado con 7%v y 130°C alcanzando después de 120 minutos de hidrólisis una descomposición de 1.85 g (56.65%). Hasta antes de los 60 minutos de reacción, todos los experimentos presentaron la misma degradación, sin embargo, a tiempos posteriores se observó un desfase de la cantidad de holocelulosa degradada. El experimento con 3%v y 100°C mostró el menor índice de descomposición, por otra parte, pese a que la cantidad de sólido hidrolizado resultó similar entre los experimentos efectuados con 3%v y 130°C, y 7%v y 100°C, la tasa de degradación de holocelulosa fue mayor para este último, sugiriendo que el aumento de los iones PO_4^{-3} en la solución favorece la depolimerización de la holocelulosa, mientras que el aumento en la temperatura incrementa la degradación de otros carbohidratos como la lignina.

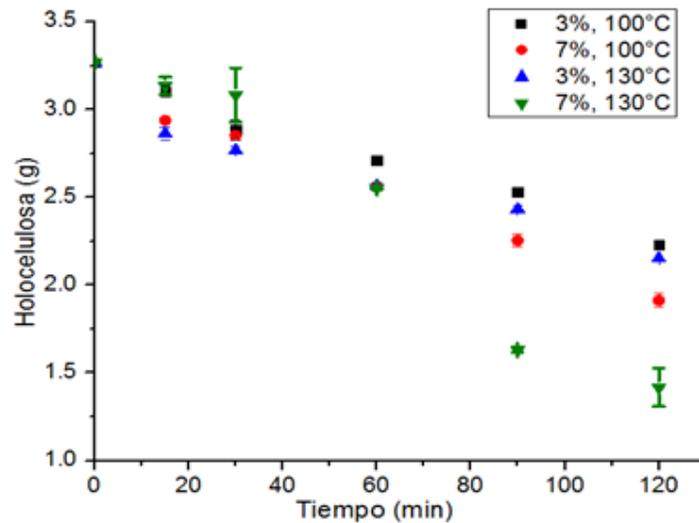


Figura 3.48 Degradación de holocelulosa en el olote de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido

La constante cinética referente a la degradación de holocelulosa, a ambas concentraciones de ácido mostró un incremento al aumentar la temperatura de hidrólisis de 100°C a 130°C. De acuerdo con la Figura 3.49, el experimento que degradó más rápido a la holocelulosa fue el realizado con 7%v y 130°C, en el cual se calculó una constante de velocidad de $8.27 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, valor que duplicó a la constante cinética más cercana determinada en el experimento con 7%v y 100°C.

La hidrólisis llevada a cabo con 3%v y 100°C alcanzó una velocidad de degradación de $3.03 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, dicho valor resultó ligeramente superior al calculado en el experimento con 3%v y 130°C ($2.88 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), al igual que el comportamiento de la degradación de holocelulosa y de biomasa en ambos experimentos, las constantes cinéticas determinadas mostraron valores muy cercanos entre sí, sin embargo, debido a la mayor degradación de holocelulosa calculada en el experimento con 3%v y 130°C, y mostrada en la Figura 3.48, el valor cinético esperado debería ser mayor al calculado con 3%v y 100°C, la discrepancia puede ser atribuida a errores en experimentación.

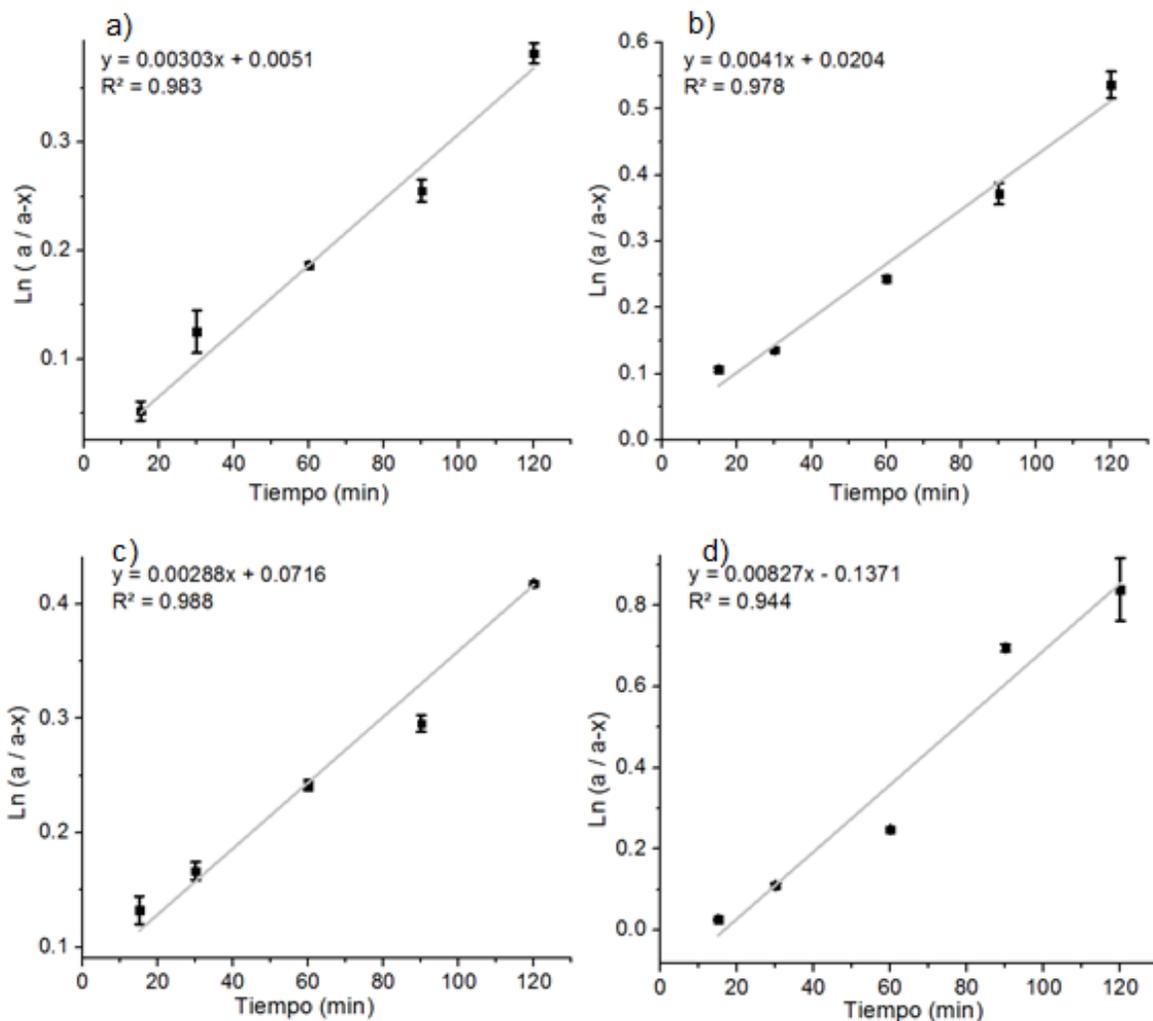


Figura 3.49 Modelo cinético de primer orden para la degradación de holoceulosa a partir de olote de maíz en los experimentos: a) 3% y 100°C, b) 7% y 100°C, c) 3% y 130°C, y d) 7%, 130°C

Tal y como se observa en las Figuras 3.48 y 3.49, la variable que más afecta a la depolimerización de la holocelulosa presente en el olote es la concentración de ácido, ya que ante un incremento en dicha concentración la degradación de holocelulosa aumentó significativamente, mientras que un incremento en la temperatura de hidrólisis no favoreció de manera importante a la degradación del carbohidrato. Comportamiento opuesto se observó en la producción de azúcares monoméricos, en la cual la temperatura resultó la variable de proceso más

importante, sugiriendo así que el incremento en la concentración de ácido favorece a la depolimerización y solubilización de compuestos como lignina y pectinas, así como a la degradación de holocelulosa a azúcares oligoméricos, mientras que un aumento en la temperatura contribuye a la formación de azúcares monoméricos.

3.4.3 Análisis IR del olote de maíz hidrolizado

En esta sección se presentan los espectros de IR de los sólidos remanentes de la hidrólisis del olote para cada uno de los experimentos.

a) Hidrólisis con 3%v H_3PO_4 y $100^\circ C$. Los espectros de IR de los sólidos remanentes de la hidrólisis con 3%v y $100^\circ C$ antes y después de 60 y 120 minutos de tiempo de contacto se muestran en la Figura 3.50.

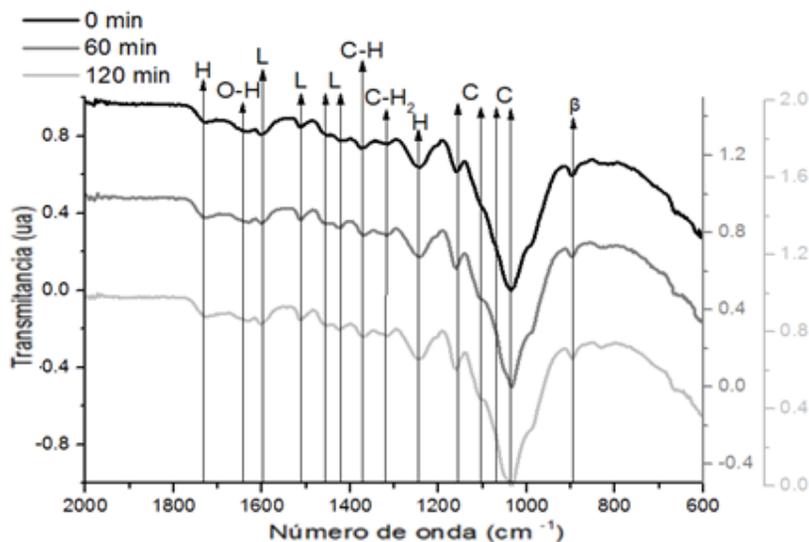


Figura 3.50 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 3%v H_3PO_4 y $100^\circ C$

En cada uno de estos espectros se observaron las bandas de vibración características de la lignina, hemicelulosa y celulosa, así como el enlace β 1-4 glucosídico situado en 895 cm^{-1} . El cambio más importante observado en los espectros se ubica en la zona de 1000 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} correspondiente a las

vibraciones propias de celulosa, las cuales disminuyeron ligeramente su intensidad y amplitud, haciendo más notorias algunas bandas del enlace C-O (1065 y 1103 cm^{-1}).

b) Hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 100°C. La Figura 3.51 muestra los espectros de IR analizados en el experimento con 7% y 100°C.

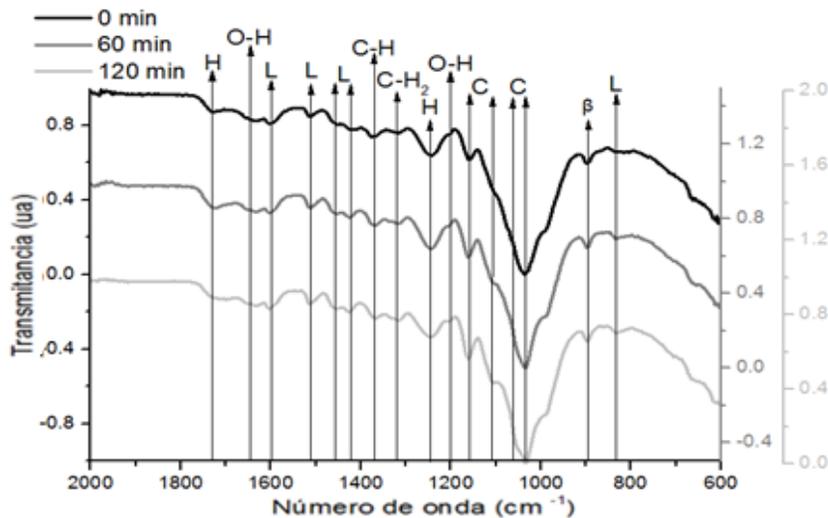


Figura 3.51 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 7%v H_3PO_4 y 100°C

Las vibraciones características de la hemicelulosa situadas en 1245 y 1732 cm^{-1} , mostraron un decremento en su intensidad a medida que el tiempo de contacto con el ácido aumentó, por otra parte, la región de 1000 a 1200 cm^{-1} propia de las vibraciones características de la celulosa mostró una disminución en la amplitud de cada una de sus bandas. De acuerdo con Xu *et al.* (2013), la vibración detectada a 1200 cm^{-1} después de 60 minutos de reacción corresponde al enlace O-H de la celulosa y de la hemicelulosa, el cual pudo observarse debido a la disminución de la banda de hemicelulosa (1245 cm^{-1}). Finalmente, las vibraciones características de la lignina situadas en 1511 y 832 cm^{-1} (Li *et al.*, 2016) aumentaron su intensidad después de 120 minutos, lo cual se atribuye a la

degradación de la holocelulosa que conllevó a un ligero aumento de la fracción másica de la lignina, este comportamiento había sido reportado anteriormente por Gaur *et al.* (2016), quienes trabajaron la hidrólisis ácida del tallo de algodón en presencia de H_2SO_4 . El análisis por IR aunado a la cinética de degradación de biomasa y de holocelulosa, sugiere que el incremento en la concentración de ácido favorece la producción de azúcares oligoméricos a partir de las cadenas de hemicelulosa y celulosa.

c) Hidrólisis con 3%v H_3PO_4 y $130^\circ C$. Los espectros de IR estudiados en este experimento (Figura 3.52), mostraron un comportamiento similar al observado en la hidrólisis con 7%v y $100^\circ C$, ya que después de 60 minutos las bandas de vibración características de la celulosa y de la hemicelulosa disminuyeron su intensidad y amplitud.

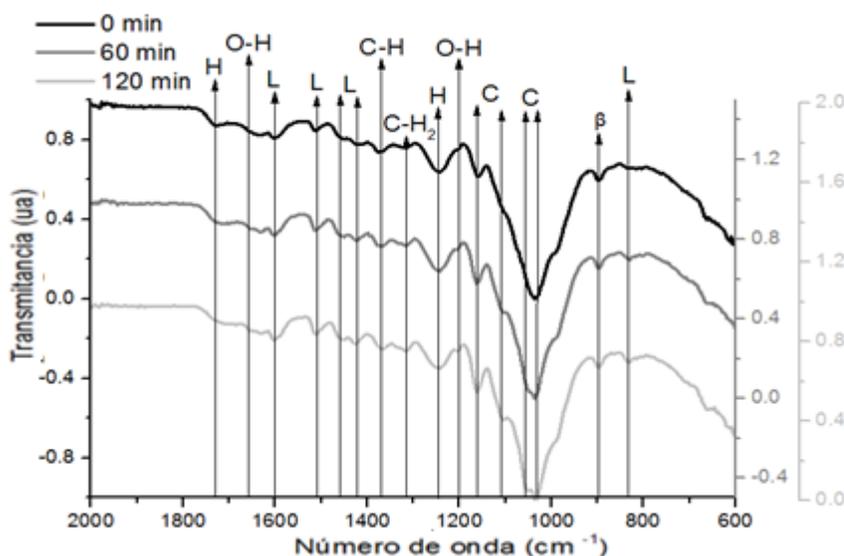


Figura 3.52 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 3%v H_3PO_4 y $130^\circ C$

Al mismo tiempo, las vibraciones de la lignina situadas a 1511 y 832 cm^{-1} aumentaron su intensidad después de 120 minutos de tiempo de contacto. El

enlace O-H propio de la holocelulosa, comenzó a observarse a 1200 cm^{-1} después de 60 minutos de reacción. Finalmente, el enlace CH_2 observado a 1315 cm^{-1} y correspondiente a la holocelulosa se hizo más definido al final del proceso.

d) Hidrólisis con 7%v H_3PO_4 y 130°C . La Figura 3.53 muestra los espectros de IR de las muestras tomadas antes y después de 60 y 120 minutos de hidrólisis con 7%v y 130°C .

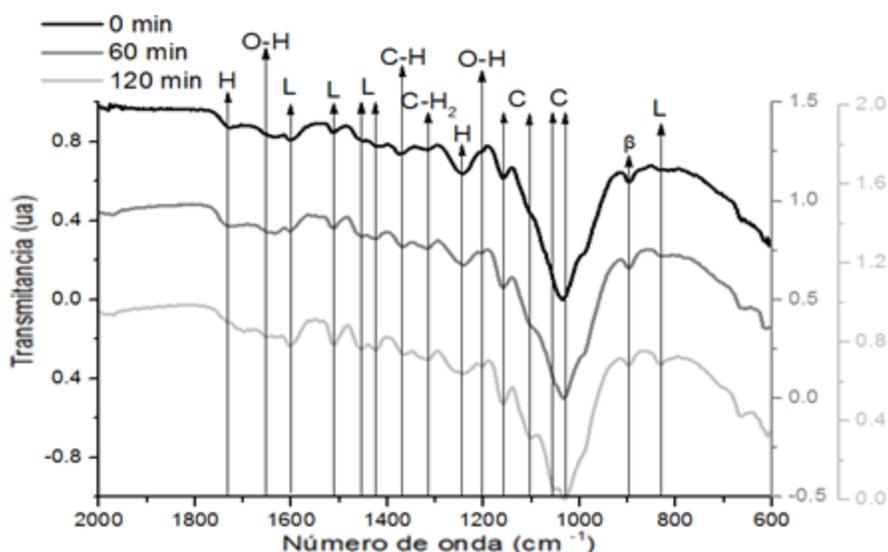


Figura 3.53 Espectros de IR de las muestras tomadas antes, a los 60 y a los 120 minutos de hidrólisis de olote con 7%v H_3PO_4 y 130°C

Al igual que en los experimentos anteriores, se observó un incremento en la intensidad de las vibraciones características de la lignina situadas en 1590 , 1510 , 1454 , 1424 y 832 cm^{-1} , al mismo tiempo las bandas de vibración de la celulosa ubicadas en el rango de 950 a 1170 cm^{-1} mostraron una disminución tanto en su intensidad como en su amplitud. La hemicelulosa detectada a 1245 y 1735 cm^{-1} , presentó una disminución en la intensidad de ambas bandas, sin embargo, en comparación con los espectros mostrados en la Figura 3.40 correspondiente a la hidrólisis con 7%v y 130°C de rastrojo de maíz, dicha disminución fue menor, esto

sugiere que los azúcares recuperados a partir del olote proceden principalmente de la celulosa, mientras que en el caso del rastrojo de maíz la mayor de cantidad de sacáridos tienen su origen en la depolimerización de la hemicelulosa. El comportamiento de la hidrólisis del olote es contraria a lo reportado previamente por Li *et al.* (2016) y Cao *et al.* (2009), quienes observaron una transformación casi total de la hemicelulosa a azúcares monoméricos utilizando rastrojo y olote de maíz en presencia de H_2SO_4 , sin embargo, Avci *et al.* (2013), estudiando la hidrólisis del rastrojo de maíz con H_3PO_4 determinó que el hidrolizado estaba formado principalmente por glucosa, es decir, la mayor cantidad de azúcares recuperados provenían de la celulosa. Las diferencias observadas entre dichos resultados y el presente trabajo pueden atribuirse tanto a la naturaleza del rastrojo y del ácido, así como a las condiciones de hidrólisis.

3.5 Rendimientos citados para la recuperación de azúcares

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los citados en literatura y considerando que un escalado en el proceso no afectaría la producción de azúcares, los rendimientos dados en g de azúcar por cada 100 g de sustrato son 16.57, 30.42 y 42.72 para el tallo de haba, rastrojo de maíz y olote respectivamente, los cuales fueron obtenidos en la hidrólisis realizada con 7%v y 130°C. Tal y como se ha reportado anteriormente (Fan *et al.*, 1987, Shuvashish *et al.*, 2014), la diferencia en los rendimientos de producción de azúcares es atribuida a la naturaleza de la misma materia prima y de las condiciones de hidrólisis. Cao *et al.* (2009), reportaron una producción de 12.23 g / 100 g sustrato utilizando rastrojo de maíz y ácido sulfúrico, rendimiento que resultó inferior a lo reportado en la presente investigación y puede atribuirse a la baja concentración del ácido y al poco tiempo de contacto. Por otro lado, Lenihan *et al.* (2010) determinaron un rendimiento de 55.5 g / 100 g sustrato después de 8 minutos de tratamiento, la diferencia en los rendimientos se atribuye a la naturaleza del sustrato, ya que la cáscara de papa empleada en el trabajo de Lenihan posee una estructura más noble y un mayor contenido de almidón que facilita de producción de azúcares monoméricos.

Buendía cuantificó los azúcares obtenidos de un tratamiento con H_2SO_4 a partir de *Jatropha curcas*, reportando un rendimiento máximo de 4.06 g / 100 g después de 5 horas de tratamiento a 120°C. Dicho rendimiento resultó menor a lo determinado en el presente estudio, mostrando el potencial que poseen los residuos de haba y maíz para la recuperación de azúcares fácilmente fermentables. Algunos investigadores como Li *et al.* (2016), Hsu *et al.* (2010), Gaur *et al.* (2016) y Castro *et al.* (2014), han estudiado la producción de azúcares monoméricos acoplado un pretratamiento con ácido diluido e hidrólisis enzimática, los rendimientos reportados al término del proceso biológico son 60.2, 56.8, 68.4 y 58.5 respectivamente, valores superiores al máximo rendimiento obtenido en el presente trabajo; 42.72, sin embargo, el tiempo de proceso y los costos de operación son mayores.

Por otra parte, estudios realizados Guerra-Rodríguez *et al.* (2012) y Gámez *et al.* (2006) han buscado determinar las mejores condiciones de hidrólisis analizando el efecto de la concentración de ácido sobre los parámetros cinéticos. Los rendimientos máximos obtenidos en dichos trabajos son: 30.32 g / 100 g paja de trigo y 18.21 g / 100 g de bagazo de caña de azúcar. La Tabla 3.7 resume los rendimientos obtenidos en el presente trabajo y algunos de los citados en la literatura.

Tabla 3.7 Rendimientos citados para la producción de azúcares

MATERIA PRIMA	CONDICIONES DE OPERACIÓN	RENDIMIENTO (g / 100 g)	REFERENCIA
Tallo de haba	Hidrólisis ácida: 7%v H_3PO_4 , 130°C, 2 horas, relación 1:15 entre sólido y líquido.	16.57	Presente trabajo
Rastrojo de maíz	Hidrólisis ácida: 7%v H_3PO_4 , 130°C, 2 horas, relación 1:15 entre sólido y líquido.	30.42	Presente trabajo
Olote	Hidrólisis ácida: 7%v H_3PO_4 , 130°C, 2 horas, relación 1:15 entre sólido y líquido.	42.72	Presente trabajo

Tabla 3.7 Rendimientos citados para la producción de azúcares (Continuación)

MATERIA PRIMA	CONDICIONES DE OPERACIÓN	RENDIMIENTO (g / 100 g)	REFERENCIA
Olote	Hidrólisis ácida: 2% (w/v) H ₂ SO ₄ , 121°C, 60 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido. Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72 horas.	60.2	Li <i>et al.</i> , 2016
Tallo de algodón	Hidrólisis ácida: 1.07%w H ₂ SO ₄ , 157°C, 20 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido. Hidrólisis enzimática: 50°C, 48 horas.	68.4	Gaur <i>et al.</i> , 2016
<i>Phalaris aquatica</i>	Hidrólisis ácida: 1%w H ₂ SO ₄ , 130°C, 60 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido. Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72 horas.	55.5	Pappas <i>et al.</i> , 2014
<i>Eucalyptus benthamii</i>	Hidrólisis ácida con vapor: 1%w H ₃ PO ₄ , 200°C, 10 minutos, relación 1:20 entre sólido y vapor. Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 24 horas.	58.5	Castro <i>et al.</i> , 2014
Tallo de girasol	Hidrólisis ácida: 1.3% (w/v) H ₂ SO ₄ , 167°C, 5 minutos, relación 1:5 entre sólido y líquido. Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72 horas.	32.8	Ruiz <i>et al.</i> , 2013

Tabla 3.7 Rendimientos citados para la producción de azúcares (Continuación)

MATERIA PRIMA	CONDICIONES DE OPERACIÓN	RENDIMIENTO (g / 100 g)	REFERENCIA
<i>Achyranthes aspera</i>	Hidrólisis ácida: 80%v H ₃ PO ₄ , 60°C, 60 minutos, relación 1:8 entre sólido y líquido.	82.6	Siripong <i>et al.</i> , 2016
<i>Sida acuta</i>	Hidrólisis enzimática: 50°C, 120 rpm, 72 horas.	74.2	
Rastrojo de colza	Hidrólisis ácida: 0.32%v H ₃ PO ₄ , 178°C, 18 minutos, relación 1:12 entre sólido y líquido Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72 horas.	43.4	López-Linares <i>et al.</i> , 2013
Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis ácida: 0.20% (w/v) H ₃ PO ₄ , 186°C, 8 minutos, relación 1:5 entre sólido y líquido. Hidrólisis enzimática: 50°C, 150 rpm, 72 horas.	36.7	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2013
Rastrojo de arroz	Hidrólisis ácida: 0.8%w H ₂ SO ₄ , 190°C, 4 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido. Hidrólisis enzimática: 50°C, 100 rpm, 72 horas.	56.8	Hsu <i>et al.</i> , 2010
Cáscara de papa	Hidrólisis ácida: 6.25%v H ₃ PO ₄ , 135°C, 8 minutos, 130 bar.	55.5	Lenihan <i>et al.</i> , 2010
Rastrojo de maíz	Hidrólisis ácida: 2.13%v H ₂ SO ₄ , 121°C, 105 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	12.23	Cao <i>et al.</i> , 2009
Rastrojo de cebada	Hidrólisis ácida: 1%v H ₃ PO ₄ , 160°C, 60 minutos, relación 1:12 entre sólido y líquido.	29.1	Panagiotopoulos <i>et al.</i> , 2012

Tabla 3.7 Rendimientos citados para la producción de azúcares (Continuación)

MATERIA PRIMA	CONDICIONES DE OPERACIÓN	RENDIMIENTO (g / 100 g)	REFERENCIA
Paja de trigo	Hidrólisis ácida: 2%w H ₂ SO ₄ , 130°C, 29 minutos, relación 1:12 entre sólido y líquido.	30.32	Guerra Rodríguez <i>et al.</i> , 2012
Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis ácida: 4%w H ₃ PO ₄ , 122°C, 300 minutos, relación 1:8 entre sólido y líquido.	18.21	Gámez <i>et al.</i> , 2006
Bambú	Hidrólisis ácida: 6%v H ₃ PO ₄ , 170°C, 45 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	23.9	Hong <i>et al.</i> , 2012

3.6 Obtención de biohidrógeno a partir de hidrolizados

Los hidrolizados recuperados de los experimentos con 7%v y 130°C de tallo de haba y de olote de maíz fueron utilizados como materia prima para la obtención de biohidrógeno mediante fermentación anaerobia. La metodología empleada se describió en el párrafo 4 del apartado 2.4. Después de la recuperación de fosfato de magnesio, el contenido de azúcares reductores se cuantificó, obteniendo las concentraciones de 21.76 g/L para el tallo de haba y de 43.31 g/L para el olote. El volumen de hidrolizado recuperado en ambos casos fue de 8 mL, lo cual fue equivalente a una masa total de azúcar de 0.174 g y de 0.347 g para el tallo de haba y el olote respectivamente. Se utilizaron 24 viales de 20 mL, a los cuales se les agregó en el caso del tallo de haba 7.25×10^{-3} g de azúcar, mientras que para la fermentación de los azúcares hidrolizados de olote se adicionaron 1.44×10^{-2} g de azúcar.

3.6.1 Fermentación de los hidrolizados de tallo de haba

La Figura 3.54 muestra la producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados del tallo de haba en función del tiempo. El volumen del espacio gaseoso de los viales (15 mL) fue considerado para determinar la cantidad total de biohidrógeno generado.

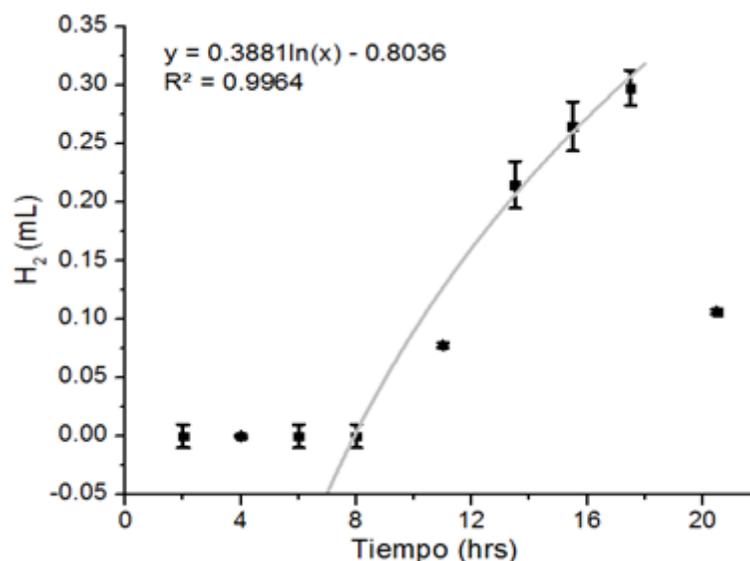


Figura 3.54 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de tallo de haba

La producción de biohidrógeno comenzó después de 11 horas, alcanzando su rendimiento máximo de 0.30 mL a las 17.5 horas, valor que equivale a una tasa de producción de 0.885 mmol H₂ / L biogás y a un rendimiento de 0.33 mol H₂ / mol hexosa. Considerando el rendimiento máximo teórico de la fermentación anaerobia (4 mol H₂ / mol hexosa), la cantidad de biohidrógeno esperado es de 3.61 mL, sin embargo, datos experimentales del consorcio bacteriano utilizado en la presente investigación han sido reportados por Phowan *et al.* (2010), Lin *et al.* (2007) y Ávila (2010), obteniendo rendimientos de 2.76, 2.29 y 2.74 mol H₂ / mol hexosa. Considerando un rendimiento promedio de 2.5 mol H₂ /mol hexosa, el volumen máximo de biohidrógeno esperado es de 2.25 mL. Con respecto a este valor, la cantidad de H₂ obtenido en el presente trabajo representa un 13.29%. Por otra parte, la producción de biohidrógeno se ajustó a un modelo logarítmico, el cual se observó desde las 8 hasta las 17.5 horas (Figura 3.54).

Las bacterias comenzaron su crecimiento a partir de las 4 horas, alcanzando la fase de estabilidad después de 8 horas. La mayor generación de biohidrógeno se observó a las 17.5 horas, a ese tiempo el número de células resultó menor en comparación

con los valores adyacentes, este comportamiento puede atribuirse a un error al momento de realizar la cuenta directa y al tiempo que transcurrió desde la toma de la muestra hasta su conteo. La Figura 3.55 muestra el crecimiento de las bacterias observado durante la fermentación de los azúcares de los hidrolizados de tallo de haba.

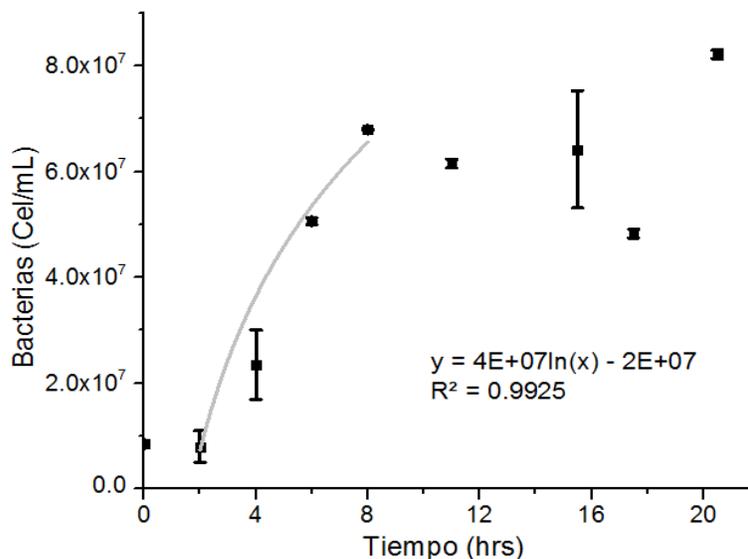


Figura 3.55 Crecimiento del consorcio bacteriano durante la fermentación de los hidrolizados del tallo de haba

Finalmente el pH se incrementó desde el inicio del experimento hasta las 8 horas, etapa que se asocia al crecimiento y estabilidad de los microorganismos. A tiempos posteriores se observó un decremento del pH, el cual está relacionado con la producción de biohidrógeno y de ácidos orgánicos. La Figura 3.56 muestra el comportamiento de las bacterias y del pH.

Por otra parte tal y como se observa en la Figura 3.57, la producción de biohidrógeno mostró un desfase de 7 horas con respecto al crecimiento de las bacterias. Después de 11 horas, la producción de biohidrógeno comenzó y como consecuencia el pH del lixiviado disminuyó. Al término del proceso (21.5 horas) la cantidad de

células por mL se incrementó, este comportamiento había sido observado anteriormente por Ávila (2010) y atribuido a la activación de la bacteria *C. butyricum*, la cual comienza su metabolismo horas después que el microorganismo *E. cloacae*. La máxima producción de biohidrógeno se observó a las 17.5 horas, a tiempos posteriores dicha producción disminuyó drásticamente, lo cual puede atribuirse a la falta de hermeticidad del sistema que propició la salida del H_2 generado al ambiente.

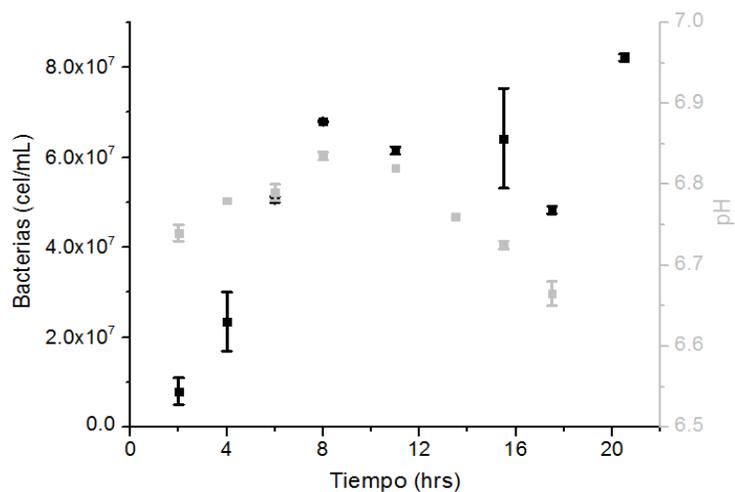


Figura 3.56 Comportamiento de las bacterias y del pH durante la fermentación de los hidrolizados del tallo de haba

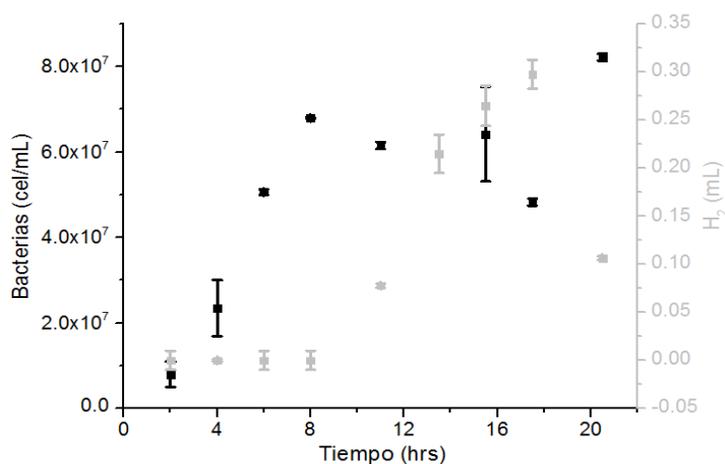


Figura 3.57 Comportamiento de las bacterias y del H_2 producido durante la fermentación de los hidrolizados del tallo de haba

3.6.2 Fermentación de los hidrolizados de olote

Considerando un rendimiento del 100% el volumen máximo esperado de biohidrógeno es de 7.19 mL y de 4.49 mL en función del rendimiento experimental citado en literatura (2.5 mol H₂ / mol hexosa). El volumen máximo de biohidrógeno generado fue de 0.92 mL obtenido después de 23.5 horas, valor que equivale a una tasa de producción de 2.74 mmol H₂ / L biogás y a un rendimiento de 0.52 mol H₂ / mol hexosa. Tal y como se observa en la Figura 3.58, la producción de biohidrógeno comenzó a partir de las de 8 horas, alcanzando la fase de estabilidad después 15.5 horas.

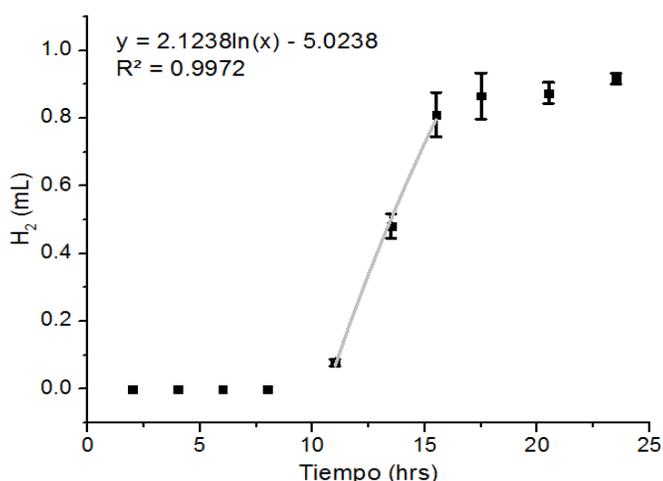


Figura 3.58 Producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de olote de maíz

El crecimiento de las bacterias a durante el proceso fermentativo de los hidrolizados de olote, mostró un comportamiento similar al observado en el tallo de haba, ya que dicho crecimiento comenzó a partir de las 4 horas y alcanzó su fase de estabilidad después de las 8 horas. La Figura 3.59 muestra la cinética de crecimiento y el ajuste de la fase exponencial.

Por otra parte, el pH disminuyó desde el inicio del experimento hasta las 6 horas, sin embargo, desde las 6 hasta las 11 horas el pH se mantuvo en 6.84 ± 0.01 , lo cual se atribuye al crecimiento de las bacterias y a su fase de estabilización. Los valores de

pH más bajos se determinaron después de 15.5 y 17.5 horas, tiempo al cual la producción de biohidrógeno comenzó a estabilizarse. La Figura 3.60 muestra el crecimiento bacteriano y el comportamiento de pH durante la fermentación de los hidrolizados de olote de maíz.

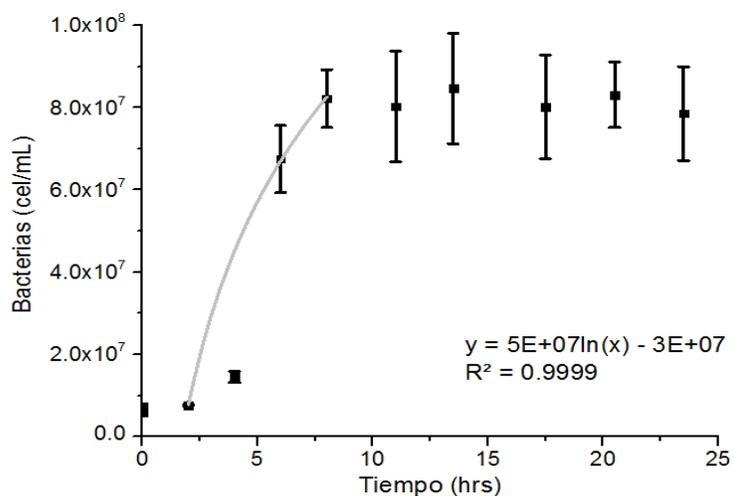


Figura 3.59 Crecimiento del consorcio bacteriano durante la fermentación de los hidrolizados de olote de maíz

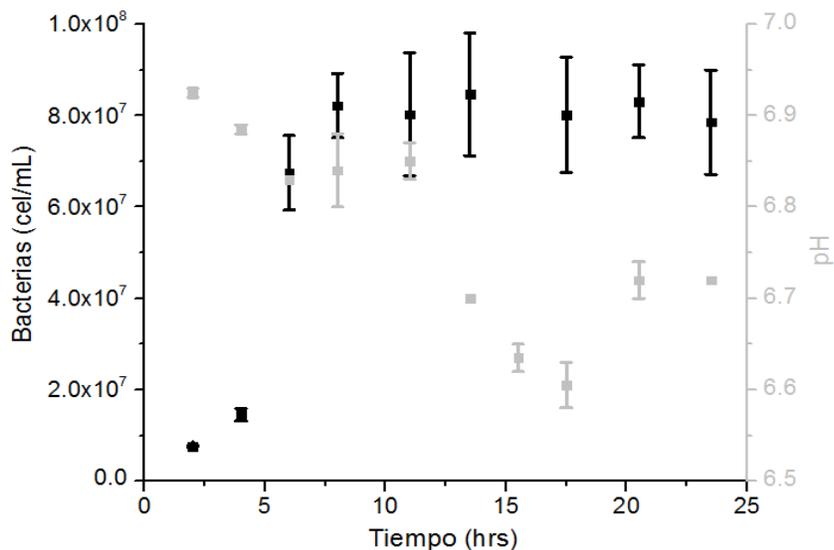


Figura 3.60 Comportamiento de las bacterias y del pH durante la fermentación de los hidrolizados de olote de maíz

Al igual que en la fermentación del tallo de haba, la producción de biohidrógeno presentó un desfase de 7 horas con respecto al crecimiento de las bacterias. Una vez alcanzada la fase de estabilización ambas determinaciones no mostraron cambios importantes. El máximo volumen de biohidrógeno correspondió, al máximo número de bacterias y a los valores de pH más bajos. La Figura 3.61 muestra la producción de biohidrógeno y el crecimiento microbiano durante la fermentación de los hidrolizados del olote de maíz.

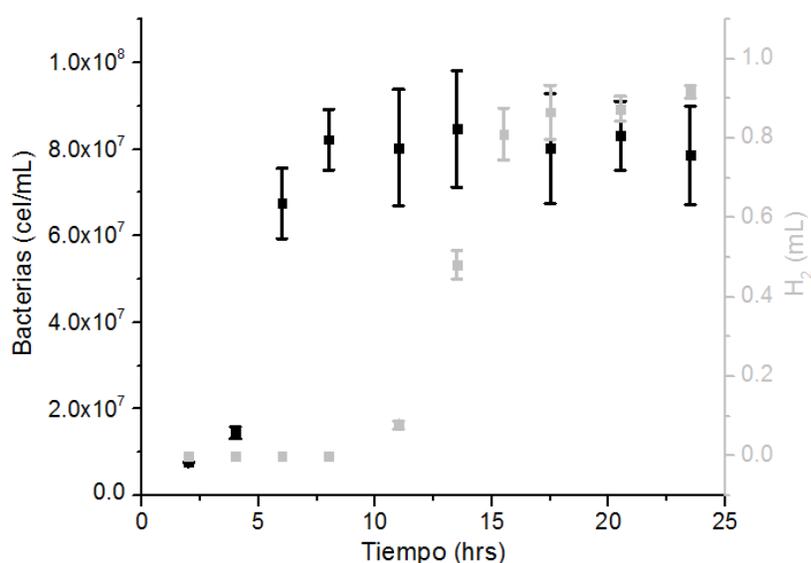


Figura 3.61 Comportamiento de las bacterias y del H₂ producido durante la fermentación de los hidrolizados del olote de maíz

El consorcio microbiano fue capaz de utilizar a los hidrolizados de tallo de haba y de olote de maíz como fuente de carbono para la producción de biohidrógeno, alcanzando rendimientos de 0.33 y 0.52 mol H₂ / mol hexosa respectivamente, los cuales resultaron inferiores al obtenido por Lo *et al.* (2011), quienes determinaron un rendimiento de 1.08 mol H₂ / mol hexosa, estudiando la fermentación de los hidrolizados ácidos de bagazo de caña de azúcar utilizando la bacteria *Clostridium butyricum*. La Tabla 3.8 resume algunos de los rendimientos determinados en la producción de biohidrógeno citados en la literatura.

Tabla 3.8 Rendimientos citados en la literatura para la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados

Sustrato	Hidrólisis	Microorganismo	Temperatura	mol H ₂ / mol hexosa	Referencia
Tallo de haba	7%v H ₃ PO ₄ , 130°C, 2 horas.	<i>Clostridium butyricum</i> y <i>Enterobacter cloacae</i>	37°C	0.33	Presente trabajo
Olote	7%v H ₃ PO ₄ , 130°C, 2 horas.	<i>Clostridium butyricum</i> y <i>Enterobacter cloacae</i>	37°C	0.52	Presente trabajo
Rastrojo de maíz	2 horas contacto con 1.2%v H ₂ SO ₄ , 2 minutos con vapor a 190°C.	Lodos de fermentador	35°C	3.0	Datar <i>et al.</i> , 2007
Bagazo de caña de azúcar	83%v H ₃ PO ₄ , 50°C, 30 minutos. Enzimas	<i>Clostridium butyricum</i>	35°C	1.08	Lo <i>et al.</i> , 2011
Paja de arroz	55%v H ₂ SO ₄ , 40°C y 20 minutos.	Lodos de fermentador	37°C	0.44	Liu <i>et al.</i> , 2013
Residuos de cultivo de hongos	55%v H ₂ SO ₄ , 40°C, 40 minutos y relación 1:5 entre sólido y líquido.	Lodos de fermentador	37°C	0.49	Li <i>et al.</i> , 2011
Celulosa	<i>Cellulomonas sp</i>	<i>Clostridium pasteurianum</i>	37°C	0.22	Lo <i>et al.</i> , 2008

Tabla 3.8 Rendimientos citados en la literatura para la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados (Continuación)

Sustrato	Hidrólisis	Cultivo	°C	mol H ₂ / mol hexosa	Referencia
^a Celulosa ^b Pasto ^c Bagazo	<i>Clostridium TCW1</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	37°C	^a 0.50 ^b 1.33 ^c 1.25	Lo <i>et al.</i> , 2009
Rastrojo de maíz	1.69%v H ₂ SO ₄ , 121°C, 117 minutos, relación 1:10 entre sólido y líquido.	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	60°C	2.24	Cao <i>et al.</i> , 2009
Almidón de trigo	H ₂ SO ₄ a pH 2.5, 121°C, 15 minutos, relación 1:50 entre sólido y líquido.	Lodos de fermentador	37°C 55°C	1.6 2.4	Cakir <i>et al.</i> , 2010
Bagazo de caña de azúcar	0.5 %v H ₂ SO ₄ , 60 minutos, 121°C y relación 1:15 entre sólido y líquido.	<i>Clostridium butyricum</i>	37°C	1.73	Pattra <i>et al.</i> , 2008
Paja de arroz	0.9% <i>m</i> H ₂ SO ₄ , 150°C, 60 minutos.	Lodos de fermentador	40°C	0.95	Chang <i>et al.</i> , 2011
Paja de trigo	1.75%v H ₃ PO ₄ , 190°C y 10 minutos.	Lodos de fermentador anaerobio	55°C	61 NmL /g COD	Chandolias <i>et al.</i> , 2016
Pulpa de manzana	0.5% (m/v) H ₂ SO ₄ , 121°C, 20 minutos, relación 2:15 entre sólido y líquido.	<i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Clostridium butyricum</i>	37°C	19.6 mmol H ₂ / L biogás	Pachapur <i>et al.</i> , 2015

El rendimiento en la producción de biohidrógeno obtenido en el presente trabajo a partir de olote de maíz, resultó mayor en comparación a lo reportado por Liu *et al.* (2013) y Li *et al.* (2011), quienes alcanzaron rendimientos de 0.44 y 0.49 mol H₂ / mol hexosa respectivamente. De acuerdo con Nissilä *et al.* (2014), los rendimientos bajos pueden atribuirse a la formación de compuestos inhibitorios que se derivan del contacto entre la biomasa lignocelulósica con ácidos concentrados. En contra parte, Lo *et al.* (2011) alcanzaron un rendimiento de 1.08 mol H₂ / mol hexosa partiendo de un tratamiento con ácido concentrado, la diferencia fue una etapa enzimática posterior que generó una mayor cantidad de azúcares y un menor índice de inhibidores. Por otro lado, Lo *et al.*, en 2008 y en 2009 estudiaron la producción de biohidrógeno a partir de los hidrolizados de celulosa utilizando bacterias del género *Cellulomonas sp* y *Clostridium TCW1*, los bajos rendimientos citados por Lo *et al.*, se atribuyen por una parte al bajo tiempo de retención hidráulico y por otro a la presencia de esporas de *Clostridium* que pudieron consumir los azúcares presentes en el medio produciendo otros metabolitos.

La fermentación de hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis ácida ha sido estudiada en los últimos años, algunas investigaciones como las realizadas por Cao *et al.* (2009), Cakir *et al.* (2010), Chang *et al.* (2011) y Pattra *et al.* (2008) muestran el potencial que tienen los hidrolizados ácidos para la producción de biohidrógeno. La diferencia entre los rendimientos reportados por Cao *et al.* (2009) y Cakir *et al.* (2010) con los obtenidos en el presente trabajo se atribuyen a los microorganismos empleados, al radio de inoculación y al tiempo de retención de hidráulica, ya que mientras en esta investigación se utilizó una relación 1:100 entre inóculo y medio de cultivo Cao *et al.* (2009) emplearon un radio de 1:48. Cakir *et al.* (2010) comenzó a observar H₂ después de 3 días llegando a la máxima producción a las 192 horas, tiempos más prolongados en comparación con los estudiados en esta investigación.

Los bajos rendimientos obtenidos en el presente trabajo pueden atribuirse al tiempo de retención hidráulica, que fue solo de 25 horas en comparación con las 40 horas

reportadas por Pattra *et al.* (2008); posiblemente también la presencia de inhibidores causó el bajo rendimiento. De acuerdo con Cao *et al.* (2009) y con Nissilä *et al.* (2014), las cantidades de furfural y de hidroximetil furfural que inhiben el desarrollo de los microorganismos hidrogénicos son 1 g/L y 2 g/L respectivamente. Chang *et al.* (2011), eliminaron a los inhibidores de manera previa a la fermentación en un proceso de detoxificación con carbón activado, alcanzando un mejor rendimiento y una mayor tasa de producción antes de las 25 horas. A fin de evaluar el efecto de los inhibidores sobre la producción de biohidrógeno se recomienda un análisis minucioso sobre los hidrolizados.

CONCLUSIONES

Con base en la búsqueda bibliográfica, no se encontraron trabajos relacionados con la hidrólisis y la producción de biohidrógeno a partir de residuos de haba.

La cuantificación de holocelulosa y lignina no presentó interferencias en los residuos agrícolas hidrolizados, en cambio para obtener buenos resultados sobre los residuos agrícolas no hidrolizados fue necesaria la extracción con solventes orgánicos.

Los residuos agrícolas resultaron una materia prima viable para la recuperación de azúcares monoméricos, de ellos el olote de maíz mostró los mayores rendimientos. El incremento tanto de la temperatura como de la concentración de ácido favoreció la producción de azúcares y la descomposición de la holocelulosa, los mejores rendimientos para cada uno de los rastrojos fueron con 7%v y 130°C.

El CSF mostró que hasta antes de la degradación térmica de los azúcares, un incremento en el valor de dicho factor aumenta exponencialmente la producción de azúcares.

Los resultados experimentales de producción de azúcar se ajustaron a los modelos cinéticos de Saeman y de primer orden para cada uno de los hidrolizados de los desechos agrícolas. La degradación de la holocelulosa se ajustó a la ecuación cinética de primer orden.

El análisis por espectroscopia de IR resultó importante para ver el comportamiento de la lignina, de la celulosa y de la hemicelulosa presentes en los desechos agrícolas, en función de las condiciones y el tiempo de hidrólisis.

Los azúcares presentes en los hidrolizados de tallo de haba y de olote de maíz sirvieron como fuente de carbono para el desarrollo de los microorganismos y para la

producción de biohidrógeno. Es necesario un estudio más profundo de la fermentación para incrementar los rendimientos y aumentar la tasa de producción.

RECOMENDACIONES

Para cada uno de los rastrojos se recomienda realizar hidrólisis con ambas concentraciones a 110°C y a 120°C, a fin de determinar la energía de activación, el factor de frecuencia y la energía de Gibbs tanto en la producción de azúcares como en la degradación de holocelulosa. Por otra parte, es necesario el estudio de dos concentraciones más para evaluar el efecto de la concentración del ácido sobre la constante cinética de producción de azúcares.

Hidrolizar cada uno de los rastrojos utilizando tiempos de reacción más prolongados y un sistema de control de agitación, ajustar los datos obtenidos al modelo de Saeman y determinar el tiempo medio de reacción y su equilibrio, datos que ayudarían en el diseño de un reactor para hidrólisis.

Hidrolizar cada uno de los rastrojos con H_2SO_4 y comparar los rendimientos con los obtenidos con H_3PO_4 .

Verificar la degradación de carbohidratos observada mediante espectroscopia de IR utilizando análisis termogravimétrico.

Estudiar la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados de rastrojo de maíz, determinar la concentración de azúcares, de ácidos orgánicos y H_2S . Ajustar los datos al modelo Gompertz para determinar los parámetros cinéticos.

Obtener hidrógeno a partir de los hidrolizados utilizando cepas termofílicas y en consorcio, comparar los rendimientos con bacterias mesofílicas.

Acoplar la hidrólisis ácida con la fermentación en un proceso continuo y escalar la producción a reactores tipo tanque agitado.

Caracterizar el $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, determinar su pureza y darle una aplicación práctica.

FUENTES CONSULTADAS

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

Arellano Díaz Javier. 2002. Introducción a la Ingeniería Ambiental. *Alfaomega*. 1° Edición. Distrito Federal, México.

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.

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.

Badiei M., Asim N., Jahim Jamilah M. Sopian K. 2013. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. 5th International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering. *Procedia APCBEE*. Vol. 9, 170-174.

Ballesteros L. F., Cerqueira M. A., Teixeira J. A., Mussatto S. I. 2015. Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 127, 347-354.

Brown Ross D., Jurasek Lubo. 1979. Hydrolysis of cellulose. Mechanisms of enzymatic and acid hydrolysis. *Advances in chemistry*. American Chemical Society, Washington, D. C. USA.

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.

Buendía Díaz V. H. 2013. Obtención de azúcares por hidrólisis ácida y ensayos metanogénicos a partir de *Jatropha curcas L.* y *Pennisetum sp.* *Tesis de Licenciatura*. Universidad Veracruzana, México.

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.

Cakir A., Ozmihci S., Kargi F. 2010. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, 13214-13218.

Calero Torres D. A. & Nacimba Tipán C. R. 2011. Generación de gas metano a partir de desechos orgánicos y aplicación en un motor de combustión interna para generación de energía eléctrica. *Tesis de Licenciatura*. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.

Canul Chan Michel de la Cruz. 2010. Estudio de los parámetros de operación de un reactor anaerobio para la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos. *Tesis de Maestría*. Instituto Politécnico Nacional. México.

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.

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.

Chaplin M. F. 1986. Carbohydrate Analysis: A practical approach. *IRL Press*, Oxford, Inglaterra.

Chandolias K., Pardaev S., Taherzadeh M. J. 2016. Biohydrogen and carboxylic acids production from wheat straw hydrolysate. *Bioresource Technology*. Vol. 216, 1093-1097.

Chang A. C. C., Tu Y. H., Huang M. H., Lay C. H., Lin C. Y. 2011. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 36, 14280-14288.

Chayanon Sawatdeenarunat, Surendra K. C., Devin Takara, Hans Oechsner, Samir Kumar. 2014. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*. Article in Press.

Chen C. Y., Lu W. B., Liu C. H., Chang J. S. 2008. Improved phototrophic hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. *Bioresource Technology*. Vol. 99, 3609-3616.

Chen X., Sun Y., Xiu Z., Li X., Zhang D. 2006. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 31, 539-549.

Cheng Chieh-Lun, Lo Yung-Chung, Lee Kuo-Shing, Lee Doo-Jong, Lin Chiu-Yue, Chang Jo-Sgu. 2011. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*. Vol. 102, Issue 18, 8514-8523.

Cheng S. A., Logan B. E. 2007. Sustainable and efficient hydrogen production via electrohydrogenesis. *PNAS*. Vol. 104, 18871-18873.

Cheng X., Liu C. 2011. Hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk by *Clostridium thermocellum*. *Energy Fuels*. Vol. 25, 1714-1720.

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.

Colín-Urieta S., Ma. A. Carcía C., López A P., Rutiaga Q. J. G. 2007. Análisis preliminar de la composición química de la madera de *Cordia eleagnoides* DC. 4to. Congreso Forestal, IV Simposio Internacional sobre técnicas agroforestales, III Congreso Internacional de Jóvenes Investigadores DEFORS 2007. La Habana, Cuba. p. 223.

Cross A. D., Jones R. A. 1969. An introduction to practical Infra-red spectroscopy. *Butterworth & Co*. Tercera Edición, p. 2-5.

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

Datar R., Huang J., Maness P. C., Mohagheghi A., Czernik S., Chornet E. 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, 932-939.

Dong-Hoon Kim, Mi-Sun Kim. 2012. Semi-continuous photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*: Effect on decanting volume ratio. *Bioresource Technology*. Vol. 103, 481-483.

Fan L. T., Gharpuray M. M., Lee Y. H. 1987. Cellulose Hydrolysis. *Springer*, 1° edición, Manhattan, USA.

Fang H. H. P., Zhang T., Liu H. 2002. Microbial diversity of mesophilic hydrogen sludge. *Appl. Microbiol Biotechnol*. Vol. 58, 112-118.

Gadow S. I., Li Yu-You, Liu Yuyu. 2012. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 37, 15465, 15472.

Gámez Sara, González C. J. J., Ramírez J. A., Garrote G., Vázquez M. 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*. Vol. 74, 78-88.

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 and 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.

Gómora Hernández J. C. 2014. Obtención de biohidrógeno y de biometano a partir de residuos orgánicos y comparación de sus rendimientos. *Tesis de Licenciatura*. Instituto Tecnológico de Toluca, Metepec, México.

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.

Hallenbeck P. C., Ghosh D. 2009. Advances in fermentative Biohydrogen production. The way forward?. *Trends Biotechnol.* Vol. 27, 287-297.

Harun M. Y., Radiah A. B. D., Abidin Z. Z., Yunus R. 2011. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresour Technol.* Vol. 102, 5193-5199.

Heneczkowski M., Kopacz M., Nowak D., Kuzniar A. 2001. Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. Vol. 58, 415-420.

Hernández C. C., Pérez C. E., Olea E. H., Saldívar S. O S. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: Tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 10, No. 3, 529-549.

Hniman Adilan, Thong Sompong, Prasertsan Poonsuk. 2011. Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 36, 8785-8793.

Hong Bo, Xue G., Weng L., Guo X. 2012. Pretreatment of moso bamboo with dilute phosphoric acid. *Bioresources*. Vol. 4, 4902-4913.

Howarth Robert. 2009. Methane and Carbon Dioxide Global Warming Potential. (Consultado el 06 de Noviembre de 2014). <http://www.global-warming-forecasts.com/methane-carbon-dioxide.php>.

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.

Ibrahim M., Alaam M., El-Haes H., Jalbout A. F., Leon A. 2006. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Ecl. Quim*. Vol. 31, 15-21.

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>

Ivanova G., Rákhely G., Kovács K. L. 2009. "Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 3659-3670.

Junhua Z., 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. *Open Access Molecules*. Vol. 14, 5027- 5041.

Kadar Z., Vrije T. D., Van Noorden G. E., Budde M. A. W., Szengel Z., Reczey K. 2004. Yields from glucose, xylose and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied Biochem Biotechnol*. Vol. 113, 497-508.

Kalia S., Kaith B. S., Kaur I. 2011. Cellulose Fibers: Bio and Nano Polymer Composites. *Springer*, 1° Edición, India.

Kim D. H., Lee D. Y., Kim M. S. 2011. Enhanced Biohydrogen production from tofu residue by acid/base pretreatment and sewage sludge addition. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 36, 13922-13927.

Kim S. H., Han S. K., Shin H. S. 2004. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, 1607-1616.

Kumar N., Das D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*. Vol. 35, 589-593.

Lee D. Y., Ebie Y., Xu K.Q., Inamori Y., Li Y. Y. 2010. Continuous H₂ and CH₄ production from high solid food waste in the two stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresource Technology*. Vol. 101, 542-547.

Lee Y. W., Chung J. 2010. Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen-methane fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, 11746-11755.

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.

Levin D. B., Carere Carlo R., Cicek N., Sparling R. 2009. Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 7390-7403.

Levin D. B., Islam R., Cicek N., Sparling R. 2006. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, 1496-1503.

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.

LGPGIR. Ley General Para la Prevención y Gestión Integral de los Residuo publicada en el diario oficial de la federación, 8 de Octubre de 2003.

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 S. L., Kuo S. C., Lin J. S., Wang Y. H., Cheng S. S. 2008. Process performance evaluation of intermittent-continuous stirred tank reactor for anaerobic hydrogen fermentation with kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 33, 1522-1531.

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.

Lin P., Whang I., Wu Y., Ren W., Hsiao C., Li S. 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*. Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, 1728-1735.

Liu C. Z. & Cheng X. Y. 2010. Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, 8945-8952.

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 Qiang, Zhang Xiaolei, Yu Lijia, Zhao Aihua, Tai Jun, Liu J., Qian G., Xu Z. Ping. 2011. Fermentative hydrogen production from fresh leachate in batch and continuous bioreactors. *Bioresource Technology*. Vol. 102, 5411-5417.

Lo T., Lu W., Chen C., Chang J. 2010. Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*. Vol. 101, 5885-5891.

Lo Y. C., Bai M. D., Chen W. M., Chang J. S. 2008. Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. *Bioresour Technol*. Vol. 99, 8299-8303.

Lo Y. C., Huang C. Y., Fu T. N., Chen C. Y., Chang J. S. 2009. Fermentative hydrogen production from hydrolyzed cellulosic feedstock prepared with a thermophilic anaerobic bacterial isolate. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 6189-6200.

Lo Y. C., Su Y. C., Cheng C. L., Chang J. S. 2011. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 36, 13955-13963.

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.

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

Manahan Stanley E. 2000. *Environmental Chemistry*. Press LLC. 4° Edición, Estados Unidos de América.

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.

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

Nallathambi Gunaseelan V. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 26, 389-399.

Nanqi Ren, Aijie Wang, Guangli Cao, Jifei Xu, Lingfang Gao. 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances*. Vol. 27, 1051-1060.

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.

Nikonenko N. A., Buslov D. K., Sushko N. I., Zhabankov R. G. 2000. Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkage in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution. *Biopolymers*, Vol. 57, 257-262.

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

OCDE 2014. (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), Municipal Waste, in OCDE Factbook. Economic, Environmental and Social Statistics. Informe publicado en versión electrónica. (Consultado el 06 Noviembre de 2014). <http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/3013081e.pdf?expires=1400151081&id=id&accname=guest&checksum=326EC1E3E8683B8CF9B06A0749265BE0>.

Pachapur V. L., Sarma S. J., Brar S. K., Bihan Y. L., Buelna G., Verma M. 2015. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Bioresour Technol*. Vol 193, 297-306.

Panagiotopoulos I. A., Bakker R. R., Vrije T., Claassen P. A. M., Koukios E. G. 2012. Dilute acid pretreatment of barley Straw for biological hydrogen production using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 37, 11727-11734.

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.

Pattra S., Sangyoka S., Boonmee M., Reungsang A., 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, 5256-5268.

Petersson Anneli, Thomsen Mette H., Nielsen H. H., Thomsen Anne-Belinda. 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 from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 37, 15525- 15532.

Phowan P., Reungsang A., Danvirutai P. 2010. Bio-hydrogen production from cassava pulp hydrolysate using co-culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol*, Vol. 9, 348-354.

Qian Li, Liu C. Z. 2012. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 37, 10648-10654.

Reed Parker T., Izquierdo Javier A., Lynd Lee R. 2014. Cellulose fermentation by *Clostridium thermocellum* and a mixed consortium in an automated repetitive batch reactor. *Bioresource Technology*. Vol. 155, 50-56.

Reith J. H., R.H. Wijffels and H. Barten. 2003. Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production. *Dutch Biological Hydrogen Foundation*. Netherlands.

Ren N. Q., Cao G. L., Wang A. J., Lee D. J., Guo W. Q., Zhu Y. H. 2008. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, 6124-6132.

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.

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.

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.

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 B. C., Bothast R. J. 1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochem Biotechnology*. Vol. 76, 65-77.

Saqib Abdul A. N., Whitney P. J. 2011. Differential behavior of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono and disaccharide sugars. *Biomass & Bioenergy*. Vol. 35, 4748-4750.

Saratale Granesh D., Chen Shing-Der, Lo Y. C., Saratale Rijuta G., Chang Jo-Shu. 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation. A Review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 67, 962-979.

Sarkar N., Aikat K. 2013. Kinetic study of acid hydrolysis of rice straw. *Hindawi ISRN Biotechnology*, Vol. 2013, 1-6.

Schulz H., Baranska M. 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. Vol. 43, 13-25.

SEMARNAT-INE. 2001. Minimización y manejo ambiental de los residuos sólidos en México. *Gaceta Informativa*. México.

Show K. Y., Lee D. J., Chang J. S. 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*. Vol. 102, 8524-8533.

Show K. Y., Zhang Z. P., Lee D. J. 2008. Design of bioreactors for Biohydrogen production. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 67, 941-949.

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 R. K., Mishra S. 2005. Biofuels from biomass. *Offshore World*, 37-50

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.

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.

Solís Segura L. M., López Arriaga J. A. 2003. Principios básicos de contaminación ambiental. *Universidad Autónoma del Estado de México*. 1° Edición.

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

Susilaningsih D., Sirait L. S., Anam K., Habibi M. S., Prasetya B. 2014, Possible application of biohydrogen technologies as electricity sources in Indonesian remote areas. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 39, 19400-19405.

Taherzadeh Mohammad J & Karimi Keikhosro. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 9, 1621-1651.

Tam Anh D. N., Jun Pyo K., Mi Sun K., You Kwan O., Sang Jun Sim. 2008. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *T. maritima* and *T. neapolitana* in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, 1483-1488.

Tarek A. Hamad, Abdulhakim A. Agll, Yousif M. Hamad, Sushrut Bapat, Mathew Thomas, Kevin B. Martin, Sheffield Jonh W. 2014. Hydrogen recovery, cleaning, compression, storage, dispensing, distribution system and end-uses on the university campus from combined heat, hydrogen and power system. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 39, 647-653.

Tchobanoglous George, Kreith Frank. 2002. Handbook of solid waste management. *Mc Graw Hill*. 2° Edición, Colorado, Estados Unidos de América.

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.

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.

Veyna Castañeda Sagrario. 2007. Efecto de control de pH, temperatura y adición de nitrógeno sobre la digestión anaerobia de residuos hortícolas. *Tesis de Maestría*. Instituto Politécnico Nacional. México.

Wang J. Wei W. 2009. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 235-244.

Wang J., Wan W. 2008. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, 799-811.

Weiner Ruth F., Mathews Robin, Peirce Jeffrey, Vesilind P. Arne. 2003. Environmental engineering. *Butterworth Heinemann*, 4° Edición. Estados Unidos de América.

Xin Mei Guo, Eric Trably, Eric Latrille, H elene Carr ere, Jean-Philippe Steyer. 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A Review. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, 10660-10673.

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.

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.

Yoon S. Y., Han S. H., Shin S. J. 2014. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy*, pp 1-6.

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.

ANEXOS

Anexo A. Técnicas analíticas para sólidos

Las determinaciones de humedad, SVT's, holocelulosa, extractivos, lignina y análisis mediante espectroscopia de IR se muestran en el presente apartado.

Anexo A1. Determinación de pH

La determinación de pH en sólidos se realizó conforme a la NMX-AA-25-1984 (SEMARNAT, 2008). Para ello, se mezclaron 5 g de rastrojo seco 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. Se utilizó un potenciómetro marca "Conductronic PC18" con un electrodo de calomel, el cual fue calibrado previamente con buffers de pH 4 y 7. Es necesario mencionar que la determinación se llevó a cabo por duplicado.

Anexo A2. Determinación de humedad

El porcentaje de humedad contenido en los residuos sobrantes de la fermentación en los biorreactores escala laboratorio 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 10 g de muestra sólida previamente homogeneizada. Las muestras se secaron a 45°C por 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 un lapso de 15 minutos, se pesó la muestra y se registró el valor. El procedimiento se repitió hasta alcanzar peso constante en cada una de las muestras. Para el pesado se consideraron los cuatro dígitos de la balanza analítica. El porcentaje de humedad se

determinó mediante el uso de la ecuación A.1, tomando en cuenta que para obtener el valor de G y G₁ se debe restar el peso de la cápsula de aluminio:

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

Dónde:

%H: Porcentaje de humedad

G: Peso de la muestra sólida húmeda en g

G₁: Peso de la muestra sólida seca en g

Anexo A3. Determinación de SVT

El porcentaje de Sólidos Volátiles Totales (SVT) se determinó por duplicado conforme a la técnica 2540G del Standard Methods (APHA, 1998). Para esta determinación se utilizaron las cápsulas con las muestras de los residuos secos (G₁) de la determinación de humedad. Estas cápsulas se introdujeron en la mufla a 550°C durante una hora. Al término de este tiempo, se redujo la temperatura de la mufla mediante su control automático a 300°C, las muestras se transfirieron a la estufa la cual se había estabilizado previamente a 105°C y se les dejó ahí por media hora, finalmente se colocaron en un desecador durante 30 minutos y se pesaron. Las muestras se introdujeron nuevamente en la estufa durante media hora, se enfriaron en el desecador y se pesaron. La metodología se repitió hasta que las muestras alcanzaron un peso constante (G₂). Para determinar el porcentaje de SVT se utilizó la ecuación A.2, tomando en cuenta que para obtener el valor de G₁ y G₂ se debe restar el peso de la cápsula de aluminio.

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

Dónde:

%SVT: Porcentaje de Sólidos Volátiles Totales

G₁: Peso de la muestra seca en g

G₂: Peso del residuo 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 neutros y su eliminación se hizo de acuerdo al 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 hidrolizado y 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 los sifones no presentaron 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.



Se pesó 1 g de la muestra seca libre de extractivos (M_1) 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 75°C 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, la muestra sometida a reacción se filtró en un embudo buchner con papel filtro previamente pesado. El material se lavó con 200 mL de agua caliente (hasta tener color pálido) y se luego con 100 mL de acetona. Con ayuda de pinzas se puso cada filtro en una capsula de aluminio calcinada y pesada previamente (M_2) y se secó durante 3 días a 40°C, posteriormente se colocó dentro de 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.

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

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 agitándole cada 30 minutos. Posteriormente se le adicionaron 100 mL de agua destilada y se puso a hervir durante 5 minutos. Se vertió todo el contenido del vaso en un embudo buchner con papel filtro previamente pesado, lavando con agua destilada hasta la obtención de pH neutro. Con ayuda de pinzas se colocó el papel filtro en una capsula previamente calcinada y pesada (M_2), y se secó a 70°C durante 12 horas. Al término se puso a enfriar en un desecador por 30 minutos y se colocó a peso constante. La ecuación A.6 presenta el cálculo para la determinación del porcentaje de lignina.

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

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 IR

Los sólidos remanentes del proceso de hidrólisis se prepararon de acuerdo a lo establecido por Junhua *et al.*, se secaron a 45°C durante una noche y se trituraron con ayuda de un mortero. Las muestras se analizaron en un espectrómetro Uv-Vis marca “*Varian 640*” utilizando un rango espectral de 500 a 4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} .

Anexo B. Técnicas analíticas para líquidos

Las determinaciones de pH, azúcares reductores y conteo de bacterias 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. La Figura B1 muestra la calibración de dicho potenciómetro a pH 4, realizada de manera previa al análisis de hidrolizados. Para el análisis de pH de los lixiviados provenientes de la fermentación, se utilizó un potenciómetro marca “*Titration Manager TIM 900*”, el cual fue calibrado a pH 4 y 7. Al término del análisis, los lixiviados fueron centrifugados y preparados con ácido fórmico para su conservación. Finalmente se refrigeraron a 4°C.



Figura B1 Potenciómetro “*Conductronic PC18*” calibrado a pH 4

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 B2 muestra la reacción redox llevada a cabo para la cuantificación de azúcares reductores mediante DNS.

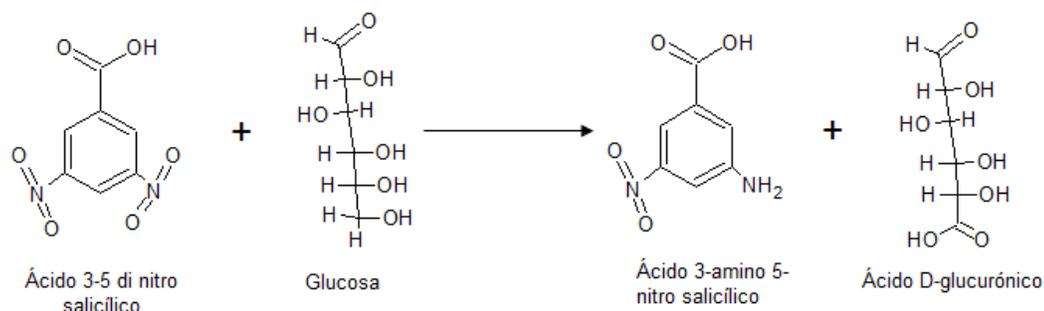


Figura B2 Reducción del ácido 3-5 dinitro salicílico para la cuantificación de azúcares

El reactivo DNS se preparó agregando 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 N. Se adicionó 1 g de ácido dinitro salicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$), 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, manejando así una dilución 1:10. 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. Cada uno de los tubos se colocó 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 presenta en la Figura B3.

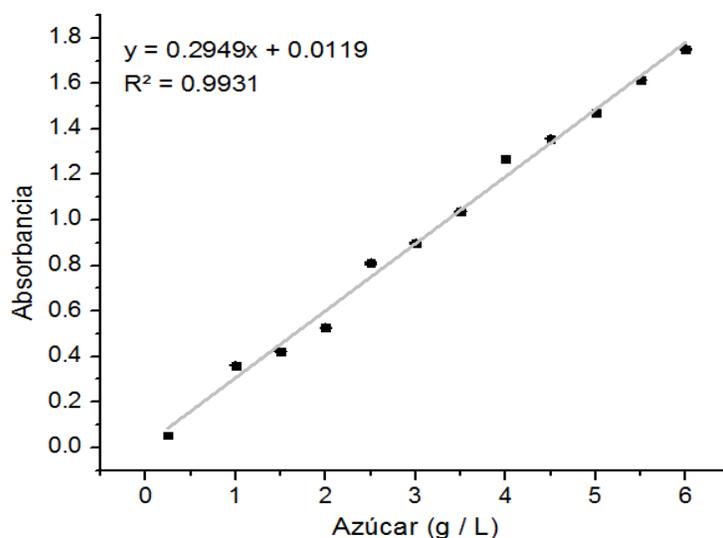


Figura B3 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores

Se prepararon 4 curvas de calibración, 2 de ellas desde 0.025 hasta 0.35 g/L, mientras que las dos restantes desde 0.005 hasta 0.04 mol/L utilizando glucosa y xilosa como azúcares de referencia. Las curvas de calibración se contrastaron entre sí y se determinó la diferencia de medias entre ambos azúcares, mostrando así el efecto del tipo de azúcar sobre la absorbancia. El Anexo C muestra las curvas de calibración, sus respectivos ajustes lineales y el análisis estadístico por t-student.

Anexo B3. 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 mm² 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.

$$\frac{Cel}{mL} = \frac{Cel\ prom}{16} (400 * 50 * 1000) \quad \text{Ec. B.1}$$

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. Curvas de calibración con glucosa y xilosa

Las curvas de calibración empleadas para la determinación de reductores suelen utilizar a la glucosa como azúcar de referencia, sin embargo, en los hidrolizados ácidos existen hexosas y pentosas que de acuerdo a lo reportado por Miller en 1959, dan diferentes índices de coloración una vez terminada la reacción con DNS. En el caso de los disacáridos, la diferencia se atribuye a una hidrólisis parcial que conlleva a la formación de dos moléculas de azúcares reductores, lo cual incrementa la absorbancia (Saqib *et al.*, 2011).

Al utilizar curvas de calibración en g/L puede presentarse un error debido a que la reacción de reducción del DNS es equimolar. La curva de calibración con xilosa en g/L, mostró mayor absorbancia para cada uno de los patrones en comparación con el calibrado de la glucosa (Figura C1a), este comportamiento se atribuye a que la xilosa al ser una pentosa, posee un peso molecular menor al de la glucosa que es una hexosa, lo cual incrementa la cantidad de moles que interaccionan con el reactivo DNS. La Figura C1 b muestra el comportamiento de las curvas de calibración en mol/L, de las cuales, el calibrado con glucosa mostró mayor absorbancia. Este comportamiento va de la mano con lo reportado por Saqib *et al.* (2011), quienes demostraron que la absorbancia de la glucosa resulta superior a la observada en fructosa y galactosa, ambas azúcares pertenecientes al grupo de las hexosas.

Las curvas de calibración en g/L y en mol/L resultaron similares entre sí, estas se muestran en la Figura C1 y se observa los ajustes lineales con sus respectivos coeficientes de correlación, el mejor se obtuvo para la xilosa en mol/L.

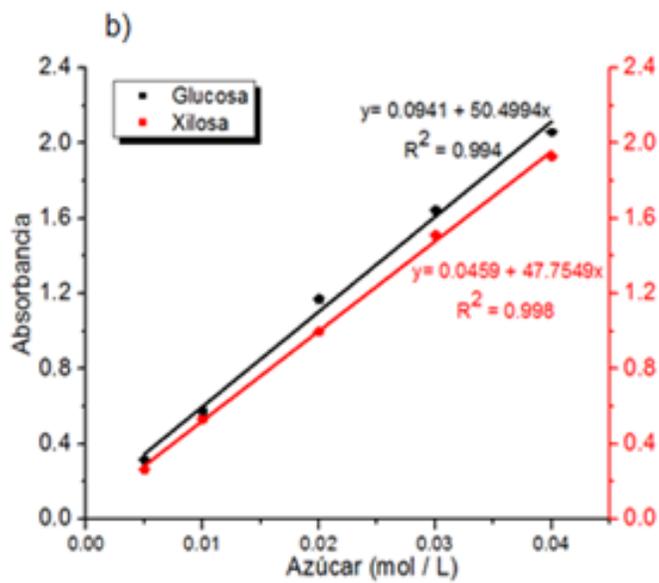
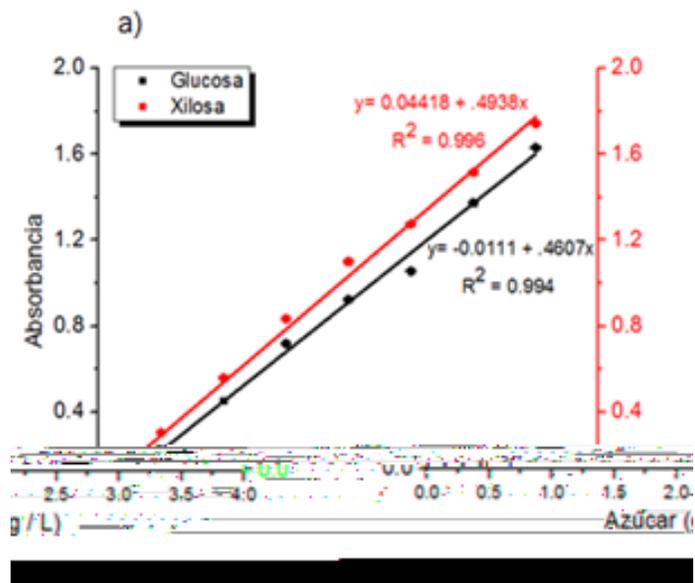


Figura C1 Curvas de calibración en a) g / L y b) mol / L

Anexo D. Análisis por cromatografía de gases

Para la caracterización de biogás y cuantificación de biohidrógeno se empleó el cromatografo de gases marca “*Varian 3600*” ubicado en la Gerencia de Ciencias Básicas del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). La Figura D1 presenta el cromatografo de gases utilizado durante el trabajo de investigación, el cual 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 cromatografo es automático y ajustado a 250 μ L, mientras que el gas de arrastre utilizado en todas las determinaciones cromatográficas fue Argón (Ar) grado cromatográfico. Las temperaturas a las cuales operó el equipo fueron: 100°C temperatura de columna; 120°C temperatura de inyector y detector.



Figura D1 Cromatografo utilizado para la determinación de biohidrógeno

Las curvas de calibración se prepararon 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 cromatografo 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 utilizada para el análisis de H_2 se muestra en la Figura D2.

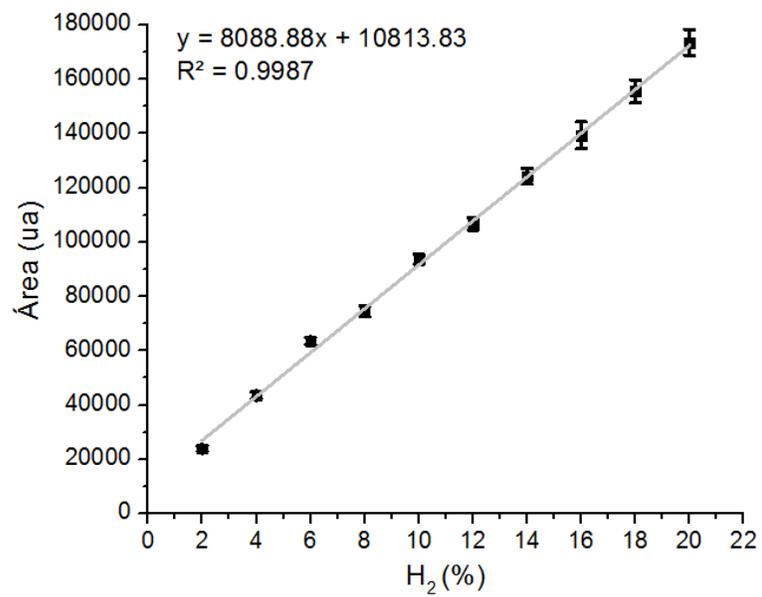


Figura D2 Curva de calibración empleada en el análisis de H₂

Anexo E. Recuperación de azúcares a partir de olote de maíz en un proceso de hidrólisis realizado durante 5 horas

Tanto en el experimento realizado a 3% como a 7% H_3PO_4 , el valor mayor del CSF se observó a los 300 minutos de tiempo de contacto, el coeficiente más alto observado a 7% alcanzó un valor de 1.6, el cual resultó superior al determinado a 3% (1.232). Tal y como se observa en la Figura E, el incremento de los CSF en función del tiempo de contacto se ajusta adecuadamente a un modelo logarítmico con coeficientes R^2 de 0.997 y 0.995 para los experimentos a 3% y 7% H_3PO_4 respectivamente.

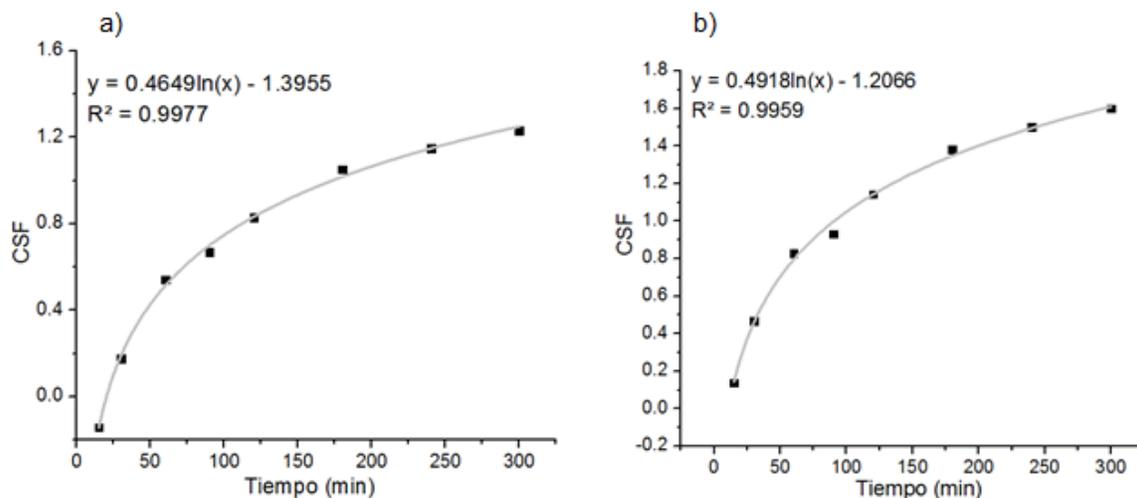


Figura E1. Ajuste logarítmico de CSF para los experimentos de hidrólisis a 5 horas con: a) 3% y b) 7%v H_3PO_4

El rendimiento máximo de recuperación se observó en el experimento realizado con 7% H_3PO_4 después de 300 minutos, generando un total de 1.25 g azúcar / 3 g olote, rendimiento que corresponde a una conversión de 41.7% con respecto a la biomasa inicial y a una conversión holocelulosa-sacárido de 63.9%. Por otra parte, la máxima producción de azúcares en el experimento con 3% H_3PO_4 fue de 0.89 g azúcar / 3 g olote, lo cual corresponde a una conversión de 45.36% con respecto a la holocelulosa.

A fin de determinar los parámetros cinéticos de ambos procesos, se determinó el contenido inicial de holocelulosa y se utilizó el modelo de Saeman. Los ajustes determinados se presentan en la Figura E2, mientras que los datos estadísticos y cinéticos obtenidos se resumen en la Tabla E1.

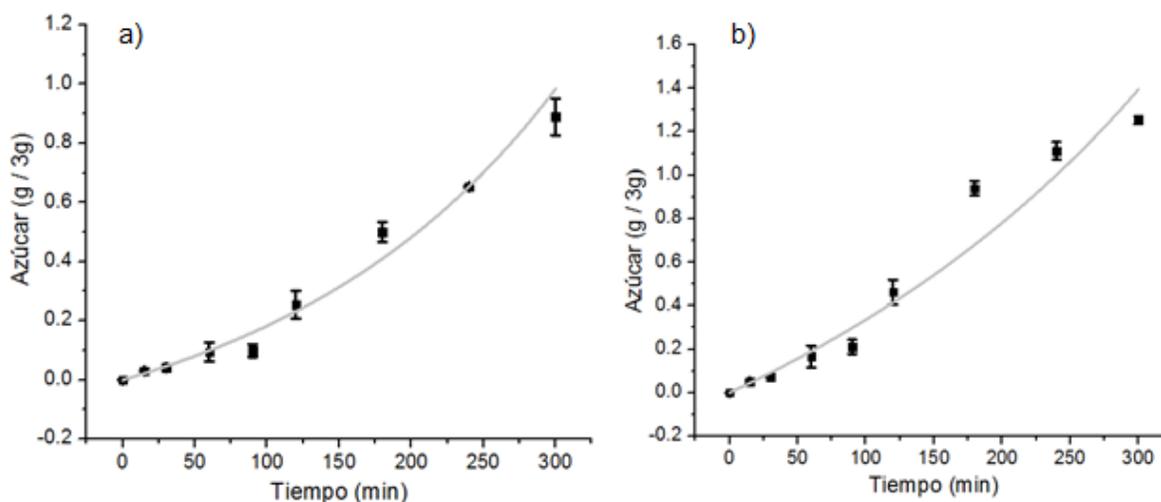


Figura E2. Modelo cinético de Saeman en los experimentos realizados a 5 horas con a) 3%v y b) 7%v H₃PO₄

Tabla E1. Datos cinéticos y estadísticos obtenidos con el modelo de Saeman para la producción de azúcares a partir de olote de maíz en una hidrólisis de 5 horas

%v ácido	Constantes cinéticas (min ⁻¹)		Desv. Prom (cm ⁻¹)		Error %		R ²
	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂	
3	7.28*10 ⁻⁴	-5.37*10 ⁻³	6.48*10 ⁻⁵	5.67*10 ⁻⁴	8.9	10.5	0.998
7	1.51*10 ⁻³	-3.83*10 ⁻³	2.66*10 ⁻⁴	1.1*10 ⁻⁴	17.6	2.87	0.960