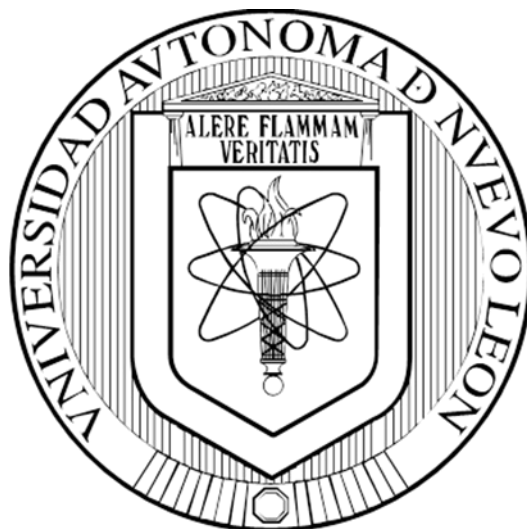


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**Evaluación de bagazo de *Agave tequilana* Weber variedad azul y de *Opuntia ficus indica* en pretratamientos químicos y enzimáticos para su aplicación en la producción de ácido succínico**

**POR**

**ABIMAEI IVÁN ÁVILA LARA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS SUSTENTABLES**

**MARZO, 2019**

## Índice

Agradecimientos.....	9
Abreviaturas .....	10
Símbolos .....	11
Resumen.....	12
1. Introducción .....	13
2. Antecedentes.....	15
2.1. La biomasa en México.....	15
2.2. Bioproductos y bioprocesos.....	15
2.3. Biorrefinerías .....	16
2.3.1. Agaves.....	18
2.3.2. <i>Agave tequilana</i> weber variedad azul .....	19
2.3.3. Bagazo de agave .....	19
2.3.4. <i>Opuntia ficus indica</i> .....	20
2.4. Oxalato de calcio .....	22
2.5. Pretratamientos de la biomasa.....	25
2.5.1. Pretratamiento físico.....	25
2.5.2. Pretratamientos ácido.....	26
2.5.3. Pretratamientos enzimático .....	27
2.5.3.1. Enzimas.....	29
2.5.3.1.1. Celulasas y xilanasas.....	30
2.6. Ácido succínico: Producción y usos. ....	31
2.7. Microorganismos productores de ácido succínico .....	33
2.7.1. Mecanismos de conversión hacia la producción de ácido succínico .	37
3. Justificación .....	41
4. Hipótesis .....	42
5. Objetivos.....	42
6. Metodología .....	43
6.1. Plan de trabajo .....	43

6.2. Actividad 1. Técnicas de caracterización de sustrato para la producción de ácido succínico.....	45
6.2.1. Propósito .....	45
6.2.2. Diseño de experimentos .....	45
6.2.3. Programa de seguimiento y análisis .....	45
6.2.4. Métodos y procedimientos .....	46
6.3. Actividad 2. Remoción y recuperación de oxalato de calcio en BAg y Op... 51	
6.3.1. Propósito .....	51
6.3.2. Diseño de experimentos .....	51
6.3.3. Programa de seguimiento y análisis .....	51
6.3.4. Métodos y procedimientos .....	52
6.4. Actividad 3A. Pretratamiento ácido para BAg y Op .....	54
6.4.1. Propósito .....	54
6.4.2. Diseño de experimentos .....	54
6.4.3. Programa de seguimiento y análisis .....	58
6.4.4. Métodos y procedimientos .....	58
6.5. Actividad 3B. Hidrólisis enzimática para BAg y Op.....	59
6.5.1. Propósito .....	59
6.5.2. Diseño de experimentos .....	59
6.5.3. Programa de seguimiento y análisis .....	59
6.5.4. Métodos y procedimientos .....	60
6.6. Actividad 4. Producción de ácido succínico a partir de los hidrolizados del proceso.....	62
6.6.1. Propósito .....	62
6.6.2. Diseño de experimentos .....	62
6.6.3. Programa de seguimiento y análisis .....	63
6.6.4. Métodos y procedimientos .....	63
7. Resultados.....	66
7.1. Actividad 1. Técnicas de caracterización de sustrato para la producción de ácido succínico.....	66
7.2. Actividad 2. Remoción y recuperación de oxalato de calcio en BAg y Op... 72	

7.3. Actividad 3A. Pretratamiento ácido para BAg y Op. ....	75
7.4. Actividad 3B. Hidrólisis enzimática para BAg y Op.....	86
7.5. Actividad 4. Producción de ácido succínico a partir de los hidrolizados del proceso.....	91
8. Conclusión .....	98
9. Referencias bibliográficas .....	99

## Tablas

Tabla 2. Composición química de <i>Opuntia</i> .....	21
Tabla 1. Composición del agave .....	20
Tabla 3. Propiedades químicas y físicas del oxalato de calcio (Bula García, 2011).....	23
Tabla 4. Parámetros de hidrólisis enzimática (Ávila-Lara <i>et al.</i> , 2015; Escamilla-Alvarado <i>et al.</i> , 2015; Talebnia <i>et al.</i> , 2010).....	27
Tabla 5. Especies microbianas productoras de ácido succínico. ....	33
Tabla 6. Diferentes especies de microorganismos productores de ácido succínico (Axelsson <i>et al.</i> , 2012).....	35
Tabla 7. Parámetro de análisis y caracterización .....	45
Tabla 8. Programa de seguimiento y análisis.....	51
Tabla 9. Condiciones experimentales del diseño factorial $2^3$ .....	54
Tabla 10. Combinaciones del diseño de experimentos $2^3$ .....	55
Tabla 11. Factores y condiciones para el diseño central compuesto $2^2$ .....	56
Tabla 12. Diseño central compuesto $2^2$ .....	56
Tabla 13. Factores y condiciones de la trayectoria de máximo ascenso.....	57
Tabla 14. Factores y condiciones de la hidrólisis ácida diluída para BAg .....	57
Tabla 15. Programa de seguimiento y análisis para la etapa de hidrólisis ácida... 58	
Tabla 16. Ensayos de experimentos para los tipos de biomasa.....	59
Tabla 17. Programa de seguimiento y análisis para la etapa de sacarificación .... 59	
Tabla 18. Diseño de experimentos para la producción de ácido succínico a partir de hidrólizados de Op y BAg .....	62
Tabla 19. Programa de seguimiento y análisis.....	63
Tabla 20. Características principales de los sustratos .....	66
Tabla 21. Análisis elemental C, H, N, S, O.....	66
Tabla 22. Evaluación de parámetros del proceso de Remoxcal.....	74
Tabla 23. Tabla de resultados a los ensayos iniciales de hidrólisis ácida para BAg y Op.....	75
Tabla 24. Combinaciones del diseño de experimentos $2^3$ y su respuesta.....	77
Tabla 25. Análisis de varianza del DE $2^3$ .....	78

Tabla 26. Matriz de diseño experimental de DCC 2 <sup>2</sup> y respuesta.....	81
Tabla 27. Análisis de varianza del DEO 2 <sup>3</sup> .....	82
Tabla 28. Corridas experimentales de la trayectoria de máximo ascenso con sus respuestas.....	85
Tabla 29. Actividades enzimáticas. ....	86
Tabla 30. Concentración inicial y final de sustrato de las fermentaciones. ....	95

## Figuras

Figura 1. Disponibilidad y uso de las ha de en México Opuntia .....	22
Figura 2. Estructura química del oxalato de calcio. ....	23
Figura 3. Esquema de la hidrólisis de la celulosa por complejos de celulasas (imagen de Biely 1993, modificada de (Escamilla-Avarado, 2009)). ....	28
Figura 4. Descripción catalítica de las enzimas.....	29
Figura 5. Representación del sustrato que se une al sitio activo.....	30
Figura 6. Fórmula química del ácido succínico. ....	31
Figura 7. Vías metabólicas de Actinobacillus succinogenes y posibles transportadores de azúcares (Pateraki et al., 2016).....	38
Figura 8. Vía de producción de ácido succínico por A. Succinogenes simplificada. 40	
Figura 9. Diagrama de flujo del plan de trabajo.....	43
Figura 10. Rutas de tratamiento para la producción de ácido succínico .....	44
Figura 11. Curvas de TGA de muestras seleccionadas pretratadas y no tratadas	69
Figura 12. Difractograma de rayos X A) BAg, B) Op .....	71
Figura 13. Difractograma de Op y BAg en proceso de Remoxcal. ....	72
Figura 14. Sólido cristalino rico en oxalato de calcio. ....	73
Figura 15. Difractograma del sólido recuperado.....	73
Figura 16. Gráfico de proporción de monosacáridos en etapa inicial de hidrólisis ácida.....	76
Figura 17. Superficies de respuesta A) carga de sólidos contra tiempo, B) tiempo contra concentración de ácido, C) carga de sólidos contra concentración.....	80
Figura 18. Diagrama de superficie de respuesta que muestra los efectos de la carga de sólidos y la concentración de ácido .....	83
Figura 19. Trayectoria de máximo ascenso de la hidrólisis ácida para Op en función a la producción y rendimiento de azúcares.....	84
Figuras 20. Dinámica de producción de azúcares de (A) BAg y (B) Op.....	87
Figura 21. Producción de azúcares reductores ácidos y enzimáticos a partir de material crudo.....	88
Figura 22. Efecto de la remoción de oxalato de calcio en la producción de azúcares enzimáticos.....	89

Figura 23. Rendimiento acumulado A) Op y B) BAg .....	90
Figura 24. Crecimiento de <i>A. succinogenes</i> A) 24 h, B) 72 h.....	91
Figura 25. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares para inóculo de fermentaciones.....	92
Figura 26. Dinámica de producción de ácido succínico a partir de hidrolizados de A) Op y B) BAg.....	94



## **Agradecimientos**

*Al Dr. Carlos Escamilla Alvarado por ser excelente persona, docente y tutor. Por todo lo enseñado y por la dirección del proyecto.*

*Al Dr. José Antonio Pérez Pimienta por todos los conocimientos previos al trabajo, por la constancia y aportaciones así como en la dirección del proyecto.*

*Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo por la donación de la cepa de *A. succinogenes*, los reactivos y material del laboratorio 33 así como por su invaluable asesoramiento durante la estancia en el CINVESTAV.*

*Dra. Teresa Ponce Noyola por el préstamo de equipos e instalaciones del laboratorio 17 en el Departamento de Biotecnología en el CINVESTAV.*

*A los miembros del comité tutorial: Dr José Julián Cano Gómez, Dra. María Mónica Alcalá Rodríguez, Dr José Rubén Morones Ramírez por sus valiosos aportes en la realización del proyecto.*

*M. en C. Odilia Pérez Avalos por la atenta asesoría y conocimientos brindados en las mediciones por HPLC.*

*A la Maestra Elvira Ríos Leal, profesora del Cinvestav, por el apoyo en la realización de los análisis de monómeros e inhibidores.*

*Al Dr. Cuauhtemoc Ulises Moreno Medina, profesor investigador del ITD, por el apoyo con los análisis elementales CHON.*

*A los estudiantes de servicio social, quienes colaboraron en la fase experimental del proyecto de maestría.*

*Al CONACYT, por el apoyo de manutención brindado durante el tiempo de estudio.*

*A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por las instalaciones que permitieron el desarrollo experimental del proyecto.*

## **Abreviaturas**

ACT	Agar de caldo de soya tripticaseíán
BAG	Bagazo de agave
Bh	Base húmeda
Bs	Base seca
CST	Caldo de soya tripticaseína
DE	Diseño de experimentos
FPU	Unidades de papel filtro
HA	Hidrólisis ácida
M.I	Medio inclinado
M.P	Medio de producción
Op	Opuntia
Oxcal	Oxalato de calcio
Remoxcal	Remoción de oxalato de calcio
SE	Sacarificación enzimática
ST	Sólidos totales
TMA	Trayectoria de máximo ascenso
UI	Unidades internacional
Y	Rendimiento

## **Símbolos**

$\beta 1$	Biomasa cruda
$\beta 2$	Biomasa HA
$\beta 3$	Biomasa Remoxcal
$\beta 4$	Biomasa Remoxcal + HA
$\gamma 0$	Fracción líquida de sustrato SE
$\gamma 1$	Fracción líquida HA
$\gamma 2$	Fracción líquida de sustrato HA + SE
$\gamma 3$	Fracción líquida de sustrato Remoxcal + SE
$\gamma 4$	Fracción líquida de sustrato Remoxcal + HA + SE

## Resumen

En esta investigación se realizó una evaluación del bagazo de agave (BAg) y de *Opuntia ficus indica* (Op) en pretratamientos químicos y enzimáticos para su aplicación en la producción de ácido succínico. La metodología se basó en 4 actividades principales: Técnicas de caracterización de BAg y Op para la producción de ácido succínico, remoción y recuperación del oxalato de calcio, pretratamiento ácido en BAg y Op, hidrólisis enzimática en BAg y Op y producción de ácido succínico.

En la caracterización de los sustratos se encontró alrededor del 94 y 77% de materia orgánica volátil para BAg y Op respectivamente, material susceptible a biotransformación. Se realizó una remoción de oxalato de calcio en ambos materiales evaluando su remoción por difracción de rayos X y cuantificando el oxalato de los mismos encontrado 1 y 5% de oxalato total. La hidrólisis ácida de BAg se realizó al 2.1%p/p ácido, 33.8 min como tiempo de reacción y una carga de sólidos de 8.5%p/p, evaluando su producción de azúcares, mientras que para Op se realizó una serie de diseños experimentales: un factorial  $2^3$ , un diseño central compuesto  $2^2$  para encontrar una posible región de optimización y una trayectoria de máximo ascenso evaluando la carga de sólidos, concentración de ácido y tiempo de reacción la respuesta a todos los diseños fue la producción de azúcares, encontrando las mejores condiciones de hidrólisis concentración de ácido 4.4% p/p, tiempo 33.8 min, carga de sólidos 24 % p/p. Se realizó una hidrólisis ácida a los materiales sin oxalato de calcio como pretratamiento de la biomasa para su sacarificación enzimática con las condiciones ya encontradas cuantificando azúcares a los hidrólizados ácidos como posible sustrato de fermentación pero la concentración de azúcares fue muy poca (2 g/L para BAg y 3 g/L Op) por lo que se descargó esa posibilidad, empleando esa fracción líquida para la recuperación de oxalato, obteniendo un sólido negro cristalino caracterizándolo por difracción de rayos X para comprobar la presencia de oxalato de calcio.

El pretratamiento enzimático se realizó a todas las biomásas obtenida a partir de los pretratamientos, se evaluó un diseño experimental factorial general 2 x 4 encontrando producciones máximas de azúcares de 15 g/L para BAg y 17 g/L para Op.

Para la producción de ácido succínico se evaluó un diseño factorial general 2 x 5, evaluando los hidrolizados ácidos y enzimáticos de ambos materiales teniendo producciones máximas de 3 g/L para BAg y de 6 g/L para Op.

Comparando ambos sustratos podemos concluir que Op es mejor materia prima de producción de azúcares y de ácido succínico que BAg.

## **1. Introducción**

En el 2016 el laboratorio nacional de energías renovables de Denver, Colorado da a conocer un listado de compuestos químicos con alto potencial de producción a partir de biomasa, destacando el ácido succínico por sus proyecciones mundiales de producción de 400,000 toneladas anuales (Bidy et al., 2016). El ácido succínico es una excelente alternativa para la generación de polímeros biodegradables por sus propiedades químicas ya que sirve como intermediario a compuestos con propiedades termoplásticas y biodegradables tal como el succinato de polibutileno o Bionelle, dichos compuestos han estimulado la producción de ácido succínico (Song *et al.*, 2007). El ácido succínico se produce comercialmente a partir de productos derivados del petróleo específicamente del gas licuado de petróleo, a través del anhídrido maleico. Es un intermediario importante en la producción de antisépticos, cosméticos, fármacos, solventes, resinas sintéticas, herbicida, fungicidas, tintas, detergentes y estimulantes de crecimiento para plantas y animales (Chen *et al.*, 2011). Sin embargo, el convertir el anhídrido maleico en ácido succínico ha limitado el uso de este compuesto (Lee *et al.*, 1999; Song & Lee, 2006). Por lo que las preocupaciones ambiental y económicas han generado la estimulación de producción a partir de fuentes renovables como es la fermentación bacteriana (McConn & Nakata, 2004; Urbance *et al.*, 2004). Por medio de microorganismos con alto potencial de

producción como: *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* y *Actinobacillus succinogenes* (Chen *et al.*, 2011). *Actinobacillus succinogenes* tiene características interesantes como la asimilación de una gran variedad de sustratos como fuente de energía (azúcares de 6 C, 5 C y glicero) que hacen que este microorganismo sea adecuado para la producción de altas concentraciones de ácido succínico, debido a que puede asimilar una amplia gama de carbohidratos como fuente de energía, teniendo como producto principal al ácido succínico durante la fermentación (Guettler *et al.*, 1999).

Hidrólizados de materiales vegetales son una opción de fuente de energía para la producción de este compuesto ya que estos materiales son abundantes y la mayoría de estos no compiten con cultivos alimenticios ya que los sectores industrial, agrícola y actividades domésticas así como comerciales son los principales generadores de estos residuos tales como la paja de trigo y de avena, bagazo de agave y de caña, residuos sólidos urbanos entre otros (Corona-González *et al.*, 2016).

La biomasa es una materia prima que crece en tierras áridas o semiáridas como los *Agave* y *Opuntia ficus-indica* ya que tienen una tolerancia a medios de poca humedad, son adaptables a diferentes tipos de climas y requieren de pocos nutrientes y a su vez no compiten con cultivos alimenticios (Zheng *et al.*, 2013). Su composición y características dependen de su origen y procesamiento (Ríos-Badrán *et al.*, 2017), esta compuestas por celulosa, hemicelulosa y lignina (Contreras-Padilla *et al.*, 2011), tienen presencia de oxalato de calcio, el cual tiene funciones en las plantas como regulador del calcio permitiendo la protección de las plantas y destoxificación (por ejemplo de metales pesados o ácido oxálico), permitiendo el equilibrio iónico y ayuda a la rigidez e incluso a la captación de luz y su reflexión. Es un compuesto que también tiene valor comercial por su gama de aplicaciones como insecticida natural, abrillantador de metales, antimicrobiano natural, agente blanqueador, recuperador de suelo, etc. (Judprasong *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Razón por lo que estos materiales son atractivos para la generación de bioproductos como sustitutos de productos provenientes de fuentes

no renovable tales como bioetanol, hidrogeno o químicos con aplicaciones industriales importantes (Khan *et al.*, 2016).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. La biomasa en México**

México cuenta con  $1.96 \times 10^6$  de  $\text{km}^2$  de extensión territorial, es un país con una cantidad muy diversa de materiales vegetales y especies nativas que son endémicas del territorio mexicano, con alto aprovechamiento para la obtención de biomasa como residuos forestales, papel usado, residuos sólidos urbanos, bagazo de agave y cultivos como *Opuntia*. A medida que pasan los años la biomasa va aumentando, lo que da paso a realizar estimaciones de esta así como los flujos de dióxido de carbono que se puedan generar en base a su generación así como la asimilación de estas como materia prima a posibles biorrefinerías convirtiendo la biomasa a bioproductos de interés y de valor agregado (Press, 2004).

### **2.2. Bioproductos y bioprocesos**

Los bioproductos son un componente básico de los sistemas sustentables dentro de los cuales se pueden producir diversos biocombustibles y bioquímicos a partir de biomasa como por ejemplo: alcoholes que funcionan como combustibles, ácidos orgánicos, biogás, polímeros y productos químicos en general (Axelsson *et al.*, 2012). Tienen una contribución en la reducción de insumos, mejorando la calidad y la cantidad de los recursos así como asegurar la inocuidad de los mismos.

Su producción es a partir de la microbiología industrial, combinada con los principios de la ingeniería química y mecánica, bioquímica y biológica dando origen a los bioprocesos siendo estos una tecnología nueva, verde y sustentable, integrando un conjunto de técnicas que emplea organismos vivos para obtener o modificar diferentes productos basados en la acción de microorganismos como agentes transformadores dentro de sistemas productivos a nivel industrial dando paso a la generación de biorrefinerías.

### **2.3. Biorrefinerías**

Las biorrefinerías son instalaciones en donde se busca la obtención de biocombustibles, energía y bioproductos a partir de biomasa como materia prima. Se encuentran compuestas por diferentes tecnologías de transformación de biomasa integrada en una plataforma que varía dependiendo del tipo de tecnología empleada por ejemplo: una primera plataforma está basada en la transformación biológica de la biomasa y la segunda plataforma está basada en procesos termoquímicos de transformación (NREL 2008). Por lo tanto, es posible el procesado de aceites vegetales, azúcares, granos, biomasa para transformarlas y obtener bioproductos sustentables como productos químicos, combustibles, calor y electricidad.

Las biorrefinerías pueden ser clasificadas en:

- Primera generación.- consisten en el uso de biomasa de cultivos, por ejemplo: maíz, soya y caña de azúcar.
- Segunda generación.- consisten en el uso de una variedad de materias primas, desde materiales lignocelulósicos hasta desechos sólidos municipales por ejemplo: tallos de maíz bagazo de agave, de caña, paja de trigo, etc.
- Tercera generación.- consiste en el uso de biomasa proveniente de algas, mejorando la producción de combustibles, pero también mejorando los procesos de selección de materia prima.
- Cuarta generación.- Plantas relacionadas con la tecnología que combina materias primas genéticamente modificadas.

Las biorrefinerías constan de una serie de etapas con diversos pretratamientos como: físicos, químicos o biológicos, una etapa de ejecución del bioproceso, y una última de purificación y separación (Fernando *et al.*, 2006; Kokossis & Yang, 2010). Para el desarrollo de biorrefinerías económicamente viables es imprescindible el uso de biomasa en la mayor medida posible, es decir biorecursos de bajo valor que sirve para aplicar combinaciones más eficientes en el proceso



de materia prima/conversión cuyo proceso deberá permitir la generación de bioenergía y bioproductos con un valor económico mayor al de la materia prima utilizada.

Los sustratos o biomásas que pueden llegar a ser empleadas para un enfoque de biorrefinerías son (Budzianowski, 2017):

- Biomasa de algas: Adecuadas para las biorrefinerías y generación de bioproductos de valor agregado. Comprenden a la generación de bioproductos valiosos. Es adecuada para el proceso de aguas abajo en la producción de bioenergía. La mayoría de los bioproductos básicos y valiosos que son producidos a base de algas incluyen pigmentos, lípidos, azúcares y minerales.
- Aceites y grasas vegetales: Sustratos adecuados como fuentes para la generación de biopolímeros, biocosméticos y bionutraceutivos acoplados a biocombustibles, son productos de alto valor. La obtención de estos bioproductos se puede derivar de plantas muy específicas que comprenden compuestos complejos y concentrados raros por ejemplo ácidos pelargónicos y azelaico compuestos extraídos del cardo.
- Biomasa: La biomasa es relativamente barata y se puede cultivar en tierras marginales sin competencia con la producción de alimentos. Se componen de celulosa que comprende principalmente hexosas y hemicelulosa que implican principalmente pentosas y lignina que es una estructura polimérica de diversos compuestos aromáticos. La ingeniería genérica apoya al desarrollo de variedades de árboles y la hierba con mayor tasa de producción y estructuras químicas a medida que mejora la economía y la sostenibilidad de procesamiento de lignocelulosa en bioproductos de alto valor y bioenergía.

### **2.3.1. Agaves**

Los agaves son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobre pasa unos centímetros del suelo. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa; su forma varía de lineal a ovalada. Las especies más pequeñas no sobrepasan veinte gramos de peso, mientras que las de los magueyes pulqueros son las más grandes del género, llegando a pesar más de treinta kilos cada una. El número de hojas varía, de cinco a diez o de 150 hasta 200 dependiendo de la variedad (García-Herrera *et al.*, 2010). Los agaves poseen características fisiológicas y morfológicas que les confieren una notable capacidad de adaptación a los ambientes más ostiles en los cuales se desarrollan y se multiplican fácilmente, proporcionando una productividad más alta que muchas de las plantas cultivadas en condiciones controladas. Pueden encontrarse en gran diversidad de hábitats, desde los valles y planicies hasta cerros y laderas pedregosas, incluyendo lugares montañosos de gran altitud. Se desarrollan mejor tanto a nivel individual como poblacional, sobre planicies extensas con suelos aluviales, de profundidad y textura medias y de un pH neutro a ligeramente alcalino (García-Herrera *et al.*, 2010).

Existe una variedad de agave muy peculiar en México, cuya producción abunda principalmente en el municipio de Tequila, Jalisco, recibe el nombre de *Agave tequilana* Weber variedad azul, dicha especie es el único agave que goza de propiedades que son exclusivas en la producción de tequila. Se caracteriza por ser una planta carnosa en forma de roseta fibrosa y de color azul o verde grisáceo, originado por un alto contenido de ceras, las cuales impiden que la planta pierda agua. Tiene hojas rígidas, con espinas, almacena inulina en el tallo y es rica en fructosa (García-Herrera *et al.*, 2010).

### **2.3.2. Agave *tequilana* weber variedad azul**

El *Agave tequilana* variedad azul es también conocido como maguey. El 75% de las especies que se encuentran en el continente americano se encuentran en México, de las cuales el 55% son endémicas (García-Herrera *et al.*, 2010). Este 55% de especies están divididas en dos géneros *Littae* y *Agave*, existiendo 82 especies de agaves donde destaca el *Agave tequilana* variedad azul por sus usos en la industria tequilera.

El *Agave tequilana* variedad azul es una especie monocárpica ya que florece solamente una vez en sus vida y posteriormente muere. Tiene una forma de roseta formada por sus hojas (pencas) las cuales son verdes, gruesas y carnosas siendo afiladas en su punta. Es adaptable a condiciones muy adversas como cerros, laderas o montañas de gran altitud (García-Herrera *et al.*, 2010). Su producción es abundante en zonas áridas y semiáridas, han desarrollado mecanismos bioquímicos y biofísicos a niveles celular y estructural para su sobrevivencia. Sus cultivos en México son principalmente en: Aguascalientes, Baja California Norte, Sur, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (SIAP 2015). El *Agave* producido de siembra en el 2015 fue de 108,119.08 hectáreas totales, de las cuales 67,060.88 corresponden a Jalisco, siendo el estado con mayor productor de *Agave tequilana* variedad azul para la industria del tequila (SIAP 2015).

### **2.3.3. Bagazo de agave**

El bagazo de agave es la fibra residual que queda después de cocinar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña del *Agave tequilana* variedad azul. Este subproducto representa el 40% del peso de la planta cosechada. Durante el 2016 se produjo aproximada  $1.12 \text{ kg} \times 10^8$  por lo que se generan grandes volúmenes de este desecho y su disposición se ha vuelto un problema ambiental y económico (Ávila-Lara *et al.*, 2015; García *et al.*, 2005; Pérez-Pimienta *et al.*, 2013).

El bagazo de agave tequilero está formado por fibras gruesas de 10 a 12 cm de largo (García *et al.*, 2005) compuestas de celulosa, hemicelulosa y lignina principalmente (Tabla 1).

**Tabla 1. Composición del agave**

<b>Análisis</b>	<b>Valor</b>	<b>Referencia</b>
<b>Humedad (%)</b>	71	1
<b>pH</b>	5.4	1
<b>Cenizas (%)</b>	8.8	1
<b>Nitrógeno total Kjeldahl (%)</b>	0.53	1
<b>Relación C:N</b>	95.5	1
<b>Hemicelulosa (%)</b>	22.8	2
<b>Celulosa (%)</b>	26.0	2
<b>Lignina (%)</b>	13.8	2
<b>Extractivos (%)</b>	29.0	2

(% fracción másica de material seco); (<sup>1</sup>Nacional *et al.* 2006; Yang *et al.* 2015<sup>2</sup>)

#### **2.3.4. *Opuntia ficus indica***

Las especies del genero *Opuntia*, pertenece a la familia de la Cactaceae, se caracteriza por presentar cladodios verdes encadenados, en forma de raqueta y aréolas con glóquidas (espinas). *Opuntia ficus indica* es una especie nativa de México conocida coloquialmente como nopal. Tiene una capacidad estructural de se adapta a la absorción y retención de agua (Medina *et al.*, 2007; Pérez de Paz & Medina, 1998). Su cultivo es de manera extensiva e intensiva debido a su amplia tolerancia a las variaciones de temperatura y precipitación pluvial, tiene una alta eficiencia productiva, un rápido crecimiento a bajos requerimientos de insumos, tiene una gran afinidad por los suelos derivados de caliza, aunque también se desarrollan sobre los de origen ígneo, por lo que constituye una opción energética y generadora de biomasa para la producción de bioproductos.

*Opuntia ficus indica* ha sido utilizada para varios propósitos como para la producción de ácido carmínico, se emplea como alimento debido a sus

propiedades funcionales, se emplea en la producción de tuna, funge como forraje, entre otros usos. En la medicina popular se utiliza como medicamento antidiabético (Pérez de Paz & Medina, 1998) mientras que estudios recientes indican que tiene efectos diuréticos y antagónicos así como antiinflamatorio y analgésico (Galati *et al.*, 2002), aplicaciones recientes han empleado *Opuntia* para la generación de biogás obteniendo energía sustentable, limpia y de calidad (Valdez *et al.*, 2008). La Tabla 2 muestra la composición de *Opuntia ficus indica*.

**Tabla 2. Composición química de *Opuntia***

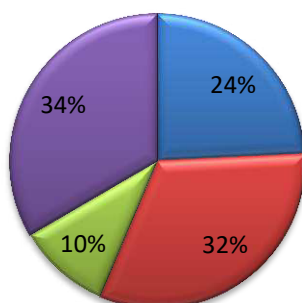
<b>Parámetro</b>	<b>Contenido</b>	<b>Referencia</b>
<b>Humedad % (% bh)</b>	94.33	1
<b>Proteínas (% bh)</b>	0.48	1
<b>Grasas (% bh)</b>	0.11	1
<b>Cenizas (% bh)</b>	1.06	1
<b>Ca%</b>	0.33	1
<b>Na%</b>	0.183	1
<b>K%</b>	0.145	1
<b>Fe%</b>	0.322	1
<b>Nitrógeno total (% bs)</b>	0.772	2
<b>Hemicelulosa (% bs)</b>	18.50	2
<b>Celulosa (% bs)</b>	13.10	2
<b>Lignina (% bs)</b>	12.30	2
<b>Proteínas (% bs)</b>	5.60	2
<b>Extractivos</b>	25	2

% bh.- Base húmeda, % bs.- Base seca; (<sup>1</sup>Loayza & Chávez 2007; <sup>2</sup>Yang *et al.* 2015)

En México *Opuntia* tiene un área cultivada aproximadamente de 100,000 ha por año, con una producción de 600,000 toneladas y una productividad de 40-50 ha/año, considerado como un alto rendimiento superando a varias especies de agaves y cultivos como remolachas, alfalfa, trigo y estando al a par con cultivos como maíz, sorgo y caña de azúcar (Inguez-Fernández *et al.*, 2011). La Figura 1 muestra la distribución de las ha de Op en las diferentes actividades más relevantes para este sustrato de acuerdo al Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 2017) dejando un 34% de ha como

disponibilidad para su uso en actividades secundarias como en la producción de combustible o bioproductos en general (Morales *et al.*, 2006).

■ Forraje ■ Verdura ■ Producción de tuna ■ Disponibilidad



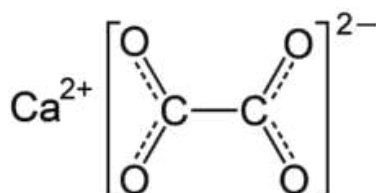
**Figura 1. Disponibilidad y uso de las ha de en México Opuntia**

Dentro de sus aprovechamientos Op es muy variable, desde tiempos coloniales el jugo de las pencas era utilizado como lubricantes de ruedas de los carros, para impedir que se quemaran por el uso intensivo, debido a su alto contenido de fibra insoluble puede prevenir enfermedades de cáncer de colon y diferentes padecimientos digestivos. Trabajos recientes emplean esta materia como materia prima potencial para la generación de energía: biogás, biodiesel, bioetanol así como productos semi-terminados que pueden ser empleados directamente para la generación de bioproductos secundarios.

#### **2.4. Oxalato de calcio**

El oxalato de calcio es un compuesto químico que presenta una estructura de cristales en forma de agujas llamados rafidios, de fórmula química  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  o bien  $\text{Ca}(\text{COO})_2$  tal como se muestra en la Figura 2 (Lencar, 2001). Sus propiedades físicas y químicas que se muestran en la Tabla 3 hacen de este un producto químico con valor industrial ya que se puede emplear como anticoagulante en la determinación de calcio, se puede emplear en la fabricación de vidrio cerámicos, reparación de suelos, agente blanqueador, limpiador de metales y abrillantador de piedras preciosas, con un valor en el mercado de 50 a 100 dólares por cada

kilogramo, de acuerdo a su pureza, marca y lugar de procedencia (Bula-García, 2011).



**Figura 2. Estructura química del oxalato de calcio.**

**Tabla 3. Propiedades químicas y físicas del oxalato de calcio** (Bula García, 2011).

Propiedades físicas		Propiedades químicas	
<b>Densidad</b>	2.2 kg/m <sup>3</sup>	<b>Solubilidad en agua</b>	6.7 * 10 <sup>-4</sup> g/mL
<b>Masa molecular</b>	128.097 g/mol	<b>Temperatura de solubilidad</b>	20°C
<b>Punto de ebullición</b>	200°C		

La disposición del oxalato de calcio en BAg y Op es muy común ya que se encuentra acumulado dentro de los tejidos celulares. Existen una variedad de plantas productoras de oxalato de calcio en un gran rango de fracción másica del 3 al 80% en peso seco (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016), donde el 90% del calcio total en estas plantas se puede encontrar como sales de oxalato. Se han informado que el BAg y Op tienen una concentración mayor de oxalato de calcio que la mayoría de materias primas de bioproductos actuales, tales como residuos forestales (madera de pino), pastos o agrícolas (bagazo de caña) (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).

El oxalato de calcio tiene varias funciones en las plantas como la regulación de calcio, les brinda protección y les ayuda a la detoxificación de metales como: Zn, Cd, Sr, Pb y Al, ayuda a la rigidez y firmeza de la plantas y ayudan a la captación

de la luz y su reflexión (Franceschi & Nakata, 2005). Otras propiedades interesantes del oxalato de calcio es su reacción exotérmica o incompatibilidad con oxidantes fuertes como el peróxido de hidrogeno u ozono, ambos ampliamente utilizados como solventes o productos químicos para el tratamiento de biomasa (Banerjee et al., 2011; José A. Pérez-Pimienta *et al.*, 2016). Su producción en plantas está ligada a varias formas y tamaños los cuales están clasificados en cuatro tipos principales basándose en su morfología como (Moreno-Cárcamo, 2004):

- Rafidios (cristales aciculares en agregados)
- Drusas (cristales esféricos)
- Estiloides (cristales aciculares)
- Prismas

En Op y BAg el oxalato de calcio está presente en dos tipo de poliformo como whewellita (oxalato de calcio monihidratado) y/o weddellita (oxalato de calcio dihidratado) (Contreras-Padilla *et al.*, 2011, 2015; Moreno-Cárcamo, 2004; Pérez-Pimienta *et al.*, 2016). El oxalato de calcio soluble es altamente oxidante, corrosivo y posee una gran cantidad de quelante por lo que puede ser toxico. En la dieta humana es ingerido por una gran cantidad de alimentos comunes como: nopal, chocolate, espinacas, leguminosas, entre otros (Moreno-Cárcamo, 2004). Su presencia a altos niveles podría tener efectos (positivos o negativos) en el rendimiento del pretratamiento en cuanto a la producción de azúcares reductores; por lo este es claramente un tema muy importante que debe abordarse para futuras aplicaciones de biorrefinería (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).

La extraccion del oxalato de calcio en Op y BAg se realiza mediante dos tratamientos químicos en frio y caliente. La extracción caliente emplea ácidos fuertes a concentraciones severas de 2 a 3 N (normal) efectuando una remoción de oxalato de calcio total a una temperatura de 80 °C. Mientras que la extracción



en frío es a T ambiente (Al-Wahsh *et al.*, 2012). Existen varios métodos para su cuantificación los más utilizados son métodos analíticos como los cromatográficos (HPLC), difracción de rayos X (DRX) y enzimáticos acoplado a espectroscopia de UV-Vis (Contreras-Padilla *et al.*, 2011; Minocha *et al.*, 2015; Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).

## **2.5. Pretratamientos de la biomasa.**

Existen características claves para el pretratamiento efectivo de la biomasa por ejemplo, debe de ser de bajo costo y de fácil operación. Los pretratamientos deben ser efectivos dentro de un amplio rango de carga de sólidos y deben recuperarse la mayoría de los componentes del material en forma utilizable en fracciones separadas (Fernando *et al.*, 2006). No deben producir cantidades limitadas de productos de degradación de azúcares y lignina que inhiban el crecimiento bacteriano en las fermentaciones o acciones enzimáticas, deben de proporcionar una demanda energética baja o deben de realizarse de manera tal que la energía que se invierte pueda utilizarse para otros fines, como calentamientos secundarios (Fernando *et al.*, 2006; Viikari *et al.*, 2007).

### **2.5.1. Pretratamiento físico**

La reducción de partículas de tamaños gruesos esta asistido por trituraciones, moliendas y astillados, estos son métodos de reducción de tamaño mecánico que mejoran la digestibilidad de la biomasa orgánica y lignocelulósica (Agbor, Cicek, Sparling, Berlin, & Levin, 2011), aumentado el área superficial y reduciendo el grado de polimerización como la cristalinidad de la celulosa (Agbor *et al.*, 2011; Sun & Cheng, 2002). La recolección y el pre-acondicionamiento de la biomasa reducen su tamaño a troncos gruesos de 10 a 30 mm, mientras que la molienda y trituración reduce el tamaño de partícula de 0.2-2 mm. Sin embargo, se ha demostrado que una mayor reducción de tamaño de partícula por debajo de 0.40 mm la biomasa tiene poco efecto sobre los rendimientos de hidrólisis. Por otro lado el astillado reduce las limitaciones de la transferencia de calor y de masa. Por lo que la molienda y trituración son los tratamientos físicos más efectivos ya que

aparte de reducir el tamaño de partícula reduce la cristalinidad de la celulosa (Agbor *et al.*, 2011) y su requerimiento energético depende del tipo de biomasa es decir las características de esta así como el tamaño de partículas que se requiere.

Por otro lado, se ha demostrado la importancia de los tratamientos físicos ya que la molienda aumenta los rendimientos en la producción de biogás, bioetanol y biohidrógeno (Agbor *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta el alto requerimiento de energía de la molienda a escala industrial y el aumento en la demanda energética es poco probable que la molienda siga siendo económicamente viable. Sin embargo, este pretratamiento puede realizarse antes o después de pretratamientos químicos, estudios demuestran que la molienda después del pretratamiento químico se reduce en gran medida el consumo energético, el costo de separación de hidrolizado/sólido se reduce la producción de inhibidores para etapas secundarias.

### **2.5.2. Pretratamientos ácido**

Los pretratamientos ácidos se encuentran entre los pretratamientos más ampliamente estudiados en diferentes materias primas, como hierbas, residuos agrícolas y maderas (Agbor *et al.*, 2011; Ávila-Lara *et al.*, 2015). Existen una amplia gama de ácidos que funcionan como catalizadores como el nítrico, fosfórico, clorhídrico y sulfúrico los cuales son los más utilizados ya que solubiliza o elimina la hemicelulosa y muy recientemente el ácido clorhídrico elimina sales cristalinas de la biomasa aumentando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa, su efectividad depende de la concentración de ácido y la temperatura de reacción, sin embargo si se aplican condiciones severas se forman productos de degradación principalmente furfurales, 5-hidroximetilfurfural, ácidos fenólicos y aldehídos, ácido levulínico y otros ácidos alifáticos principalmente, que pueden inhibir tanto la hidrólisis enzimática como fermentaciones (Agbor *et al.*, 2011; Ávila-Lara *et al.*, 2015; da Costa Sousa *et al.*, 2009). Su modo de acción está dado por una solución acuosa ácida y sustrato, la cual se calienta a temperaturas determinadas (80-215 °C) bajo una carga de sólidos < 4% p/p. Sin embargo estudios señalan

que a una mayor carga de sólidos la concentración de monosacáridos oligómeros aumenta (Agbor *et al.*, 2011; Salcedo *et al.*, 2010).

### 2.5.3. Pretratamientos enzimático

También conocida como hidrólisis enzimática o sacarificación enzimática, es un método muy efectivo para la liberación de azúcares simples de materiales celulósicos tratando de anteponerse a la hidrólisis ácida. Es un procedimiento de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa que es catalizada por enzimas como celulasas y xilanasas, bajo parámetros como temperatura, pH, tiempo y cantidad de enzima (Tableña *et al.*, 2010). En la Tabla 4 se muestran algunos intervalos de operación habituales.

**Tabla 4. Parámetros de hidrólisis enzimática** (Ávila-Lara *et al.*, 2015; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2015; Talebnia *et al.*, 2010).

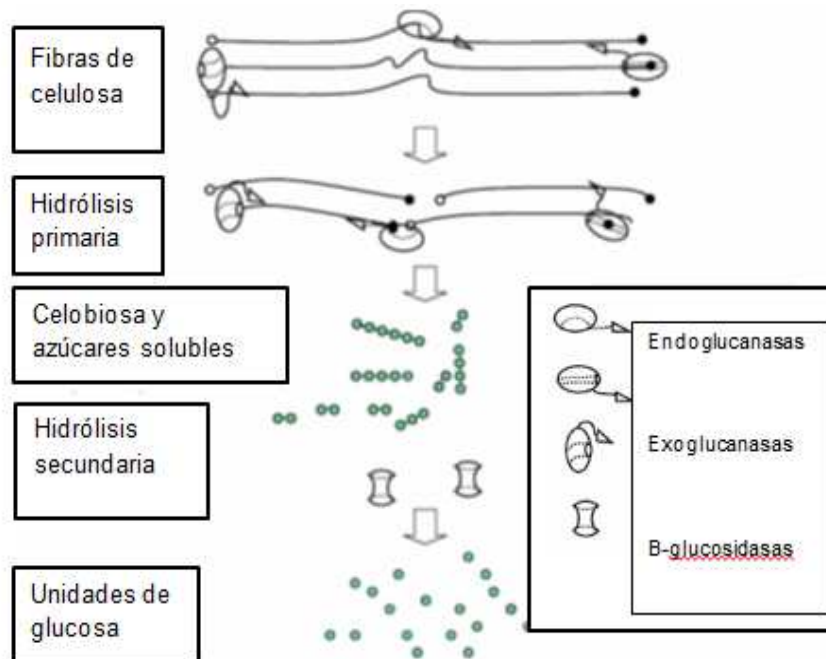
<b>Parámetros</b>	<b>Intervalo de operación</b>
<b>Temperatura</b>	45-55 °C
<b>pH</b>	4-5
<b>Dosis de celulosa</b>	10-30 (FPU/g material lignocelulósico)
<b>Tiempo de retención</b>	48-86 horas

Nota: FPU, unidades de papel filtro.

Durante este proceso tres grupos de enzimáticos son empleados principalmente para la hidrólisis completa de la celulosa, estos tres grupos se dividen en: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Talebnia *et al.*, 2010). Las endoglucanasas hidrolizan al azar las regiones de baja cristalinidad es decir los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos intermoleculares accesibles de las fibras de la celulosa así como sus extremos libres de la cadena. Las exoglucanasas degradan la molécula progresivamente en sus extremos libres para producir celobiosa o glucosa soluble. Mientras que las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa completando así la degradación completa de la celulosa. Cabe mencionar que tanto las endo como las exoglucanasas son capaces de degradar las regiones

amorfas de la celulosa, pero ambas se requieren para la degradación de las zonas altamente cristalinas de la celulosa (Escamilla-Avarado, 2009; Juturu & Wu, 2014; Talebnia *et al.*, 2010).

Por otro lado, el principal objetivo de las xilanasas es el xilano (polisacárido constituido de cadenas de xilosa). El proceso enzimático utilizado para la hidrólisis del xilano está compuesto generalmente por  $\beta$ -1,4-endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasa y acetil xilan esterasas (Beg, Kapoor, Mahajan, & Hoondal, 2001). Estas enzimas actúan en conjunto para convertir el xilano en sus azúcares correspondientes (Figura 3). La  $\beta$ -1,4-endoxilanasas hidroliza el enlace  $\beta$ -1,4 dando xilooliosacaridos. La  $\beta$ -xilosidasa hidroliza los xilooligosacaridos a D-xilosa, mientras que las  $\alpha$ -glucuronidasas ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasa y acetil xilan esterasas) liberan los sustituyentes de la cadena principal del xilano aumentando la velocidad de difusión de los sustratos y disminuyendo la viscosidad (Polizeli *et al.*, 2005; Escamilla-Alvarado, 2009).

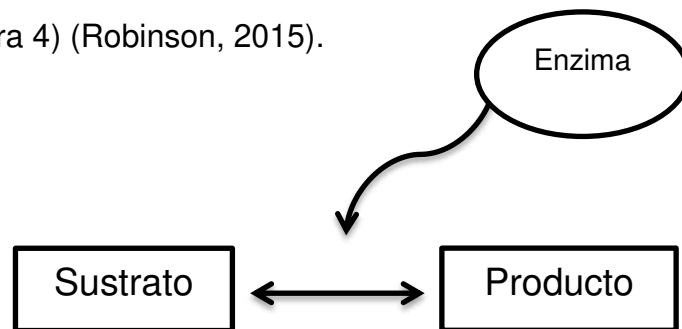


**Figura 3. Esquema de la hidrólisis de la celulosa por complejos de celulasas** (imagen de Biely 1993, modificada de (Escamilla-Avarado, 2009)).

En muchos casos es posible que exista una baja actividad enzimática de la celulosa por la disminución irreversible en la capacidad de adsorción de la celulosa. Por lo tanto, para disminuir este efecto se utilizan surfactantes, pretratamientos físicos y/o químicos que modifican la forma natural de la celulosa, aumentando la superficie de contacto, previniendo la desnaturalización de las enzimas, lo que se traduce significativamente en un aumento en el rendimiento de glucosa (Agbor *et al.*, 2011; Ávila-Lara *et al.*, 2015).

### 2.5.3.1. Enzimas

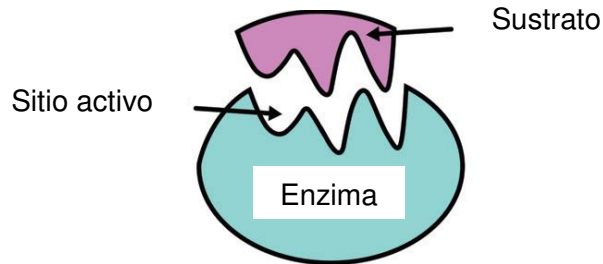
Las enzimas son catalizadores biológicos también conocidos como biocatalizadores que aceleran las reacciones bioquímicas en organismos vivos, pueden extraerse de las células y luego utilizarse para catalizar una amplia gama de procesos. Tienen papeles importantes en la producción de agentes edulcorantes y la modificación de antibióticos, se usan en detergentes, tienen una importante aplicación en los dispositivos analíticos y ensayos que tienen aplicaciones clínicas, forenses y ambientales. Su poder catalítico es muy alto ya que se requiere una baja concentración de enzima para lograr una aceleración de la reacción sin que ellas mismas se consuman durante la reacción. Son descritas como catalizadores capaces de convertir moléculas de sustrato a moléculas de producto (Figura 4) (Robinson, 2015).



**Figura 4. Descripción catalítica de las enzimas.**

Las enzimas están basadas en aminoácidos formando proteínas globulares que varían en tamaño. Son aminoácidos que pueden disponerse como una o más cadenas de polipéptidos que se pliegan y se doblan para formar una estructura tridimensional, que incorpora un área pequeña conocida como sitio activo (Figura

5), donde el sustrato se une realmente. El sitio activo puede implicar solo un pequeño número (menos de 10) de los aminoácidos constituyentes (Robinson, 2015).



**Figura 5. Representación del sustrato que se une al sitio activo.**

Siendo las propiedades de forma y carga del sitio activo las que le permiten unirse a un único tipo de molécula de sustrato de modo que las enzimas pueden demostrar una considerable especificidad en su actividad catalítica (Robinson, 2015).

Todas las enzimas tienen carácter proteico pero existe un gran número de enzimas que contienen un componente no proteico conocido como cofactor que es necesario para la actividad catalítica de la enzima. Un cofactor puede ser otra molécula orgánica que puede ser una coenzima o una molécula inorgánica como un ion metálico tal como hierro, magnesio, cobalto, cobre o zinc lo cual es necesario para mantener su estructura y estabilidad (Robinson, 2015).

#### **2.5.3.1.1. Celulasas y xilanasas**

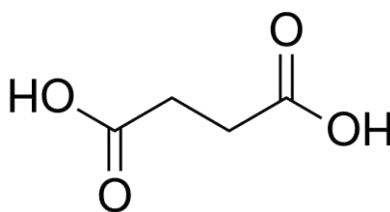
Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4 presentes en los polisacáridos que componen la biomasa es decir la celulosa y hemicelulosa, respectivamente (Odilia, 2002). La hemicelulosa es un polímero cuyo componente principal es el xilano, este está compuesto por D-xilopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -1-4-glucosídicos, dependiendo de su origen pueden representar ramificaciones homopolisacáridos de grupos acetil, arabinosa y gluconosil, principalmente (Escamilla-Avarado, 2009; Martínez-ávila *et al.*, 2010). Junto con el manano,

galactano y arabinano, forman parte de la hemicelulosa vegetal. Los principales monómeros de la hemicelulosa son la D-xilosa, D-manosa, D-galactosa y L-arabinosa. Las celulasas y xilanasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. La mayoría de los microorganismos celuloticos son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas, sin embargo algunos otros solo producen celulasas o xilanasas. La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación (Odilia, 2002).

## 2.6. Ácido succínico: Producción y usos

El ácido succínico o ácido butanodioico es un cristal incoloro soluble en agua, etanol y acetona. También es conocido como ácido ámbar ya que se obtuvo por primera vez en el destilado de ámbar en 1550. El ácido succínico tiene una amplia gama de aplicaciones industriales ya sean químicas y en el campo alimenticio.

Sirve como intermediario químico para la producción de lacas y esteres de perfumes, es empleado en la producción de cosméticos, detergentes, tintas, estimulantes de crecimiento, en la industria alimenticia se ha empleado como aditivos, regulador de pH, saborizante y agente microbiano. También tienen mercado en la producción de recubrimientos, surfactantes, solventes verdes y plásticos biodegradables (Axelsson *et al.*, 2012; Salvachúa *et al.*, 2016) (Figura 6).



**Figura 6. Fórmula química del ácido succínico.**

Debido a preocupaciones ambientales como el problema de los desechos de plásticos, se espera que la demanda del ácido succínico aumente significativamente ya que es un compuesto que sirve como intermediarios para la generación de nuevos polímeros biodegradables como: el poli succinato de 1,3-

propileno, compuesto que se produce de la policondensación térmica del ácido succínico como 1,3- propanodiol y/o 1,4-butanodiol. Estos químicos puede usarse adicionalmente para la producción de poli succinato de butileno (PBS) el cual es un compuesto biodegradable con excelentes propiedades térmicas y mecánicas, así como procesabilidad termoplástica (Axelsson *et al.*, 2012).

A partir del 2016 el ácido succínico tiene una producción mundial de 30,000 a 50,000 toneladas por año, con un precio de mercado de 2,400 a 3,000 dólares por tonelada, por lo que se espera que su mercado alcance las 100,000 toneladas anuales en años próximos (Axelsson *et al.*, 2012; Budzianowski, 2017). Su producción es a través de tres rutas químicas principalmente, la oxidación de parafinas, hidrogenación catalítica y electroreducción del ácido maleico o anhídrido maleico (Axelsson *et al.*, 2012; Corona-González *et al.*, 2016). En el proceso de oxidación de parafinas se emplean catalizadores de calcio o magnesio y se obtienen varios tipos de ácidos tricarbónicos al mismo tiempo. Posteriormente, el ácido succínico se recupera y se purifica por destilación, cristalización y secado. Sin embargo, el rendimiento y la pureza del ácido succínico obtenido por este método es relativamente poco. Por otro lado, la hidrogenación consiste en llevar a cabo de forma homogénea o heterogénea mediante una cuidadosa selección de catalizadores, obteniendo altos rendimientos, pureza y selectividad. Sin embargo, este proceso es complicado, costoso y podría tener implicaciones ambientales.

Recientemente desarrollos en la producción de ácido succínico se han centrado en alternativas biotecnológicas a través de biorrefinerías. En particular la transformación microbiana basada en el uso de biomasa renovable como materia prima. Teniendo en cuenta que el hecho de que el CO<sub>2</sub> es asimilado durante la fermentación del ácido succínico puede considerarse como una ventaja (Axelsson *et al.*, 2012). Su producción biotecnológica se encuentra todavía en una escala de demostración, pero se espera un avance significativo a medida de que las principales empresas avanzan en esta proyección en conjuntos comerciales y departamentos de investigación así como de desarrollo. Un ejemplo a ello es la



empresa BioAmber, una empresa estadounidense dedicada a la producción de ácido succínico de base biológica que ha construido una planta de demostración en Pomacle Francia con una capacidad de 2000 toneladas por año bajo un precio de mercado de 4,550 dólares por tonelada (Axelsson *et al.*, 2012; Budzianowski, 2017). Siendo el ácido succínico un químico indizado por la US-DOE como uno de los 10 bioquímicos con mayor potencial de mercado, junto con el furano, glicerol y sus derivados, sorbitol, xilitol, entre otros (Budzianowski, 2017).

## 2.7. Microorganismos productores de ácido succínico

El ácido succínico es un intermediario del ácido tricarbólico (ATC) y uno de los productos finales de la fermentación bacteriana de metabolismos anaerobios. Es sintetizado en casi todas las células microbianas y eucariontes, tanto vegetales y animales (Song & Lee, 2006).

Existen muchas especies bacterianas que tienen la vía de conversión a ácido succínico de acuerdo a datos experimentales, los microorganismos de producción se muestran en la Tabla 5 (Axelsson *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011).

**Tabla 5. Especies microbianas productoras de ácido succínico.**

<b>Microorganismo</b>
<i>Actinobacillus succinogenes</i>
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Paecilomyces varioti</i>
<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Mannheimia succiniciproducens</i>
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Bacteroides succinogenes</i>
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>
<i>Cytophaga succinicans</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Fibrobacter succinogenes</i>

Es importante señalar que todas las especies producen succinato como producto final y a veces el succinato funge como intermediario que puede convertirse en otros productos, como el propionato (Axelsson *et al.*, 2012). Actualmente los microorganismos con alta eficiencia de producción de ácido succínico son: *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* y muy recientemente se ha reconocido a *Corybacterium glutamicum*. En la Tabla 6 se muestran diferentes especies productoras de ácido succínico (Axelsson *et al.*, 2012; Song & Lee, 2006).

**Tabla 6. Diferentes especies de microorganismos productores de ácido succínico (Axelsson *et al.*, 2012).**

<b>Producción de ácido succínico microbiano</b>					
<b>Cepa</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Métodos</b>	<b>Concentración n (g/L)</b>	<b>Productividad (g/L*h)</b>	<b>Rendimiento (g/S<sub>ustrato</sub>)</b>
<b><i>A. succinogenes</i></b>					
<b>FZ53</b>	Glucosa	Anaeróbico, lote	105.8	1.36	0.83
<b>FZ6</b>	Hidrólizados de fibra de maíz	Anaeróbico, lote	70.6	0.7	0.88
<b>130Z</b>	Sake lees	Anaeróbico, lote	48	0.94	0.75
<b>130Z</b>	Suero de leche	Anaeróbico, lote	21.5	0.44	0.57
<b>130Z</b>	Glucosa	Anaeróbico, lote	67.2	0.8	0.7
<b>CGMCC2650</b>	Paja de maíz	Anaeróbico, lote	15.8	0.62	1.23
<b>CGMCC1593</b>	Melaza de caña	Anaeróbico, lote	50.6	0.84	0.8
<b>CGMCC1593</b>	Hidrólizados de maíz	Anaeróbico, lote	53.2	1.21	0.83
<b>CGMCC1593</b>	Glucosa	Anaeróbico, lote	60.2	1.3	0.75
<b>CGMCC1716</b>	Hidrólizados de fibra de maíz	Anaeróbico, lote	35.4	0.98	0.73
<b>CIP106512</b>	Hidrólizados de bagazo de caña de azúcar	Anaeróbico, lote	22.5	1.01	

### *Mannheimia succiniproducens*

*M. succiniciproducens* es una bacteria en forma de varilla anaeróbica facultativa, capnofílica, mesofílica, Gram-negativa similar a *A. succinogenes*. Fermenta una amplia variedad de sustratos e hidrolizados, presenta una desventaja la cual es la auxotrofia (necesidad de vivir en presencia de una sustancia) porque el organismo es incapaz de sintetizarla a diferencia de *A. succinogenes*, *M. succiniproducens* lleva a cabo un ciclo de ácido tricarboxílico (ATC) completo y puede crecer de manera eficiente tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Su metabolismo da lugar a ácido succínico como producto mayoritario y ácidos acéticos y fórmico como subproducto principales en condiciones de flujo de dióxido de carbono y pH de 6.0-7.5 (Beauprez *et al.*, 2010).

### *Anaerobiospirillum succiniproducens*

*A. succiniciproducens* es una bacteria anaerobia estricta, capnofílica, mesofílica, pleomórfica, Gram-negativa y es considerada como un patógeno. La composición requerida de su medio de crecimiento indica que esta cepa es autotrófica para muchos aminoácidos y vitaminas. En la mayoría de los casos se requieren extractos de levaduras y peptona, que da lugar a altos valores de rendimiento y producción de ácido succínico. Este microorganismo fue aislado de la garganta y heces de los perros Beagles. Produce ácido succínico como productor mayoritario, etanol y ácido acético como minoritario bajo consideraciones estrictas de anaerobiosis. Utiliza la carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) para producir ácido succínico. Los factores ambientales críticos para la producción de ácido succínico y para el crecimiento del microorganismo son: la presencia de dióxido de carbono, pH, una fuente externa que proporcione electrones y diversos compuestos del medio. El suministro de hidrógeno como donante de electrones incrementa tanto el rendimiento hacia el ácido succínico como la productividad. Es un microorganismo que puede emplear fuentes de carbono como: glucosa, glicerol, sacarosa, maltosa, lactosa y fructosa muy recientemente se ha visto que el uso de glicerol en lugar de glucosa da lugar a un incremento en el rendimiento del ácido succínico y un aumento de la selectividad respecto al ácido acético.

### *Escherichia coli*

Es una bacteria caracterizada por su abundancia en la naturaleza y su pequeño tiempo de duplicación. Las herramientas de ingeniería genética son en este organismo más fáciles de aplicar y permiten diversos procesos de producción. En condiciones aerobias se produce acetato mientras que en condiciones anaeróbicas puede fermentar glucosa para producir etanol, ácido fórmico, acético, láctico y pequeñas cantidades ácido succínico. El rendimiento del succinato a partir de glucosa en *E. coli* no suele ser superior al 0.2 mol/mol.

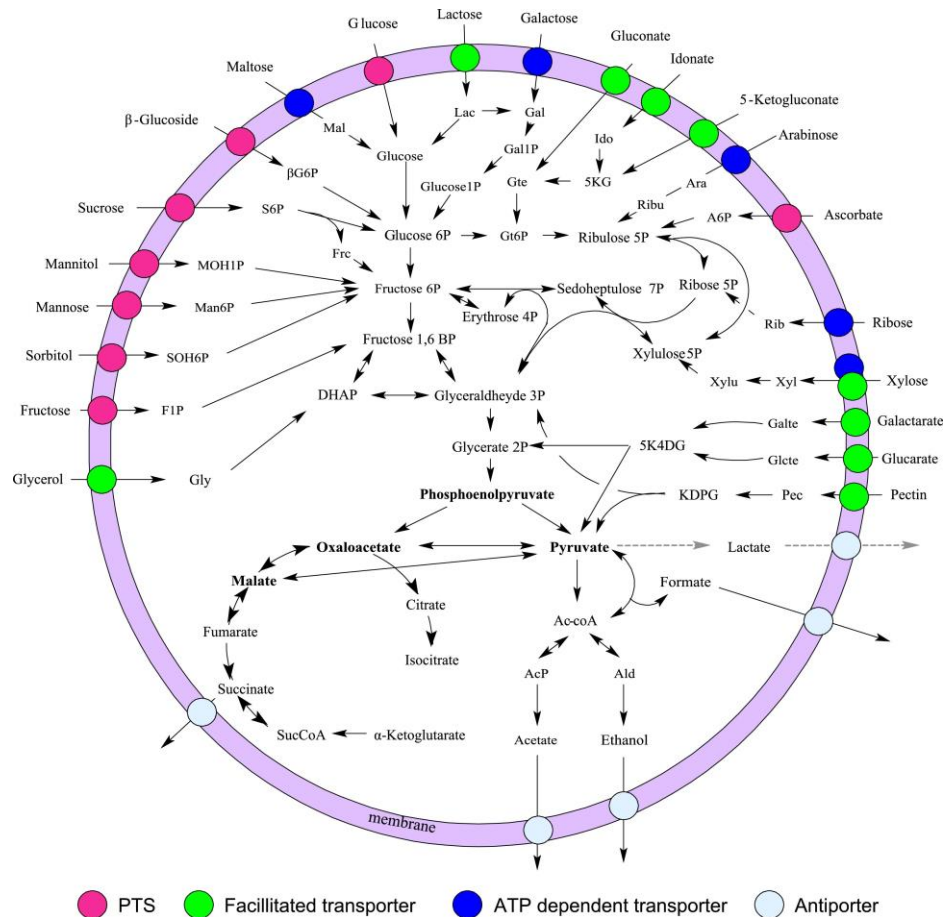
#### *Actinobacillus succinogenes.*

Es una bacteria anaerobia facultativa, capnofílica, mesofílica pleomórfica, Gram-negativa y miembro de la familia *Pasteurellaceae*. Es conocido como uno de los microorganismos naturales más eficientes en la producción de ácido succínico. Puede llevar a cabo fermentaciones a partir de un amplio número de fuentes de energía por ejemplo arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa o salicina, así como sueros lácticos, necesita dióxido de carbono para simular el crecimiento y la producción de succinato. Es aislada del rumen de las especies bovinas sin embargo la abundante presencia de vitaminas y aminoácidos en el rumen da lugar a que ciertas rutas biosintéticas se pierdan, siendo así el caso de la falta de nutrientes en el medio. Bajo condiciones anaerobias *A. succinogenes* tiene una excelente tolerancia a altas concentraciones de glucosa, lo cual es un punto a favor durante la fermentación ya que durante este proceso se han registrado concentraciones de hasta 105.8 g/L utilizando glucosa (Beauprez *et al.*, 2010; Pateraki *et al.*, 2016).

#### **2.7.1. Mecanismos de conversión hacia la producción de ácido succínico**

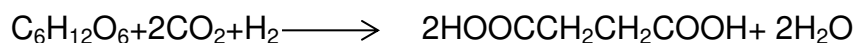
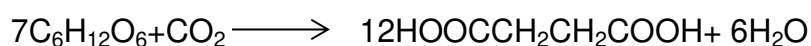
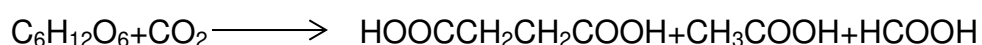
La glucosa se transporta a la célula con la acción de una permeasa (sistema de transporte), llegando a la fosforilación en el sistema de fosfotransferasa dependiendo del fosfoenolpiruvato y de la actividad de hexoquinasas. Además, la glucosa-6-fosfatasa se cataboliza a fosfoenolpiruvato (PEP) a través de la vía glucolítica, mientras que la vía oxidativa de la pentosa fosfato contribuye muy poco en el catabolismo de la glucosa. La nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADPH)

se forma a partir de la nicotina adenina dinucleótico (NADH) a través de la transhidrogenación o la combinación de NADH-oxidantemalato deshidrogenasa y NADP-reducida de la actividad de las enzimas málicas, mientras que la NADH se produce a través de la actividad del piruvato deshidrogenasa y el formiato deshidrogenasa. Por otro lado, los requisitos de NADPH afectan la distribución del flujo entre las vías de carbono 3 y 4 (vías metabólicas de fijación de carbono en el metabolismo), principalmente debido a actividades del piruvato deshidrogenasa y formiato deshidrogenasas. Las cuatro rutas más importantes en la distribución de flujo para la producción de succinato por *A. succinogenes* son fosfoenolpiruvato, oxaloacetato, malato y piruvato tal como se muestra en la Figura 7 (Axelsson *et al.*, 2012; Pateraki *et al.*, 2016).



**Figura 7. Vías metabólicas de *Actinobacillus succinogenes* y posibles transportadores de azúcares (Pateraki *et al.*, 2016).**

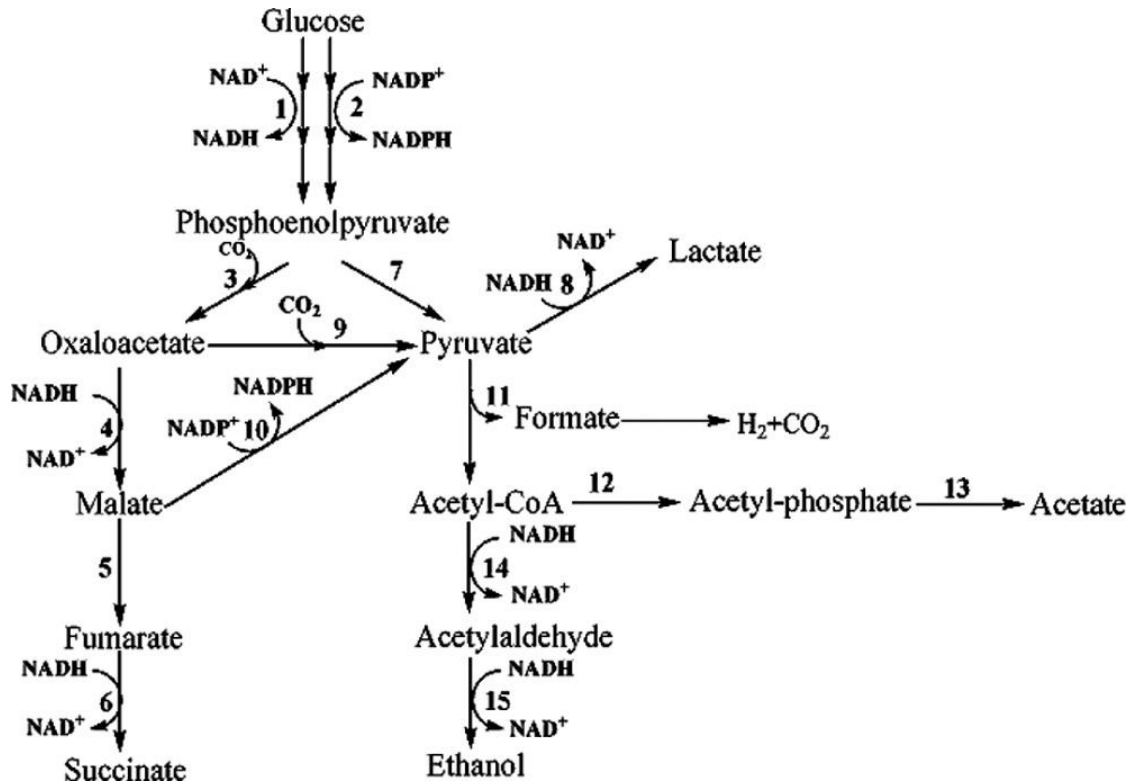
En resumen, existen tres rutas importantes que pueden formar ácido succínico: la rama reductora del ácido tricarbóxico también conocida como la ruta de fermentación (principalmente activa bajo condiciones totalmente anaeróbicas), la rama oxidativa del ciclo del ácido tricarbóxico (principalmente activa en condiciones aeróbicas) y la ruta del glioxilato que es esencialmente activa en condiciones aeróbicas tras la adaptación del crecimiento en acetato (Axelsson *et al.*, 2012). Dependiendo de la asimilación estequiométrica del dióxido de carbono e hidrógeno, el rendimiento global puede variar significativamente que la glucosa necesita de un agente que ayude a la reducción de este a ácido succínico (Axelsson *et al.*, 2012):



En condiciones anaerobias, el succinato deriva del fosfoenolpiruvato (FEP) a través de varios compuestos intermedios del ciclo del ácido tricarbóxico que incluye el oxalacetato, malato y fumarato, pero se reconoce la primera ruta como la vía primaria. Dependiendo del microorganismo y las condiciones de cultivo pueden sintetizarse otros metabolitos como etanol, acetato, lactato y formiato cuando el piruvato se oxida aún más.

La ruta de fermentación convierte oxaloacetato en malato, fumarato y luego succinato requiriendo 2 moles de NADH (coenzima) por mol de succinato producido. Un obstáculo importante para obtener un rendimiento alto de ácido succínico a través de la vía fermentativa se debe a la limitación de la coenzima NADH. Lo cual se debe a que 1 mol de glucosa puede proporcionar solo 2 moles de NADH a través de la ruta glucolítica. Por otro lado para la formación de 1 mol de succinato a través de la ruta de fermentación nativa se requieren de 2 moles de NADH. Por lo tanto el máximo rendimiento teórico molar de succinato a partir de glucosa está limitado a 1 mol/mol de glucosa suponiendo que todo el carbono

pasara por la ruta de fermentación nativa de succinato. En este caso la glucosa que asimila *A. succinogenes* se metaboliza a FEP por glicolisis y la vía oxidativa de pentosa fosfato. Para lograr la síntesis aún más de succinato por FEP se requieren de cuatro enzimas claves que incluyen fosfoenolpiruvato carboxiquinasas, malato, deshidrogenasas, fumarasas y fumarato reductasas (Figura 8).



**Figura 8. Vía de producción de ácido succínico por *A. Succinogenes* simplificada.**

(1) Enzima de la ruta Embden-Meyerhof, (2) enzimas de la vía del fosfato de pentosas, (3) fosfoenolpiruvato carboxiquinasas, (4) malato deshidrogenasas, (5) fumarasa, (6) fumarato reductasas, (7) piruvato cinasa, (8) lactato deshidrogenasas, (9) oxaloacetatos descarboxilasas, (10) enzima malica, (11) piruvato-formiato liasa, (12) acetato cinasa, (13) fosfo-transacetilasas, (14) acetaldehído deshidrogenasas, (15) alcohol deshidrogenasa.



### **3. Justificación**

Los procesos biotecnológicos han demostrado su factibilidad tecnológica, ambiental y económica. Sin embargo, estos procesos siguen en continua evolución para encontrar soluciones a nuevos problemas. Tal es el caso de los procesos de biorrefinería para la obtención de bioproductos.

El ácido succínico es un bioproducto que se obtiene por rutas fermentativas de microorganismos con potencial de producción. Se ha demostrado la factibilidad de agregar una etapa adicional a la obtención de hidrólizados como fuente de energía para los microorganismos productores de ácido succínico, lo que da la posibilidad de obtener hidrólizados de mejor calidad.

El sustrato para este proceso es la biomasa, que puede ser materias primas refinadas, cultivos o residuos. Si se utiliza residuos y materias primas con disponibilidad de suelo como materiales vegetales no competitivos con cultivos alimenticios, se resolvería la problemática de la disposición de residuos y aprovechamiento de materiales silvestres que no tienen ningún uso.

Con la finalidad de poder comparar trenes de proceso y alternativas de obtención de ácido succínico, así como su comparación con otros procesos de obtención y disposición de residuos y materia vegetal, es necesario evaluar cada etapa del proceso, con técnicas estadísticas, análisis físico-químicos y caracterizaciones de la biomasa e hidrólizados obtenidos.

La obtención de todos estos resultados podría ayudar a impulsar procesos sustentables que ayuden a la resolución de problemas como la dependencia de recursos fósiles, el cambio climático y la disposición de materia vegetal y residuos lignocelulósicos disponibles.

#### 4. Hipótesis

Remover oxalato de calcio en el bagazo de agave (BAg) y *Opuntia* (Op) permite obtener azúcares que sean más asimilables en la producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*.

##### *Hipótesis particulares*

- La hidrólisis ácida de *Opuntia* permitirá la obtención de concentraciones mayores de azúcares fermentables que la de bagazo de agave.
- La hidrólisis enzimática de biomasa sin oxalato de calcio producirá una concentraciones más altas de azúcares fermentables que a partir de biomasa con oxalato.
- Los hidrolizados enzimáticos de biomasa sin oxalato de calcio serán de mejor asimilación para la producción de ácido succínico comparado con los hidrolizados ácidos del proceso.

#### 5. Objetivos

Obtener ácido succínico a partir del bagazo de agave y de *Opuntia* bajo un enfoque de biorrefinería integrado por los procesos de *i*) extracción de oxalato de calcio, *ii*) tratamiento ácido, *iii*) tratamiento enzimático y *iv*) fermentación.

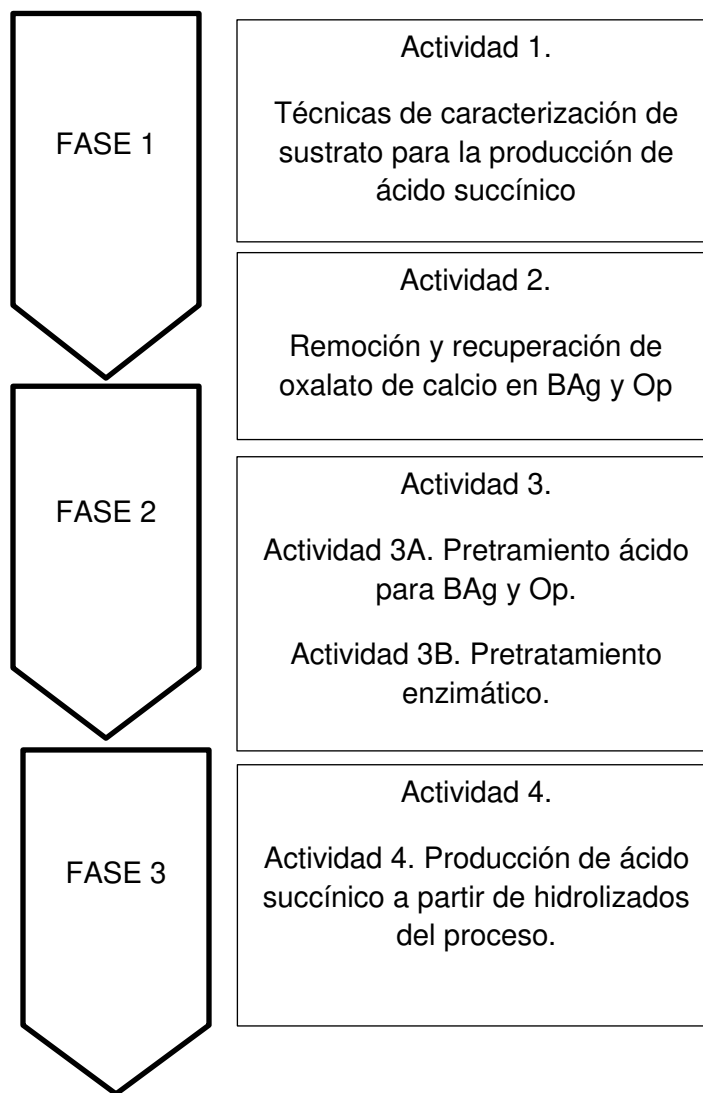
##### *Objetivos particulares.*

- Realizar la caracterización de BAg y Op pretratado y sin pretratar.
- Realizar hidrólisis acida diluida de bagazo de agave y de *Opuntia*.
- Remover y recuperar el oxalato de calcio, en *Opuntia* y bagazo de agave.
- Sacarificar enzimáticamente las biomásas de bagazo de agave y *Opuntia*: hidrolizadas y sin oxalato de calcio.
- Obtener ácido succínico a partir de los hidrolizados ácidos y enzimáticos de bagazo de agave y *Opuntia*.

## 6. Metodología

### 6.1. Plan de trabajo

El trabajo de tesis se dividió en tres fases y cuatro actividades que se realizaron como se describe en la Figura 9.



**Figura 9. Diagrama de flujo del plan de trabajo**

En la Figura 10 se muestra el diagrama de flujo del tren de tratamiento planteado para este trabajo de tesis señalando las líneas de flujo y procesos respectivamente.

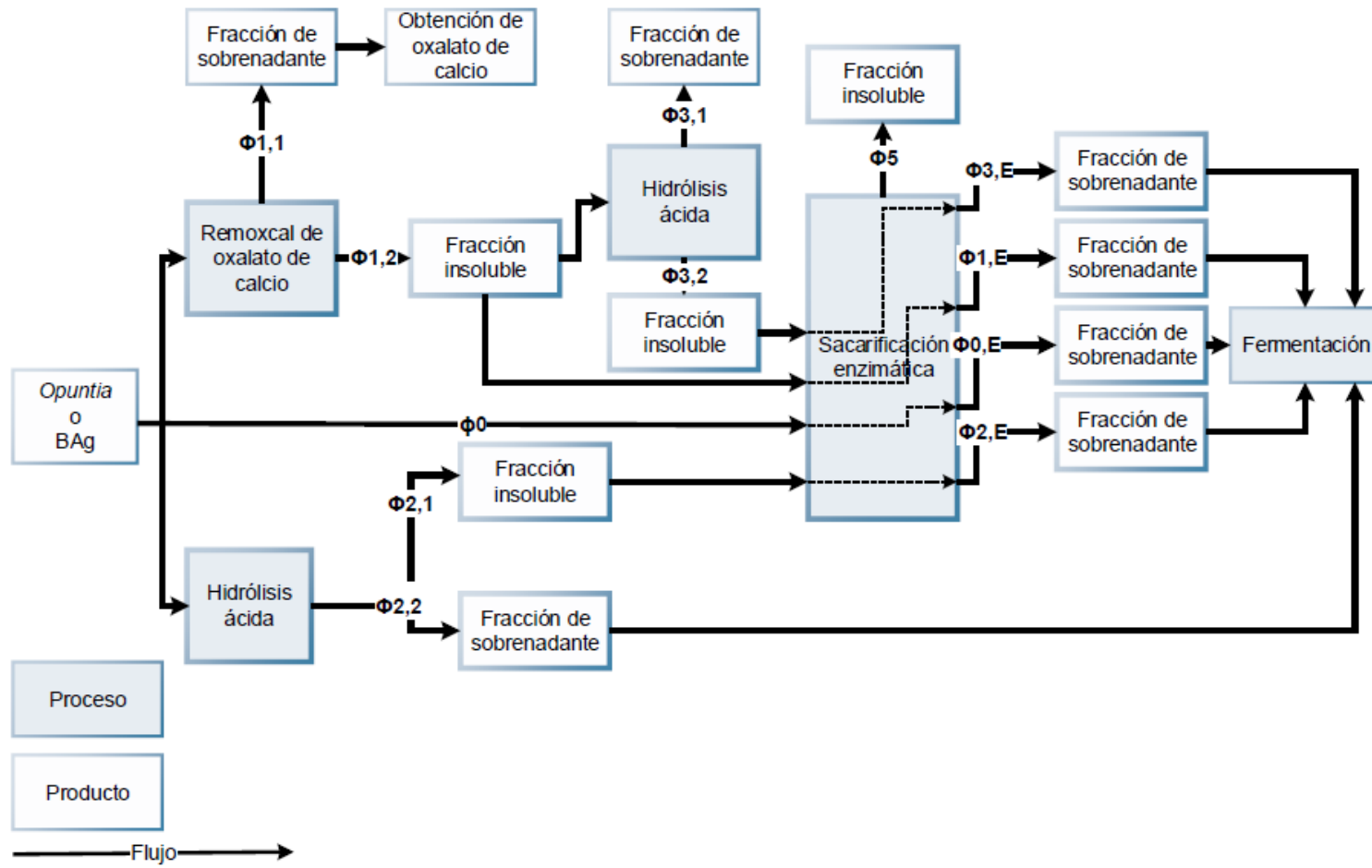


Figura 10. Rutas de tratamiento para la producción de ácido succínico

## 6.2. Actividad 1. Técnicas de caracterización de sustrato para la producción de ácido succínico

### 6.2.1. Propósito

Conocer y aplicar las técnicas de caracterización a los sustratos utilizados en las actividades posteriores.

### 6.2.2. Diseño de experimentos

Se realizó la caracterización fisicoquímica de Op y BAg para conocer la composición y características iniciales para las etapas de pretratamiento químico y enzimático de los sustratos.

### 6.2.3. Programa de seguimiento y análisis

La Tabla 7 refiere los diferentes análisis que se realizaron para la biomasa empleada en este trabajo.

**Tabla 7. Parámetro de análisis y caracterización**

<b>Análisis y Parámetro</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
<b>Sólidos totales</b>	Lote	Gravimétrico	(APHA/AWWA/WEF, 2012)
<b>Sólidos volátiles</b>	Lote	Gravimétrico	(APHA/AWWA/WEF, 2012)
<b>Nitrógeno Kjeldahl total</b>	Lote	Colorimétrico	(Sambrano-Arévalo <i>et al.</i> , 2015)
<b>Celulosa</b>	Lote	Gravimétrico	(AOAC, 1990)
<b>Hemicelulosa</b>	Lote	Gravimétrico	(AOAC, 1990)
<b>Lignina</b>	Lote	Gravimétrico	(AOAC, 1990)
<b>Análisis elemental</b>	Lote	Combustión	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
<b>Análisis térmico gravimétrico</b>	Lote, ensayos	Térmico	(Ávila-Lara <i>et al.</i> , 2015)
<b>Difracción de rayos X</b>	Lote, ensayos	Difracción	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2016)
<b>Análisis elemental (C, H, N, S)</b>		Combustión	(Yang <i>et al.</i> , 2015)

#### 6.2.4. Métodos y procedimientos

##### *Preparación de la biomasa*

El BAg en este estudio se obtuvo de la destiladora Rubio, una planta productora de tequila en Tequila, Jalisco. El BAg se obtuvo de la cosecha de agosto del 2016. La biomasa se secó en un horno a 55 °C durante 72 h, se molió en un molino manual y se tamizó hasta un tamaño de partícula menor a 210 micrómetros (malla 70), la biomasa se almacenó en bolsas de plástico selladas libre de humedad. Mientras que Op se obtuvo de campos de cultivo de productores de nopal del estado de Michoacán de una edad aproximada de 24 meses. El bagazo de Op se obtuvo del procesamiento de cladodios en un procesador de alimentos en el laboratorio de ingeniería química II, fue secado a una temperatura de 55°C por 72 h y se tamizó hasta un tamaño de partícula menor a 210 micrómetros (malla 70).

##### *Determinación de celulosa*

Pasos previos al análisis:

1. Llevar el filtro de vidrio poroso a peso constante a 105°C por 2 h.
2. Llevar la cápsula a peso constante a 105°C por dos horas
3. Llevar el filtro Gooch a peso constante a 105°C por 2 horas.

Método:

4. Extraer la grasa de la muestra con éter de petróleo en el Soxhlet por 5 h.
5. Pesar 2 g de la muestra desengrasada y seca (Pm), colocarla en un matraz de fondo plano.

Adicionar:

2 g de ácido tricloroacético.

5 mL de HNO<sub>3</sub>

70 mL de ácido acético 70 % v/v

6. Colocar a reflujo por 30 min

7. Filtrar con filtro de vidrio poroso grado C.
8. Lavar el residuo con agua caliente destilada hasta eliminar el olor a ácido acético.
9. Secar el filtro con la muestra en la estufa a 105°C por 2 h.
10. Pesar el filtro con el residuo seco (Pv).
11. Pesar la cápsula de porcelana vacía (Pc).
12. Contener el material del filtro y colocarlo en la cápsula para incinerar a 550°C por 5 horas.
13. Pesar la cápsula conteniendo las cenizas después de la incineración (pf).

$$\% \text{Celulosa} = \frac{P_v - P_f - P_c}{P_m} \times 100 \quad (1)$$

#### *Determinación de hemicelulosa*

La determinación de la hemicelulosa se realizó por la diferencia de la celulosa y la holocelulosa de las muestras. La holocelulosa es la materia fibrosa libre de lignina, que comprende solo a la hemicelulosa y celulosa. La determinación de holocelulosa se realizó removiendo la lignina de la muestra mediante la cloración. Mediante el procedimiento siguiente:

1. Preparar una solución de alcohol etílico al 95% v/v.
2. Preparar una solución de alcohol-monoetanolamina disolviendo 3% v/v monoetanolamina en alcohol etílico al 95%.
3. Pesar 2 g de muestra desengrasada (Pm) en un filtro de vidrio poroso grado C puesto previamente a peso constante (Pv).
4. Colocar la muestra dejando reposar toda la noche con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 50% v/v.
5. Remover el hipoclorito de sodio, filtrando al vacío.
6. Añadir alcohol al 95% para disolver el exceso de hipoclorito de sodio. Después de un minuto remover por succión.
7. Lavar con agua destilada fría.

8. Anadir solución de alcohol-monoetanolamina a 75°C de tal manera que quede la materia completamente cubierta. Agitar. Reposar la solución por 2 min y eliminar por succión. Repetir este paso.
9. Eliminar cualquier rastro del solvente lavando dos veces con alcohol y después dos veces con agua fría.
10. Llevar a sequedad en estufa a 103°C por 12 h y pesar el filtro con muestra (Ps).

$$\% \text{Holeocelulosa} = \frac{P_s - P_v}{P_m} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{Hemicelulosa} = \text{holeocelulosa} - \text{celulosa} - \text{ceniza} \quad (3)$$

#### *Determinación de lignina*

En este tipo de muestras, la lignina se determinó por hidrólisis de todo el material celulósico mediante una digestión con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor. Mediante el procedimiento siguiente:

1. Pesar aproximadamente 0.2 g de BAg y Op y pasar a un tubo de ensaye con rosca.
2. Añadir 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%.
3. Colocar la muestra durante una hora en un baño de agua a 30 °C agitando frecuentemente para asegurar una homogenización completa.
4. Diluir con 28 ml de agua destilada por cada mililitro de ácido transferir el contenido en el tubo a un matraz Erlenmeyer de 125 ml.
5. Realizar una hidrólisis secundaria en autoclave, manteniendo 120 °C durante 1 h.
6. Filtrar en filtro Gooch previamente llevado a peso constante con su filtro, lavando el residuo con agua destilada hasta remover completamente el ácido.
7. Secar a 70 °C durante 24 h hasta peso constante y registrar peso (Ps).
8. Calcinar la muestra a 550 °C y pesar (Pc).

$$\% \text{Lignin} = \frac{P_s - P_c}{P_m} \times 100 \quad (4)$$



### *Determinación de extractivos*

Pasos previos al análisis:

1. Llevar el filtro de vidrio poroso a peso constante a 105°C por 2 h.
2. Llevar la cápsula a peso constante a 105°C por dos horas.
3. Llevar el filtro Gooch a peso constante a 105°C por 2 horas.

Método:

4. Pesar aproximadamente 0.5 g de muestra (Pm).
5. Pasar a un tubo de ensaye con rosca.
6. Añadir 10 ml de agua destilada al tubo.
7. Colocar la muestra 24 horas en un baño a 60 °C.
8. Filtrar y lavar la muestra con 10 ml de agua destilada, se registra el peso.
9. Llevar a sequedad por 12 h (Pex).
10. Registrar el peso.

$$\% \Delta P = \frac{P_m - P_{ex}}{P_m} \times 100 \quad (5)$$

### *Determinación de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas*

Se pesó 1 g de BAg y Op en una cápsula de porcelana llevada a peso constante previamente dentro de un horno a 105 °C por 12 horas. Se dejó enfriar la cápsula a temperatura ambiente dentro de un desecador. Se registró el peso y el porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a la ecuación 6. Los sólidos totales se calcularon de acuerdo a la ecuación 7. Para la determinación de sólidos volátiles y cenizas, la misma muestra seca se calcinó a 550 °C por 6 h en una mufla y se pesó después de enfriarse a temperatura ambiente en un desecador.

$$\% \text{Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100 \quad (6)$$

$$\% \text{ST} = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100 \quad (7)$$

$$\%SV = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_0} \times 100 \quad (8)$$

$$\%cenizas = \frac{P_3 - P_0}{P_2 - P_0} \times 100 \quad (9)$$

#### *Análisis térmico gravimétrico (TGA)*

El análisis térmico gravimétrico se realizó para determinar la estabilidad térmica de los sustratos pretratados y sin pretratar con la finalidad de ver la estabilidad por tratamiento térmico. Las curvas de TGA se obtuvieron utilizando 3.00 mg de muestra como masa de la muestra inicial. Las muestras se midieron con un analizador térmico Q 500, TA Instruments con un intervalo de temperatura de 25-700 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de argón.

#### *Difracción de rayos-X*

La difracción de rayos X se realizó con la finalidad de ver las fases cristalinas de la biomasa, en los pretratamientos que se realizaron. Por otro lado, esta técnica sirvió para evaluar la remoción de compuestos cristalinos, específicamente el oxalato de calcio. Las muestras se analizaron en un difractómetro de rayos X Siemens D5000 a temperatura ambiente con radiación monocromática CuK $\alpha$  en un rango 2 $\theta$  de 10 a 50° con un tamaño de paso de 0.0167° de acuerdo los parámetros establecidos por Pérez-Pimienta *et al.*, 2016.

#### *Nitrógeno Kjeldahl total*

La determinación de nitrógeno total Kjeldahl se realizó mediante una digestión al descomponer el nitrógeno en los sustratos vegetales utilizando una solución de ácido concentrado.

#### *Análisis elemental (C, H, N, S)*

El análisis elemental se realizó de muestras de BAg y Op molidas y secas en el Instituto Tecnológico de Durango. Las fracciones en masa de C, H, N y S se

determinaron utilizando un analizador elemental Perkin Elmer 240. Mientras que el O fue determinado por diferencia de %.

### 6.3. Actividad 2. Remoción y recuperación de oxalato de calcio en BAg y Op

#### 6.3.1. Propósito

Efectuar la remoción de oxalato de calcio y realizar la cuantificación del mismo, mediante un pretratamiento químico a condiciones severas.

#### 6.3.2. Diseño de experimentos

Se evaluó el contenido de oxalato de calcio en BAg y Op así como la concentración de azúcares reductores obtenidos con la finalidad de ver el poder de severidad del procedimiento. Mientras que la eliminación del oxalato de calcio en la biomasa se evaluó por difracción de rayos X y se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

#### 6.3.3. Programa de seguimiento y análisis

Los experimentos se realizaron por triplicado para ambos materiales antes de ser sometidos a hidrólisis ácida. Se tomaron 2 mL de muestra para cuantificación de azúcares y oxalato de calcio, en la Tabla 8 se muestra el programa de seguimiento y análisis.

**Tabla 8. Programa de seguimiento y análisis**

<b>Parámetro y análisis</b>	<b>Técnica o método</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cristalinidad</b>	DRX	Lote, ensayos	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2016)
<b>Oxalato de calcio</b>	HPLC	Lote	
<b>Azúcares reductores</b>	Miller (DNS)	Lote, ensayos	(Saqib & Whitney, 2011)

#### 6.3.4. Métodos y procedimientos

##### *Remoción de oxalato de calcio*

La remoción de oxalato de calcio se realizó sometiendo 5 g del material vegetal a 50 ml de una solución de ácido HCL 2 M en botellas serológicas a 80 °C por 30 min con agitación manual por triplicado. Una fracción líquida de 2 mL se llevó a centrifugación a 10000 rpm por 10 min en una microcentrífuga (MICROMAX RF 120, Inglaterra), para la cuantificación de oxalato de calcio y azúcares reductores (Wahsh *et al.*, 2012; Ávila-Lara *et al.*, 2015; Contreras-Padilla *et al.*, 2011; Pérez-Pimienta *et al.*, 2016). Los triplicados se filtraron a vacío a través de papel filtro Whatman N° 1 haciendo un solo lavado con 400 mL de agua caliente para eliminar trazas de ácido y sales que hayan quedado en la biomasa filtrada, la fracción líquida se llevó a evaporación mientras que la biomasa se secó a 55°C y se almacenó para la etapa de sacarificación enzimática (Ávila-Lara *et al.*, 2015).

##### *Determinación de azúcares reductores*

Los monosacáridos a partir del hidrolizado tienen la capacidad de oxidarse y reducir el ácido 3,5-dinitrosalícílico en condiciones alcalinas (Saqib & Whitney, 2011). Esta reducción se nota por la producción de una coloración amarilla la cual es más intensa a concentraciones altas de azúcares reductores. La técnica de Miller (DNS) es una técnica colorimétrica que cuantifica una concentración por absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 550 nm. Se realizó una curva de calibración de dextrosa al 0.1% como estándar. Se tomó 0.5 mL de hidrolizado previo a una dilución, se adicionó 1.5 ml de DNS y se homogenizó en un vortex (Scientific Industries, 51-0136, USA), se llevó a ebullición en baño María por 5 min. La reacción se detuvo por choque térmico y se dejó enfriar. Se agregó 3 mL de agua destilada. La concentración se cuantificó midiendo la absorbancia en un espectro uv-vis (HACH DR 6000, USA) a una longitud de onda de 550 nm.

##### *Recuperación de oxalato de calcio*

La obtención de oxalato de calcio se realizó evaporando el volumen de reacción de cada triplicado más el volumen de lavado. La fracción soluble se llevó a evaporación en un vaso de precipitado de 1000 mL dentro de un horno de secado

por convección a 80 °C por un periodo de 72 h. El sólido que se obtuvo se homogenizó y se almacenó en condiciones libres de humedad.

#### *Cuantificación de oxalato de calcio*

Para la cuantificación de oxalato de calcio las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga (MICROMAX RF 120, Inglaterra) y se filtraron en una membrana de acetato con un filtro de celulosa de tamaño de poro de 0.2 µm. Las muestras fueron ajustadas a un pH de 6 con una solución 4 M de NaOH y posteriormente, se analizaron por HPLC equipado con un detector de UV fijando una longitud de onda de 210 nm. La separación por cromatografía se llevó a cabo en una columna Grace Davison de 250 x 4.6 mm utilizando una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4mM a un flujo de 0.6 mL / min. La cantidad de ácido oxálico en cada muestra se determinó mediante una curva de calibración utilizando como estándar ácido oxálico (0 a 0.001 g/L). Todas las muestras fueron extraídas y analizadas por duplicado.

## 6.4. Actividad 3A. Pretratamiento ácido para BAg y Op

### 6.4.1. Propósito

Realizar hidrólisis ácida en muestras de BAg y Op con oxalato de calcio y sin oxalato de calcio evaluando la concentración de azúcares reductores como respuesta declarada en el diseño de experimentos.

### 6.4.2. Diseño de experimentos

Se realizaron dos ensayos por triplicados de hidrólisis ácida diluida, para BAg y Op. Los de BAg sirvieron como control inicial de la experimentación correspondiente, mientras que los ensayos de Op se realizaron con la finalidad de estimar los factores y niveles de diseños experimentales. Ambos sustratos se evaluaron bajo tres factores: carga de sólidos 8.5% p/p, concentración de ácido 2.1% p/p y tiempo de reacción 33.8 min siendo estas condiciones óptimas reportada para bagazo de agave como material recalcitrante (Ávila-Lara *et al.*, 2015). Para Op, se realizó un primer diseño  $2^3$  por duplicado para evaluar los efectos e interacciones de los factores de concentración de ácido, carga de sólidos y tiempo de reacción. Como respuesta al diseño fue la concentración de azúcares reductores (Tabla 9 y 10).

**Tabla 9. Condiciones experimentales del diseño factorial  $2^3$**

Factores	unidades	Niveles		
		-1	0	1
Concentración de ácido	% (p/p)	1	2	3
Tiempo de reacción	Min	25	45	65
Carga de sólidos	% (p/p)	4	8	12

**Tabla 10. Combinaciones del diseño de experimentos 2<sup>3</sup>**

<b>Corrida</b>	<b>Concentración de ácido (%p/p)</b>	<b>Tiempo de reacción (min)</b>	<b>Carga de sólidos (%p/p)</b>
1	1	25	4
2	1	25	4
3	3	25	4
4	3	25	4
5	1	65	4
6	1	65	4
7	3	65	4
8	3	65	4
9	1	25	12
10	1	25	12
11	3	25	12
12	3	25	12
13	1	65	12
14	1	65	12
15	3	65	12
16	3	65	12

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron se estableció un diseño de experimentos central compuesto (DCC) 2<sup>2</sup> con 4 puntos centrales y 4 axiales para encontrar una posible región de optimización. El tiempo de reacción fue de 33.8 minutos, tiempo medio para evitar incremento en costos de operación. (Tabla 11 y 12).

**Tabla 11. Factores y condiciones para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>**

Factores	Unidades	Condiciones				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Concentración de ácido	%p/p	0.5857	1	2	3	3.4142
Carga de sólidos	%p/p	2.3431	4	8	12	13.6469

**Tabla 12. Diseño central compuesto 2<sup>2</sup>**

Corridas	Concentración de ácido	Carga de sólidos
	%p/p	%p/p
1	1	4
2	3	4
3	1	12
4	3	12
5	0.59	8
6	3.41	8
7	2	2.34
8	2	13.66
9	2	8
10	2	8
11	2	8
12	2	8

De acuerdo al modelo estadístico del DCC, se realizó una trayectoria de máximo ascenso para incrementar la producción de azúcares reductores en el proceso de hidrólisis ácida, evaluando el efecto a altas cargas de sólidos, con la finalidad de determinar el alcance de Op en la generación de azúcares reductores, estimando el tamaño de paso para cada factor con los coeficientes del modelo estadístico obtenido (Tabla 13).



**Tabla 13. Factores y condiciones de la trayectoria de máximo ascenso**

<b>Pasos</b>	<b>Concentración de ácido (%p/p)</b>	<b>Carga de sólidos (%p/p)</b>
<b>0</b>	2	8
<b>1</b>	2.6	12
<b>2</b>	3.2	16
<b>3</b>	3.8	20
<b>4</b>	4.4	24
<b>5</b>	5.1	28
<b>6</b>	5.7	32
<b>7</b>	6.297	36
<b>8</b>	6.910	40
<b>9</b>	7.524	44
<b>10</b>	8.138	48

Los hidrólizados ácidos de BAg se obtuvieron de las condiciones utilizadas en los primeros ensayos (Tabla 14).

**Tabla 14. Factores y condiciones de la hidrólisis ácida diluída para BAg**

<b>Factores</b>	<b>Unidades</b>	<b>Condiciones</b>
<b>Concentración ácido</b>	%(p/p)	2.1
<b>Tiempo de reacción</b>	Min	33.8
<b>Carga de sólidos</b>	%(p/p)	8.5

La biomasa sin oxalato de calcio se sometió a las mejores condiciones determinadas para ambos sustratos evaluando las concentraciones finales de azúcares para su posible utilización en fermentaciones. Las condiciones de remoción de oxalato fueron las mismas que en la actividad 6.3.

#### 6.4.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 15 se refieren los diferentes tipos y análisis que se requieren para la etapa de hidrólisis ácida.

**Tabla 15. Programa de seguimiento y análisis para la etapa de hidrólisis ácida**

<b>Parámetro y análisis</b>	<b>Técnica o método</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>Azúcares reductores</b>	Miller, (DNS)	Lote, ensayos	(Saqib & Whitney, 2011)
<b>Cristalinidad</b>	Difracción de rayos X	Lote	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2016)
<b>Monosacáridos constituyentes</b>	HPLC	Ensayos	(Sluiter <i>et al.</i> , 2008)
<b>Análisis Térmogravimétrico</b>	Térmico	Lote	(Ávila-Lara <i>et al.</i> , 2015)

Nota: HPLC (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia)

#### 6.4.4. Métodos y procedimientos.

Las hidrólisis ácidas se realizaron en botellas serológicas con un volumen de reacción de 25 mL. Las condiciones de hidrólisis fueron a 120 °C en una autoclave. Se tomó una alícuota de 1.5 mL la cual se centrifugo y el sobrenadante se guardó en refrigeración para su análisis. La biomasa se filtró en papale Whatman N°1, la fracción líquida se llevó a refrigeración para su uso en fermentaciones, mientras que la fracción sólida se lavó con 400 mL de agua destilada caliente. Se llevó a sequedad a una temperatura de 55 °C por 24 h se homogenizó y se almacenó en un lugar seco y libre de humedad para la etapa de sacarificación.

## 6.5. Actividad 3B. Hidrólisis enzimática para BAg y Op

### 6.5.1. Propósito

Realizar hidrólisis enzimática en muestras de biomasa obtenida del proceso para BAg y Op.

### 6.5.2. Diseño de experimentos

Se realizó la sacarificación enzimática con las biomasa obtenidas del tren de tratamiento tanto para BAg y Op. Se planteó un diseño de experimentos factorial general 2x4 evaluando el tipo de sustrato (2 niveles) y el tipo de biomasa (4 niveles) de acuerdo a la Tabla 16. La respuesta al diseño establecido fue la concentración de azúcares reductores. Los experimentos se realizaron por duplicado.

**Tabla 16. Ensayos de experimentos para los tipos de biomasa**

Ensayos	Sustrato	Tipo de biomasa
1	Op -	$\beta$ 1- Biomasa cruda
2	Op -	$\beta$ 2- Biomasa HA
3	Op -	$\beta$ 3- Biomasa Remoxcal
4	Op -	$\beta$ 4- Biomasa Remoxcal + HA
5	- BAg	$\beta$ 1*-Biomasa cruda
6	- BAg	$\beta$ 2*-Biomasa HA
7	- BAg	$\beta$ 3*-Biomasa remoxcal
8	- BAg	$\beta$ 4*-Biomasa Remoxcal + HA

### 6.5.3. Programa de seguimiento y análisis

La Tabla 17 refiere los diferentes tipos de análisis que se realizan para la etapa de sacarificación enzimática.

**Tabla 17. Programa de seguimiento y análisis para la etapa de sacarificación**

Parámetro y análisis	Técnica o método	Frecuencia	Referencia
<b>Azúcares</b>	Miller (DNS)	Tiempo=0, 4, 20, 40, 60, 80	(Saqib & Whitney, 2011)
<b>FPU</b>	Miller (DNS)	Ensayo	(Union, Pure, & Chemistry, 1987)
<b>Xilanasas</b>	Miller (DNS)	Ensayo	

#### 6.5.4. Métodos y procedimientos

La sacarificación enzimática se llevó a cabo por una mezcla de enzimas comerciales Novozymes Cellic HTec<sub>2</sub> las cuales fueron donadas por el Dr. José Antonio Pérez Pimienta (Departamento de ingeniería química, Universidad Autónoma de Nayarit).

##### *Caracterización de enzimas (FPU, xilanasas)*

La actividad enzimática fue guiada de acuerdo a la metodología de Ghose (Union *et al.*, 1987). Los ensayos se realizaron por triplicado.

##### *Actividad enzimática en papel filtro (FPU)*

Se colocaron 50 mg de sustrato (tiras de papel filtro 1 x 6 cm), 1.5 mL de amortiguador citrato de pH 4.5 y de 20 a 100  $\mu$ L de la dilución respectiva de cada coctel enzimáticos. Se incubó la mezcla a 50°C por 1 h, la reacción se detuvo por choque térmico, posteriormente se adicionó 3 mL de DNS. A continuación, se puso a ebullición por 5 min deteniendo la reacción con 20 mL de agua destilada, la lectura de absorbancia fue a 550 nm contra un testigo de reactivo (sin coctel enzimático y sustrato), un testigo de enzima (sin sustrato). Una unidad de FPU esta expresada en  $\mu$ mol de glucosa liberada por min. La actividad enzimática se determinó por la ecuación 10.

$$FPU = \frac{2}{\frac{0.18 \cdot 60 \cdot V_{ENZ}}{100 \cdot D}} \quad (10)$$

Dónde:

$V_{ENZ}$  = Volumen de enzima diluida

$D$  = Factor de dilución

La composición y preparación de las soluciones utilizadas en este ensayo fueron las siguientes:

a) Regulador citrato 0.05 M y pH 4.8 se preparó a partir de un regulador citrato 1 M de composición:

A: Ácido cítrico monohidratado

B: Hidróxido de sodio

Para preparar 200 mL de regulador citrato 1 M se ponen 42 g de A en 150 mL de agua destilada y 10-12 g de hidróxido de sodio y se afora a 200 mL. Se mide el pH y si es necesario se ajusta a 4.5 con hidróxido de sodio o ácido cítrico 3 M.

#### *Actividad de xilanasas*

Se colocaron 300  $\mu$ L de sustrato (xilana al 1%), 200  $\mu$ L de regulador citrato de pH 4.5 y 500  $\mu$ L de enzima diluida respectivamente. Se incubó la mezcla a 40°C por 10 min. La reacción se detuvo por choque térmico y adicionando 1.5 ml de DNS. Posteriormente se puso a ebullición por 5 min, la reacción se detuvo por choque térmico y adicionando 2 mL de agua destilada y se evaluó la absorbancia a 550 nm contra un testigo reactivo (sin enzima y sin sustrato), un testigo de enzima (sin sustrato) y un testigo sustrato (sin enzima).

Una unidad de actividad de xilanasas está representada en  $\mu$ mol de xilosa liberada por minuto bajo las condiciones del ensayo, usando xilosa como estándar en el intervalo de 0-300  $\mu$ g. La actividad D- xiloanólítica (actividad de xilanasas) se determinó por la ecuación 11.

$$IU = \frac{Ar}{\frac{PM_{glucosa} * 10}{0.5 * D}} \quad (11)$$

Dónde:

$Ar$  = Azúcares reductores

$PM_{glucosa}$  = Peso molecular de la glucosa

$D$  = Factor de dilución

La composición y preparación de las soluciones utilizadas en este ensayo fueron las mismas que para FPU.

#### *Sacarificación enzimática*

Los ensayos de sacarificación se realizaron por duplicado con una mezcla de los cocteles enzimáticos ya mencionados y caracterizados. La carga de enzima fue de 35 FPU y 60 IU respectivamente para los tipos de bioma señalados en la Tabla 16. La sacarificación enzimática se realizó en tubos Falcon de 50 mL. Las condiciones de operación fueron 55 °C y 150 rpm en un amortiguador de citratos a 50 mM y pH

de 4.8. Se utilizó una carga de sólidos del 6%, de biomasa. El volumen de sacarificación fue de 25 mL.

## 6.6. Actividad 4. Producción de ácido succínico a partir de los hidrolizados del proceso

### 6.6.1. Propósito

Producir ácido succínico usando los hidrolizados obtenidos del tren de pretratamiento para Op y BAg.

### 6.6.2. Diseño de experimentos

Se realizó la producción de ácido succínico con hidrolizados ácidos o enzimáticos de acuerdo a la Fig. 10. Se planteó un diseño de experimentos factorial general 2x5 evaluando el tipo de biomasa (2 niveles) y tipo de pretratamiento (5 niveles) de acuerdo con la Tabla 18. La respuesta al diseño establecido fue la concentración de ácido succínico final y el rendimiento. Los experimentos se realizaron por duplicado.

**Tabla 18. Diseño de experimentos para la producción de ácido succínico a partir de hidrolizados de Op y BAg**

Ensayo	Sustrato	Tipo de hidrolizado
1	Op	- $\gamma_0$ – Fracción líquida de sustrato SE
2	Op	- $\gamma_1$ – Fracción líquida HA
3	Op	- $\gamma_2$ – Fracción líquida de sustrato HA + SE
4	Op	- $\gamma_3$ – Fracción líquida de sustrato Remoxcal + SE
5	Op	- $\gamma_4$ – Fracción líquida de sustrato Remoxcal + HA + SE
6	-	BAg $\gamma_0^*$ – Fracción líquida de sustrato SE
7	-	BAg $\gamma_1^*$ – Fracción líquida HA
8	-	BAg $\gamma_2^*$ – Fracción líquida de sustrato HA + SE
9	-	BAg $\gamma_3^*$ – Fracción líquida de sustrato Remoxcal + SE
10	-	BAg $\gamma_4^*$ – Fracción líquida de sustrato Remoxcal + HA + SE

### 6.6.3. Programa de seguimiento y análisis

La Tabla 19 refiere los diferentes tipos de análisis que se realizaron para la etapa de producción de ácido succínico.

**Tabla 19. Programa de seguimiento y análisis**

Parámetro	Frecuencia	Método	Referencia
<b>Ácido succínico</b>	Tiempo: 0, 8, 12, 20, 26 h	HPLC	(Corona-González <i>et al.</i> , 2016)
<b>Monosacáridos</b>	Lote	HPLC	(Corona-González <i>et al.</i> , 2016)
<b>Crecimiento celular</b>	Tiempo: 0, 8, 12, 20, 26 h	UV-vis	(Salvachúa <i>et al.</i> , 2016)
<b>Azúcares reductores</b>	Tiempo: 0, 26 h	Miller	(Union <i>et al.</i> , 1987)
<b>Producción de azúcares iniciales</b>	Lote	UV-vis	-
<b>Rendimiento de ácido succínico</b>	Lote	-	-

### 6.6.4. Métodos y procedimientos

#### *Reactivación de la cepa*

Para este trabajo se utilizó *A. succinogenes* CD0BB-1991, cepa que fue donada por el Dr. Héctor M. Poggi Varaldo a partir de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV. Su reactivación se realizó en cajas Petri conteniendo medio sólido a 40 g/L de agar de caldo de soya tripticaseína (AST) enriquecido con 3% de glucosa durante 72 h a 37 °C, conservando la cepa por resiembra cada semana.

A partir de la reactivación en cajas Petri se realizaron inoculaciones en tubos de ensaye con rosca, raspando las cajas Petri con puntas de micropipeta estériles para extraer una buena cantidad de colonias resuspendiéndolas en un volumen de 20 mL de caldo de soya tripticaseína (CST) enriquecido con 3% de glucosa dejándolos incubar durante un periodo de 48 h a 37°C y 150 rpm. Posteriormente a la activación de *A. succinogenes*, se realizaron cultivos en botellas serológicas con CTS incubándolas por 48 h a 37°C y 150 rpm. Estas

botellas serológicas se mantuvieron en refrigeración por no más de 48 h antes de ser usadas como inóculo para las fermentaciones (Corona-González *et al.* 2008; Salvachúa *et al.*, 2016).

#### *Preparación de sustratos*

Los hidrolizados ácidos se obtuvieron de las mejores condiciones encontradas en la actividad 3A ajustando la carga de sólidos para producir 25 g/L de azúcares reductores. Mientras que los enzimáticos fueron obtenidos de la actividad 3B del tiempo final a la sacarificación evaluando el rendimiento ( $y$ ) (ecuación 12) así como el rendimiento acumulado ( $y_{\text{acumulado}}$ ) (ecuación 13) de los azúcares reductores obtenidos. Los hidrolizados ácidos se sometieron a un tratamiento de destoxificación con 2% de carbón activado (Dąbrowski *et al.*, 2005) y se llevaron a agitación por 2 h. Posteriormente se filtraron en un crisol Gooch y un filtro Whatman de microfibra de vidrio de 21 mm. Mientras que los hidrolizados enzimáticos solo se llevaron a filtración para remover los sólidos sacarificados.

#### *Producción de ácido succínico*

El ácido succínico se produjo a partir de *A. succinogenes* por la fermentación de los hidrolizados de BAg y Op obtenidos del tren de tratamiento (Fig. 10), con un volumen de 25 mL en botellas serológicas. Los hidrolizados ácidos y enzimáticos se completaron con los siguientes compuestos para tener una concentración final en el medio en g/L de 10 de extracto de levadura, 10 de NaHCO<sub>3</sub>, 1 de NaCl 0.05 de MgSO<sub>4</sub>, 6.4 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 15.4 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Las botellas serológicas con el medio MS fueron esterilizadas en autoclave por 15 min a 120 °C. Se llevó un control de medio enriquecido con glucosa a 20 g/L. Los experimentos se realizaron por duplicado bajo las condiciones de pH 7, 37 °C y 150 rpm de agitación. Las botellas serológicas se burbujearon con CO<sub>2</sub> previo a la esterilización. Ajustando el pH si es necesario con una solución 2M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

$$y = \frac{\text{Producción}}{ST} \quad (12)$$

$$Y_{\text{acumulada}} = Y_{\text{producto1}} - Y_{\text{producto2}} \quad (13)$$



Dónde:

$y$  = rendimiento

$y_{acumulada}$  = rendimiento acumulado

$CST$  = Carga de sólidos

*Cuantificación de ácido succínico.*

Para la cuantificación de ácido succínico, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se recogió y se filtró en una membrana de acetato con filtro de celulosa de 0.2  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se analizaron por HPLC equipado con un detector de índice de refracción (IR). Se usó una pre-columna Agilent Technologies PL Hi-plex H de 50 x 7.7 mm y una columna Hi-plex H de 300 x 7.7 mm a una temperatura de 60°C con una fase móvil de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5mM a un flujo de 0.6 mL/min. La temperatura del IR fue de 50°C, el tiempo de retención se ajustó a 20 min.

## 7. Resultados

### 7.1. Actividad 1. Técnicas de caracterización de sustrato para la producción de ácido succínico

Las características de los sustratos se muestran en la Tabla 20 mientras que el análisis elemental la Tabla 21.

**Tabla 20. Características principales de los sustratos**

<b>Parámetros</b>	<b>BAG</b>	<b>Op</b>
<b>Sólidos totales (%)</b>	95.91	92.57
<b>Cenizas (%)</b>	5.33	22.36
<b>Sólidos volátiles (%)</b>	94.66	77.63
<b>Hemicelulosa (%)</b>	22.32	19.06
<b>Lignina (%)</b>	15.78	7.00
<b>Celulosa (%)</b>	51.14	19.92
<b>Extractivos (%)</b>	13.40	30.64
<b>Nitrógeno Kjeldahl total</b>	0.47	1.65
<b>Proteínas (%)</b>	2.94	10.32

**Tabla 21. Análisis elemental C, H, N, S, O**

<b>Elemento</b>	<b>BAG</b>	<b>Op</b>
<b>N (%)</b>	0.537	1.905
<b>C (%)</b>	43.019	36.824
<b>H (%)</b>	5.542	5.359
<b>S (%)</b>	0.173	0
<b>O (%)</b>	50.729	55.912

BAG y Op comparado con otros estudios varían ampliamente debido a diferentes plantas y edades, condiciones de crecimiento así como los métodos analitos utilizados. En general, BAG muestra una fracción de masa mayor que Op en peso

seco. La fracción másica de la lignina de Op es 7%, mucho menor que BAg ambos valores están dentro de lo reportado por Yang *et al.*, 2015 en general, la fracción másica de lignina en ambos sustratos son generalmente comparables con materias primas herbáceas (9-18%). Por ejemplo: *Miscanthus, switchgrass* y rastrojo de maíz y estando por debajo de las materias primas leñosas (21-32%) como pino, eucalipto, álamo.

La fracción másica de celulosa en BAg es aprox. 31% mayor que Op, mientras que la fracción másica de hemicelulosa es 3% mayor en BAg que en Op. El contenido de cenizas y extractivos son mayores en Op que en BAg, posiblemente debido al alto contenido de iones orgánicos y sales como el oxalato de calcio ( $\text{Ca}_2^+$ - oxalato), compuesto que está presente en ambos materiales vegetales. Comparado con caracterizaciones recientes el BAg de este trabajo tiene un contenido de celulosa mayo en un 25%, un contenido de lignina en el rango reportado de 15 a 17%, mientras que la hemicelulosa se encuentra entre lo reportado. Por otro lado, Op tuvo un porcentaje en peso mayor en celulosa con un 6% al igual que la hemicelulosa mientras que la lignina está en el rango reportado de 7 a 12% aproximadamente, a lo reportado por Yang *et al.*, 2015.

En cuanto al análisis elemental las fracciones másicas fueron similares para BAg y Op, sin embargo, BAg mostró una fracción másica en C mayor que Op. Ambos materiales vegetales muestran valores similares a las fracciones másicas de materias primas de biomasa herbácea y leñosa en cuestión al *C, H, O*, que por lo regular tienen composiciones elementales de 45-50% de *C*, 6-7% de *H*, 40-46% de *O* y otras trazas. En este trabajo el contenido de *O*, es mayor ya que al no ser evaluado en el análisis elemental se obtuvo por diferencia de los elementos evaluados pero es importante considerar el contenido de iones metálicos como trazas (Yang *et al.*, 2015). La fracción másica de *S* es mayor en BAg que Op pero menores a lo reportado por Yang *et al.*, 2015 (0.19-0.33%) en este mismo tipo de materiales.

La presencia de este elemento se atribuye posiblemente a impactos en la contaminación del aire sin embargo es notable señalar que el contenido de *S* también puede deberse a los enlaces de aminoácidos en las proteínas ya que

ambos materiales muestras contenidos proteicos importantes por lo que el contenido de S puede atribuirse a las proteínas presentes en BAg.

Estos datos resultan ser información importante antes de desarrollar procedimientos de conversión de biomasa a bioproductos, ya que la fracción másica elemental puede afectar procesos posteriores. Por ejemplo, el S puede causar corrosión en reactores o afectación en las enzimas durante procesos enzimáticos.

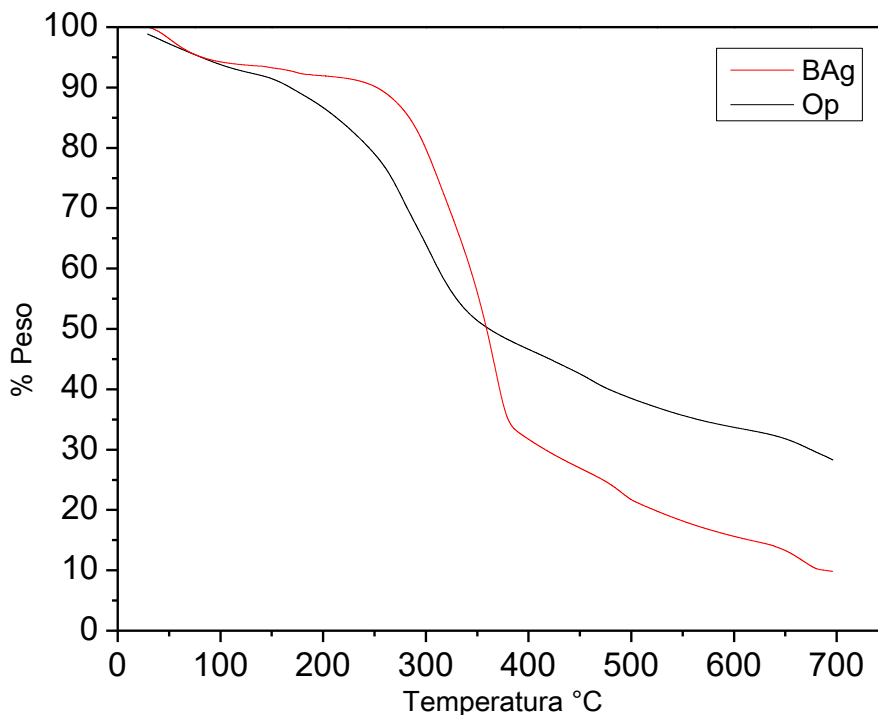
### *Análisis termogravimétrico*

Las muestras de BAg y Op sin pretratar se analizaron termogravimétricamente. La Figura 11 muestra la pérdida de peso. Ambos TGA exhiben tres regiones de descomposición con algunas pérdidas de peso inicial de 50 a 125 °C principalmente a la evaporación del agua. Para la muestra de BAg, en el intervalo de 125 hasta 200 °C se observó una estabilidad térmica mientras que Op presenta una pérdida de peso desde 125 hasta 350°C; probablemente debido a que Op no es un material recalcitrante y su resistencia térmica es menor que BAg.

Op muestran % de peso menores que BAg probablemente al contenido de carbohidratos estructurales específicamente a la hemicelulosa la cual es mayor en BAg que en Op de acuerdo a la caracterización previa.

La despolimerización térmica de la hemicelulosa y el rompimiento de los enlaces glucosídicos de la celulosa ocurre en la región de 220-350 °C para BAg, respecto a Op se encuentran en la región de 200-310°C aproximadamente.

Mientras que la lignina comienza a descomponerse desde los 200 a 700 °C debido a las diferentes actividades de los enlaces químicos presentes en la estructura. Por último la degradación de la celulosa se presenta en el rango de temperatura de 275-400°C para BAg mientras que para Op se encuentran en los 250-375 °C. La etapa de descomposición de las muestras se completó para Op por encima de los 390°C y para BAg por encima de los 400°C donde se produce una pérdida de peso debido a la termólisis de los residuos que contienen carbono (Ávila-Lara *et al.*, 2015; Fisher, Hajaligol *et al.*, 2002).



**Figura 11. Curvas de TGA de muestras seleccionadas pretratadas y no tratadas**

#### *Difracción de Rayos X*

Los patrones de difracción de rayos X (XRD) de BAg y Op se muestran en la Figura 12 A y B respectivamente. En trabajos previos se ha informado que la cristalinidad de la biomasa celulósica y las estructuras cristalinas de CaOX afecta la sacarificación enzimática y su eficiencia (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016). Se ha demostrado que varios pretratamientos cambian la cristalinidad de la celulosa y su estructura en la biomasa alterando enlaces hidrógenos de la fibra de la celulosa. En el patrón de difracción de BAg (Figura 12 A) revela señales pronunciadas en el  $2\theta=15^\circ$ ,  $24^\circ$ ,  $30^\circ$  correspondientes al CaOX en el plano reticular (101), (020) y (202) en una estructura monoclinica (sistema cristalino con eje binario, un plano perpendicular a el eje binario y un centro invertido). La eficiencia del proceso de Remoxcal puede confirmarse de acuerdo al patrón de difracción de BAg-Remoxcal donde se ve una notable reducción de cada una de las señales de CaOX. Por otro lado, la Figura 12 B muestra el patrón de difracción de Op. La presencia de

material orgánico no permite revelar claramente las señales características de estructuras cristalinas presentes en Op, debido a que el material es amorfo. Tenuemente se alcanzan a detectar las señales características correspondientes al CaOx en los mismos grados que para BAg, sin embargo, la señal de este compuesto es baja debido a la presencia de otros compuestos de calcio y otros elementos.

El difractograma de Op hidrólizado (Op-H) revela un aumento de la cristalinidad de la celulosa en el ángulo  $2\theta = 15-20^\circ$ , disminuye la partes amorfas de la biomasa aumentando la cristalinidad del CaOX, permitiendo visualizar otros compuestos tales como: oxido de magnesio, bicarbonato de calcio y magnesio, peroxidifosfato de potasio y fairchildita con señales características en el ángulo  $2\theta = 40-60^\circ$  aproximadamente, siendo estas señales poco pronunciadas debido al alto contenido de material orgánico aun presente en la biomasa. Por otro lado, el difractograma de Op sin oxalato de calcio (Op-Remoxcal) revela la ausencia de señal de la estructura cristalina de CaOx así como del otro compuesto mencionado evaluando la eficiencia del Remoxcal como tratamiento de oxalato total.

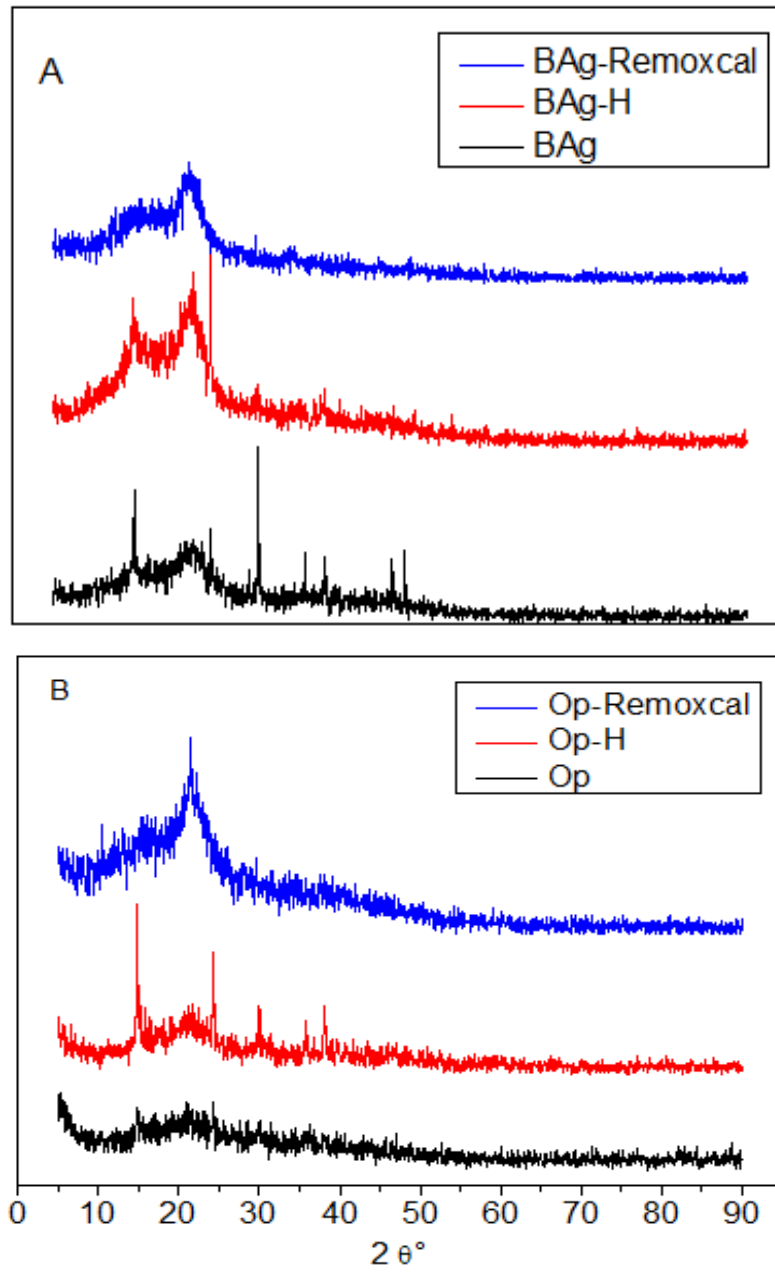
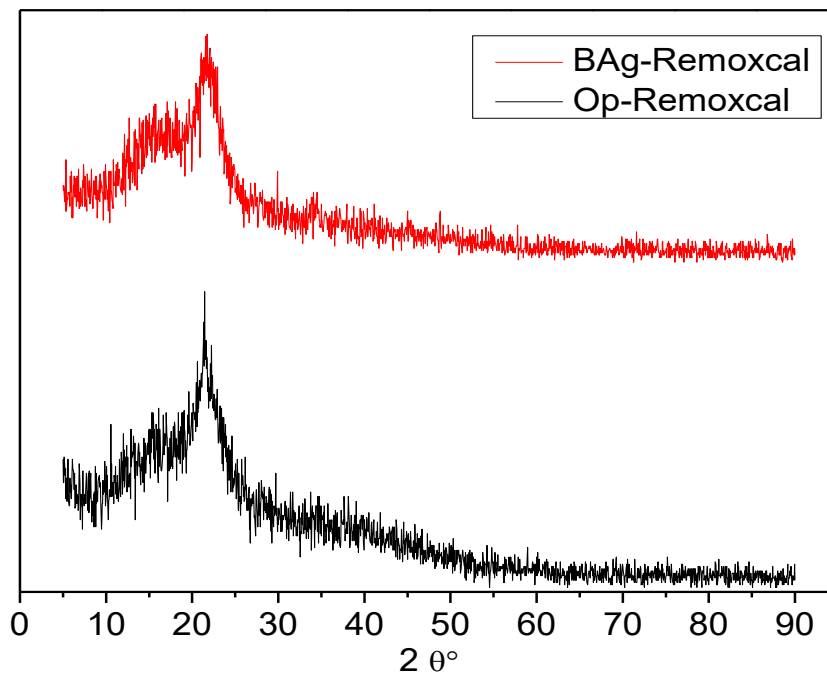


Figura 12. Difractograma de rayos X A) BAg, B) Op

## 7.2. Actividad 2. Remoción y recuperación de oxalato de calcio en BAg y Op

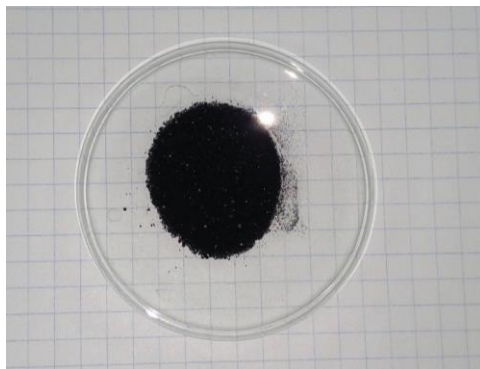
En la Figura 13 se muestra los difractograma de las muestras de BAg y Op como variable cualitativa al proceso de Remoxcal donde es evidente una reducción en cada una de las señales características de CaOx, descritas en los resultados de la actividad 1.



**Figura 13. Difractograma de Op y BAg en proceso de Remoxcal.**

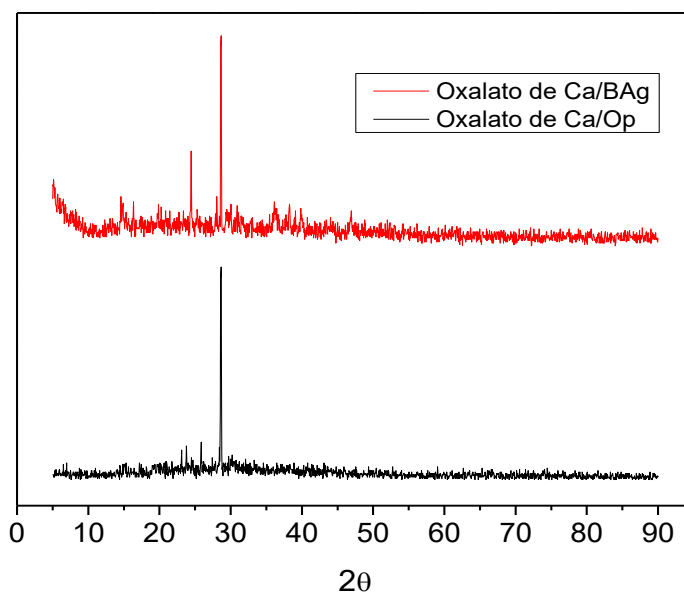


En cuanto a la recuperación del oxalato de calcio se obtuvo un sólido cristalino color negro con una recuperación de: 7.2 g para Op y 2.0 g para BAg (volumen de triplicados) (Figura 14).



**Figura 14. Sólido cristalino rico en oxalato de calcio.**

El sólido obtenido se analizó por difracción de rayos X, obteniendo las fases cristalinas correspondientes al oxalato de calcio corroborando la presencia de este compuesto en el sólido recuperado en el ángulo  $2\theta$  grados 15, 25, 30 aproximadamente, tal como se muestra en la en la Figura 15.



**Figura 15. Difractograma del sólido recuperado**

El sólido recuperado no muestra las características visuales del oxalato de calcio comercial ya que en este trabajo se está obteniendo a partir de una matriz compleja, en el sentido de que partimos de una solución líquida, ácida, con una alta cantidad de extractivos, azúcares y posiblemente biomasa. Por otro lado en la Tabla 22 muestra la concentración de azúcares y la cantidad de oxalato de calcio recuperado. La producción de azúcares fue baja por lo que no consideramos el proceso de remoción de oxalato de calcio como una hidrólisis.

**Tabla 22. Evaluación de parámetros del proceso de Remoxcal**

<b>Parámetro</b>	<b>BAg</b>	<b>Op</b>
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	1.616	2.985
<b>Oxalato de calcio total (%p/p)</b>	2.3-2.75	1-5

Se cuantificaron los azúcares reductores en la fracción líquida del proceso de Remoxcal para definir la severidad del proceso para la producción de azúcares fermentables, dicho proceso ocurre, ya que la producción de azúcares reductores en ambos materiales resultó ser baja de 1.6 y 2.9 g/L respectivamente. Esto debido a que la T durante este proceso (80°C) es menor que a las HA (120°C). Por lo tanto, este proceso se seleccionó como una operación más al tren de tratamiento convencional para eliminar compuestos cristalinos de la biomasa y hacerla más digerible en el proceso de sacarificación ya que estos compuestos, específicamente el oxalato de calcio, afecta negativamente un 39% la sacarificación enzimática (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).

### 7.3. Actividad 3A. Pretratamiento ácido para BAg y Op.

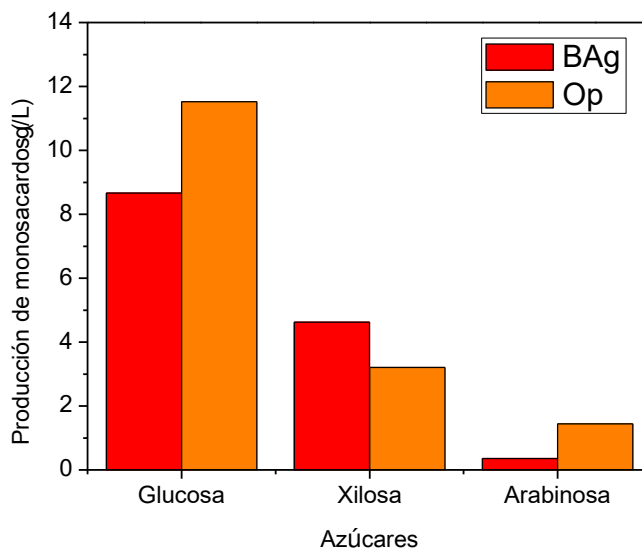
En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos a partir de los factores iniciales para biomasa recalcitrante (carga de sólidos 8.5% p/p, concentración de ácido 2.1% p/p y tiempo de reacción 33.8 min).

**Tabla 23. Tabla de resultados a los ensayos iniciales de hidrólisis ácida para BAg y Op.**

<b>Sustrato</b>	<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	<b>Recuperación de sólidos (%)</b>
<b>BAg</b>	13.24	59.60
<b>Op</b>	16.17	40.55

Los primeros ensayos muestran que Op tiende a liberar una mayor concentración de azúcares que BAg esto probablemente a que Op no es un material recalcitrante lo que permite aparte de la hidrólisis de la hemicelulosa la hidrólisis de ciertas partes de la celulosa. Por otro lado, se obtuvo la recuperación de sólidos en el tren que se plantea de biorrefinerías, parámetro importante ya que es la fracción insoluble que se llevó a sacarificar, BAg tiene el 60% de recuperación de la fracción sólida, aproximadamente el 20% más que la fracción sólida recuperada de Op (40%) esto debido probablemente a que Op tiene una mayor cantidad de extractivos que por acción del catalizador durante la hidrólisis estos son removidos.

En la Figura 16 se muestra la proporción de los monosacáridos liberados tras la hidrólisis en ambos sustratos teniendo contenidos xilosa, arabinosa y en mayor proporción glucosa atribuible a la solubilización de la hemicelulosa durante el proceso de HA.



**Figura 16. Gráfico de proporción de monosacáridos en etapa inicial de hidrólisis ácida**

Comparado con otros materiales como el bagazo de caña que produce 10.70 g/L nuestras producciones están por arriba de la reportada por Chandler *et al.*, 2012. Comparando el BAg y Op con biomasa de maderas nuestras concentración de azúcares reductores está por arriba del 50%, de acuerdo a Gómez *et al.*, 2013 que reporta para: Eucalyptus y Pinus con concentraciones de azúcares de 3.58 a 3.96 g/L. Salcedo *et al.*, 2010 reporta una concentración de 15 g/L de azúcares a partir de BAg siendo una concentración mayor a la obtenida en este trabajo por BAg pero no para Op sin embargo hay que considerar la temperatura de reacción Salcedo *et al.*, 2010 reporta una T de 151 °C mientras que en este trabajo la T fue de 120 °C, temperatura donde la recuperación de hidrólizados ácidos probablemente no presentan concentraciones altas de compuestos inhibitorios, ya que esta reportado que a partir de 140 °C la degradación de azúcares a compuestos como furfurales e hidroximetilfurfural es más probable. Compuestos que puedes ser perjudiciales a etapas como fermentaciones y procesos enzimáticos. Cabe mencionar que el tiempo de hidrólisis que Salcedo *et al.*, 2010 reporta es de 40 min realizado en dos etapas mientras que el tiempo de hidrólisis de este trabajo fue de 33.8 min en una sola etapa, tiempo medio para minimizar

gastos de operación lo cual, hace que el tiempo sea también un factor de maximizar la concentración de azúcares.

### *Diseño de experimento 2<sup>3</sup>*

Los datos experimentales se analizaron primero para obtener una ecuación de primer orden, incluyendo los términos de interacción entre las variables experimentales utilizando el programa estadístico Design-Expert. Se obtuvieron los modelos para la hidrólisis ácida que describen la concentración de azúcares en términos codificados de acuerdo al análisis estadístico de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 24. La ecuación que describe el modelo de la hidrólisis ácida en las condiciones ensayadas fue la siguiente:

$$\text{Concentración de azúcares reductores g/L} = + 9.16 + 2.51*A + 0.61*B + 2.95*C - 0.23*A*B + 0.22*A*B - 0.19*B*C - 1.10*A*B*C \quad (14)$$

Donde A, B y C son concentraciones de ácido, tiempo de retención y carga de sólidos, respectivamente.

**Tabla 24. Combinaciones del diseño de experimentos 2<sup>3</sup> y su respuesta**

<b>Corridas</b>	<b>Concentración %(p/p)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Carga de sólidos %(p/p)</b>	<b>Concentración de azúcares reductores (g/L)</b>
<b>1</b>	1	25	4	3.929
<b>2</b>	1	25	4	3.988
<b>3</b>	3	25	4	7.312
<b>4</b>	3	25	4	6.322
<b>5</b>	1	65	4	4.929
<b>6</b>	1	65	4	2.763
<b>7</b>	3	65	4	9.939
<b>8</b>	3	65	4	10.390

<b>9</b>	1	25	12	7.400
<b>10</b>	1	25	12	7.871
<b>11</b>	3	25	12	17.273
<b>12</b>	3	25	12	14.214
<b>13</b>	1	65	12	13.253
<b>14</b>	1	65	12	9.028
<b>15</b>	3	65	12	14.115
<b>16</b>	3	65	12	13.742

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para probar la significancia del modelo desarrollado y los resultados se presentan en la Tabla 25.

**Tabla 25. Análisis de varianza del DE 2<sup>3</sup>**

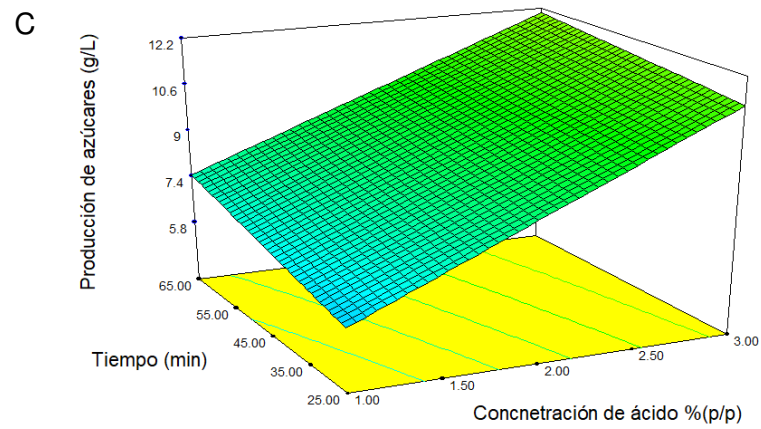
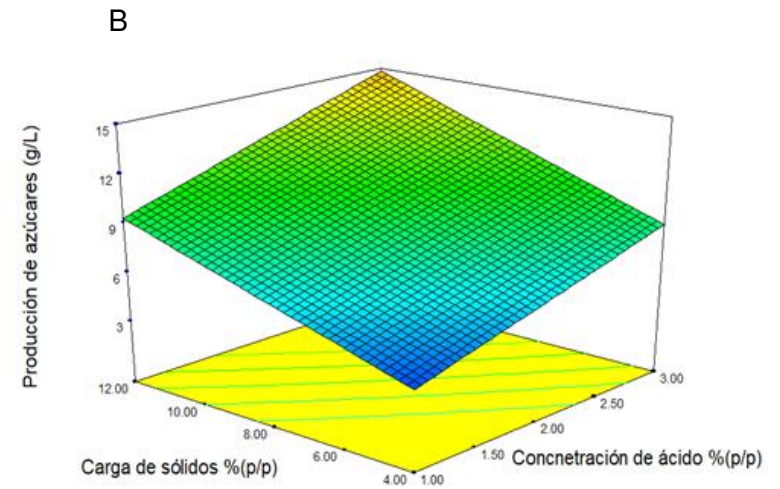
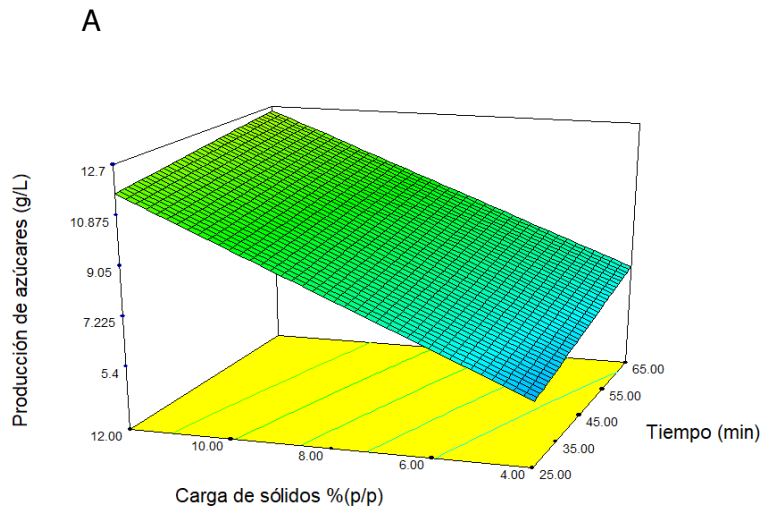
	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Prob > F	
<b>Modelo</b>	267.63	7	38.23	18.29	0.0002	Significativo
<b>A-Concentración</b>	100.44	1	100.44	48.05	0.0001	
<b>B-Tiempo</b>	5.99	1	5.99	2.87	0.1289	
<b>C-Carga de sólidos</b>	139.62	1	139.62	66.80	< 0.0001	
<b>AB</b>	0.84	1	0.84	0.40	0.5444	
<b>AC</b>	0.76	1	0.76	0.37	0.5621	
<b>BC</b>	0.57	1	0.57	0.27	0.6144	
<b>ABC</b>	19.40	1	19.40	9.28	0.0159	
<b>Error puro</b>	16.72	8	2.09			
<b>Total</b>	284.35	15				

Si un valor de  $\text{Prob}>F$ ) es inferior a 0.05, un modelo se considera significativo, lo que indica solo una probabilidad del 5% de que el modelo pueda presentar error debido a ruido (Ávila-Lara *et al.*, 2015). El modelo de hidrólisis ácida para Op describe efectivamente la respuesta con un valor de F 0.0002. Además los valores de  $\text{Prob}>F$  para cada término del modelo sugieren que A y C son significativos mientras que B (tiempo) no lo es, por lo que se estimó un tiempo medio para las corridas experimentales de 33.8 min para diseños posteriores, tiempo que permite mitigar gastos y tiempos de operación.

El efecto de la concentración de ácido y el tiempo de reacción de la hidrólisis ácida de Op se muestra en la Figura 17 B mediante tiempos de reacción cortos y concentraciones bajas la concentración de azúcares reductores es baja, mientras que a tiempos largos y concentraciones altas la concentración de azúcares tiende a aumentar encontrando un punto máximo de 12.5 g/L. Por otro lado, el efecto de la carga de sólido y tiempo de reacción se muestra en la Figura 17 A mediante tiempos cortos y cargas de sólidos bajas la concentración de azúcares reductores es bajas.

En cuanto a tiempos largos y cargas de sólidos bajas la concentración de azúcares reductores tiende a aumentar encontrándose el punto máximo a altas cargas de sólidos y tiempos largos con una concentración de azúcares reductores de hasta 13 g/L.

La Figura 17 C muestra el diagrama de superficie de respuesta que presenta el efecto de la concentración de ácido y la carga de sólido sobre la concentración de azúcares reductores muestra un área lineal, mucho más pronunciada que la figura 17 A, B con un punto máximo de 15 g/L en cargas de sólidos y concentración de ácido más altas.



**Figura 17. Superficies de respuesta A) carga de sólidos contra tiempo, B) tiempo contra concentración de ácido, C) carga de sólidos contra concentración.**



### *Diseño central compuesto (DCC) 2<sup>2</sup>*

Para esta etapa de diseño de experimentos los datos experimentales fueron analizados primero para obtener una posible región de optimización así como una ecuación de segundo orden.

Se incluyeron solamente los factores significativos resultantes del DEO 2<sup>3</sup> se utilizó el mismo software Design-Expert para evaluar las interacciones de los dos factores y el modelo obtenido en términos codificados que describe la concentración de azúcares reductores basado en el análisis estadístico de los datos experimentales que se muestra en la Tabla 26.

La ecuación final para el DCC en términos codificados fue la siguiente:

$$\text{Concentración de azúcares: } + 10.21 + 2.46*A + 1.59*B + 1.28*A*B - 0.38*A^2 - 0.73*B^2 \quad (15)$$

**Tabla 26. Matriz de diseño experimental de DCC 2<sup>2</sup> y respuesta.**

<b>Corridas</b>	<b>Carga de sólidos % (p/p)</b>	<b>Concentración de ácido % (p/p)</b>	<b>Producción de azúcares reductores (g/L)</b>
<b>1</b>	4	1	7.18
<b>2</b>	12	1	8.98
<b>3</b>	4	3	6.78
<b>4</b>	12	3	13.71
<b>5</b>	2.34	2	5.51
<b>6</b>	13.66	2	13.24
<b>7</b>	8	0.59	5.713
<b>8</b>	8	3.41	11.64
<b>9</b>	8	2	10.013
<b>10</b>	8	2	10.913
<b>11</b>	8	2	9.81
<b>12</b>	8	2	10.11

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para probar la significancia de los factores del modelo desarrollado y los resultados se presentan en la Tabla 27.

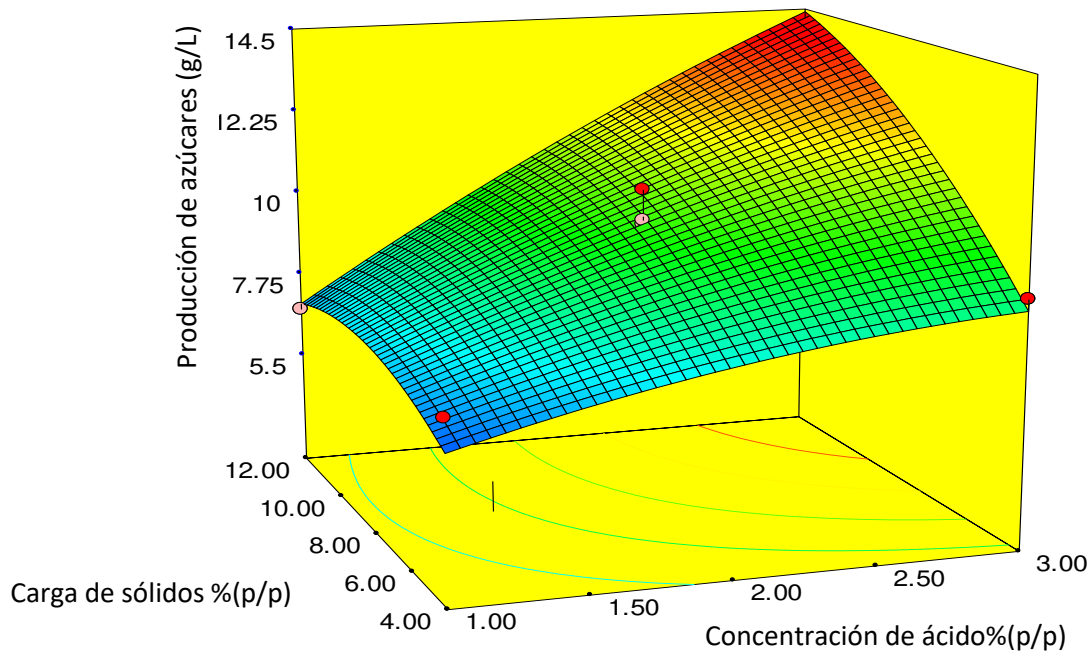
**Tabla 27. Análisis de varianza del DEO 2<sup>3</sup>**

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	valor de F	Prob > F	
<b>Modelo</b>	78.93	5	15.79	27.85	0.0004	Significativo
<b>A-Concentración</b>	48.32	1	48.32	85.26	< 0.0001	
<b>C-Carga de sólidos</b>	20.21	1	20.21	35.66	0.0010	
<b>AB</b>	6.58	1	6.58	11.61	0.0144	
<b>A<sup>2</sup></b>	0.94	1	0.94	1.66	0.2454	
<b>B<sup>2</sup></b>	3.44	1	3.44	6.07	0.0489	
<b>Curvatura</b>	2.70	3	0.90	23.86	0.1484	Significativo
<b>Error puro</b>	0.70	3	0.23			
<b>Total</b>	82.33	11				

El modelo obtenido a partir del DCC describe efectivamente la respuesta con un valor de Prob>F= 0.0004. Además los valores de Prob>F para cada término del modelo sugieren que A y C son significativos. El modelo ajusta los puntos centrales de mejor manera que el diseño 2<sup>3</sup> como se muestra en la Figura 18.

La Figura 18 muestra la superficie de respuesta del DCC en la cual no se encontró una región de optimización, muestra una ligera curvatura con un buen ajuste de los puntos centrales. Cabe destacar que el comportamiento de la concentración de azúcares tiende a aumentar encontrando un punto máximo al 12 % de sólidos y 3 % de concentración de ácido con una concentración de 14.5 aproximadamente.

Debido al comportamiento que se obtuvo y al ajuste del modelo cuadrático, propuso incrementar la concentración de azúcares, por el procedimiento de la trayectoria de máximo ascenso.

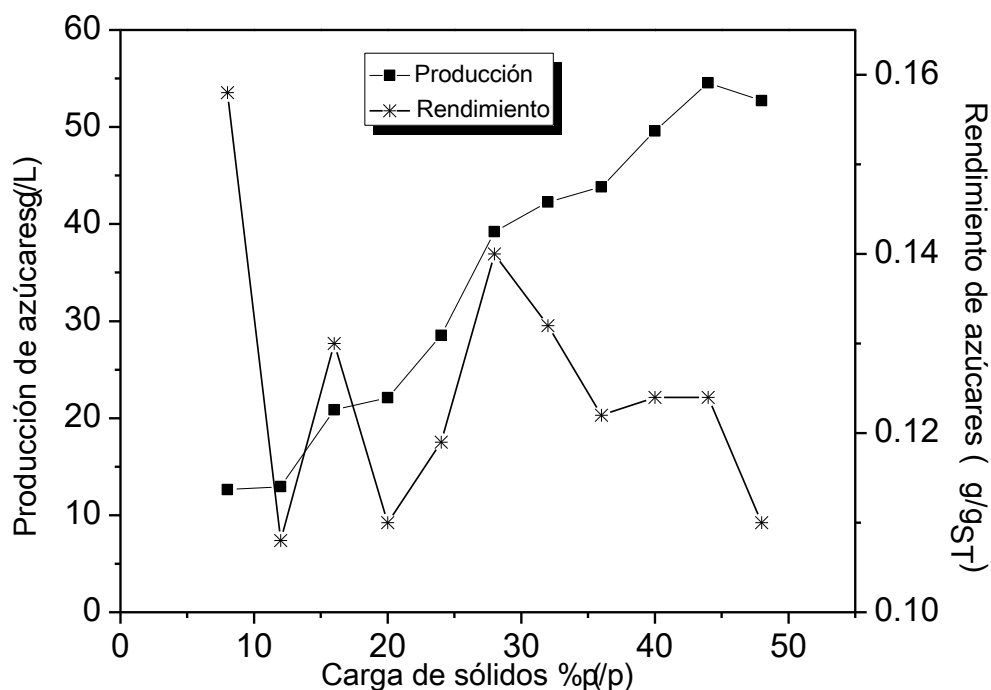


**Figura 18. Diagrama de superficie de respuesta que muestra los efectos de la carga de sólidos y la concentración de ácido**

#### *Trayectoria de máximo ascenso*

A partir del modelo estadístico obtenido de los diseños de experimentos se realizó una trayectoria de máximo ascenso con la finalidad de incrementar la concentración de azúcares y encontrar las mejores condiciones de obtención de los mismos para llevarlos a fermentación. En la Figura 19 se muestra el comportamiento de los azúcares en función a la carga de sólidos y concentración de ácido, mostrando un punto de inflexión en la carga de 45 a 50 %p/p, punto que dio pauta a detener la trayectoria de máximo ascenso. Otro punto que delimito la trayectoria de máximo ascenso fue que a partir del 24% de sólidos el sistema de trabajo se volvía muy complicado de trabajar ya que la biomasa se convertía en un

especie de semi-sólido y era difícil de extraer los hidrolizados así como el rendimiento de azúcares reductores el cual se ve afectado negativamente al ir aumentando la carga de sólidos.



**Figura 19. Trayectoria de máximo ascenso de la hidrólisis ácida para Op en función a la producción y rendimiento de azúcares**

La Tabla 28 muestra las corridas experimentales que se realizaron para la trayectoria de máximo ascenso, esta técnica estadística fue de utilizada para ver el potencial de liberación de azúcares que tiene Op, logrando obtener concentraciones de azúcares de hasta 55 g/L.

**Tabla 28. Corridas experimentales de la trayectoria de máximo ascenso con sus respuestas**

N° de paso	Concentración de ácido (%p/p)	Carga de sólidos (%p/p)	Producción de azúcares reductores (g/L)	Producción de azúcares reductores (g/L)	Rendimiento (g/g <sub>ST</sub> )
			Predicha	Experimenta I	
0	2.000	8.0	9.209	12.645	0.158
1	2.614	12.0	13.081	12.954	0.108
2	3.228	16.0	17.743	20.871	0.130
3	3.841	20.0	23.195	22.106	0.111
4	4.455	24.0	29.437	28.537	0.119
5	5.069	28.0	36.468	39.214	0.140
6	5.683	32.0	44.289	42.253	0.132
7	6.297	36.0	52.900	43.812	0.122
8	6.910	40.0	62.301	49.596	0.124
9	7.524	44.0	72.492	54.557	0.124
10	8.138	48.0	83.472	52.704	0.110

#### 7.4. Actividad 3B. Hidrólisis enzimática para BAg y Op.

##### *Caracterización de enzimas*

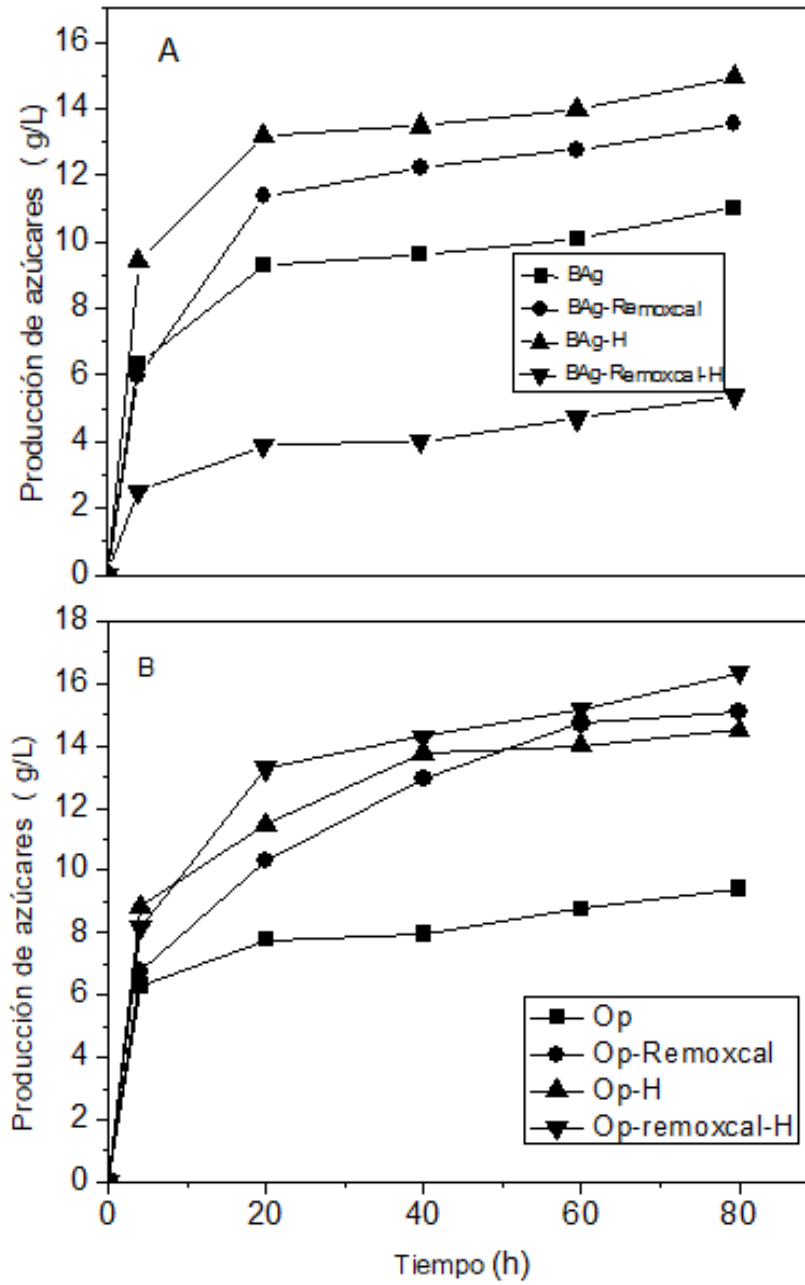
La Tabla 29 muestra la caracterización de los cocteles enzimáticos, basados en su actividad volumétrica de FPU y xilanasas.

**Tabla 29. Actividades enzimáticas.**

Enzimas	FPU/mL	UI/mL
CTec2	183.187	512.921
HTec2	83.230	515.173

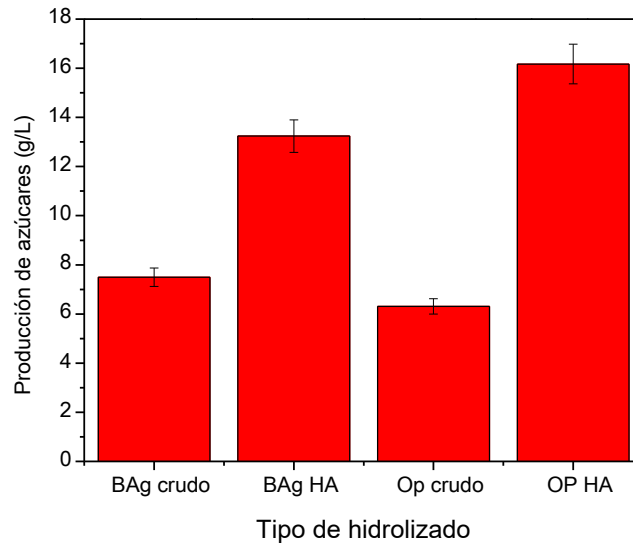
CTec2 presenta una actividad de FPU mayor que HTec2 debido a que CTec2 el rico en mayor proporción de células y tiene una menor proporción de xilanasas, por lo que la actividad de xilanasas es muy parecida a las de HTec2 el cual es un coctel enzimático rico en xilanasas es por ello que su actividad de FPU es muy baja.

Se comparó el comportamiento cinético de la producción de azúcares reductores de las diferentes biomásas obtenidas del proceso (Figura 20). Para ambos materiales se puede observar que la fase estacionaria se alcanzó hasta las 60 h de sacarificación ya que la variación de 60 a 80 h resulta ser muy baja. La Figura 21A corresponde a BAg donde la máxima producción de azúcares fue de 15 g/L a partir de BAg hidrolizado dejando claro que el proceso de HA es efectivo debido a que permite un incrementó del área superficial de la biomasa, genera un incremento en el volumen de poro y diámetro del mismo lo que permite una mejor accesibilidad a las enzimas (Ávila-Lara *et al.*, 2015). Por otro lado, la Figura 20B corresponde a Op un comportamiento similar a BAg estableciendo una fase estacionaria al mismo tiempo, la producción máxima de azúcares fue 16 g/L a partir de la biomasa obtenida de la unión de los procesos de Remoxcal e HA favoreciendo ambos procesos a la producción de azúcares para Op.



Figuras 20. Dinámica de producción de azúcares de (A) BAg y (B) Op

Se comparó la producción de azúcares reductores de los procesos ácidos y enzimáticos de Op y BAg de los materiales crudos (Figura 22).

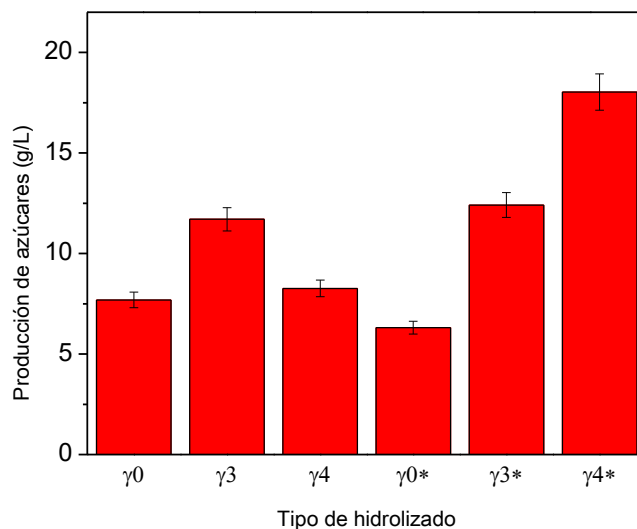


**Figura 21. Producción de azúcares reductores ácidos y enzimáticos a partir de material crudo**

La mayor concentración de azúcares reductores se presentaron en las HA con 16 y 15 g/L respectivamente, mientras que en los enzimáticos llegaron a 7 y 6 g/L en un tiempo de 80 h mientras que los ácidos se obtuvieron a 33.8 min teniendo un ahorro de tiempo considerable, sin embargo, la temperatura de obtención de los ácidos fue de 120°C mientras que los enzimáticos se obtuvieron a 55°C. lo que puede indicar un ahorro energético empleando estos últimos, por lo que se tiene que considerar un balance de energía. La baja concentración de azúcares enzimáticos puede deberse probablemente a la recalcitrancia del material y a la concentración de oxalato de calcio que llega a inhibir sitios activos para las enzimas. Por lo tanto, el someter a sacarificación BAg y Op sin tratamientos previos podría no ser lo más adecuado y efectivo para las enzimas. Razón por la cual se propuso una etapa de Remoxcal e hidrólisis ácida como alternativa de recuperación y aumento de azúcares en la fracción sólida para la sacarificación.



La Figura 22 muestra la producción de azúcares finales a partir de la hidrólisis enzimática de la fracción insoluble del proceso  $\Phi 1$ ,  $\Phi 3$  comparadas con  $\Phi 0$ .

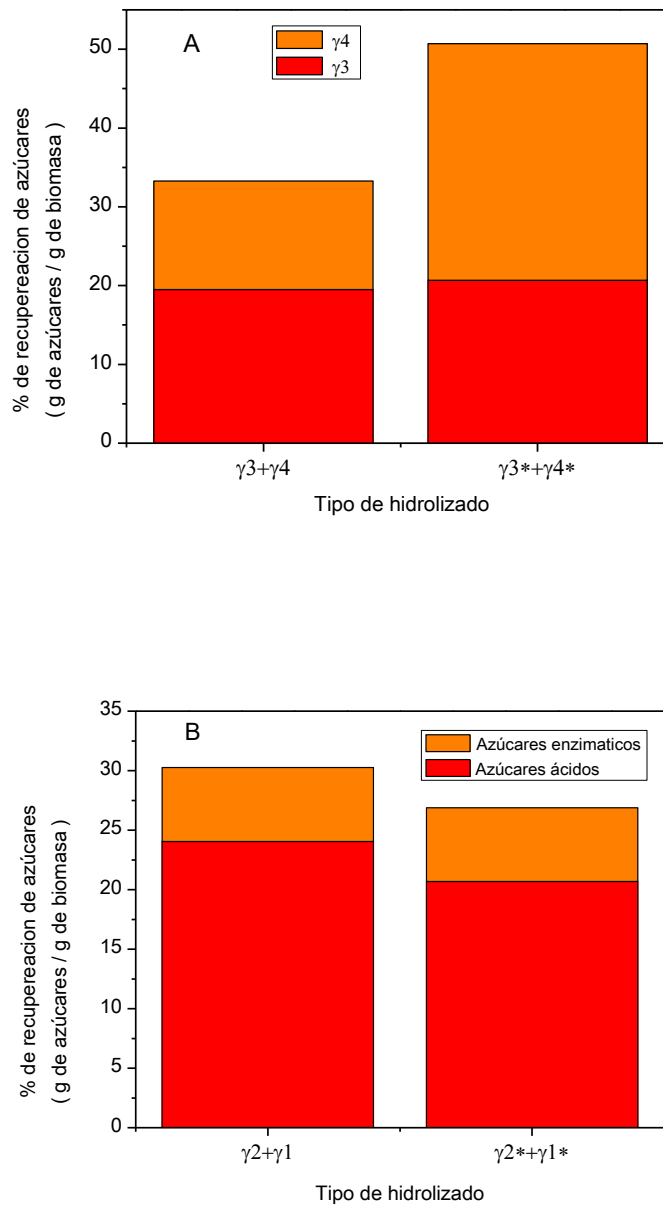


**Figura 22. Efecto de la remoción de oxalato de calcio en la producción de azúcares enzimáticos**

Todos los tratamientos en ambas biomazas tuvieron una influencia positiva sobre la producción de azúcares enzimáticos comparados con los resultados de la hidrólisis enzimática sobre los materiales crudos, muy probablemente debido a la mejora de la accesibilidad del sustrato a las enzimas y/o a la pérdida de la cristalinidad del sustrato. Para el caso de BAg el unir las etapa de Remoxcal con las de HA resulto ser negativo bajando la producción de 12 a 8 g/L. Por otro lado Op la producción de azúcares aumento un 50% de 6 a 12 g/L con respecto al material crudo. Mientras que la unión de los tratamiento de Remoxcal y HA aumentó la producción de azúcares hasta 18 g/L siendo esta la mejor mayor concentración obtenida en la etapa de sacarificación.

Se evaluó el rendimiento que se obtuvo adecuando procesos y biomazas iguales para comparar el aumento de estos durante la unión de procesos. La Figura 23 A muestra como el rendimiento acumulado de la sacarificación enzimática de azúcares en BAg fue menor comparado con Op, pues con este

ultimó material se tuvo una recuperación del 100% en  $\gamma_4^*$ . Adicionalmente al rendimiento obtenido por  $\gamma_3^*$ , mientras que BAg fue del 0% por que la concentración fue favorecida por la remoción de oxalato de calcio y no de la unión de los procesos  $\Phi_1$  y  $\Phi_3$ .



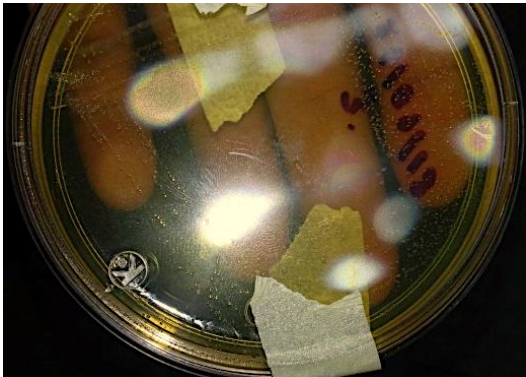
**Figura 23. Rendimiento acumulado A) Op y B) BAg**

## 7.5. Actividad 4. Producción de ácido succínico a partir de los hidrolizados del proceso.

### *Reactivación de la cepa*

El crecimiento de *A. succinogenes* en cajas Petri mostró que a las 24 h se presentaron colonias muy pequeñas menores a 1 mm de las cuales no se podían distinguir coloración (Figura 24 A). Tras la incubación a 72 h el número de colonias fue mayor lográndose ver y distinguir la coloración de estas. Cuya coloración resultó ser blanca grisácea y el tamaño de colonias no excedió de 1 mm (Figura 24 B).

A

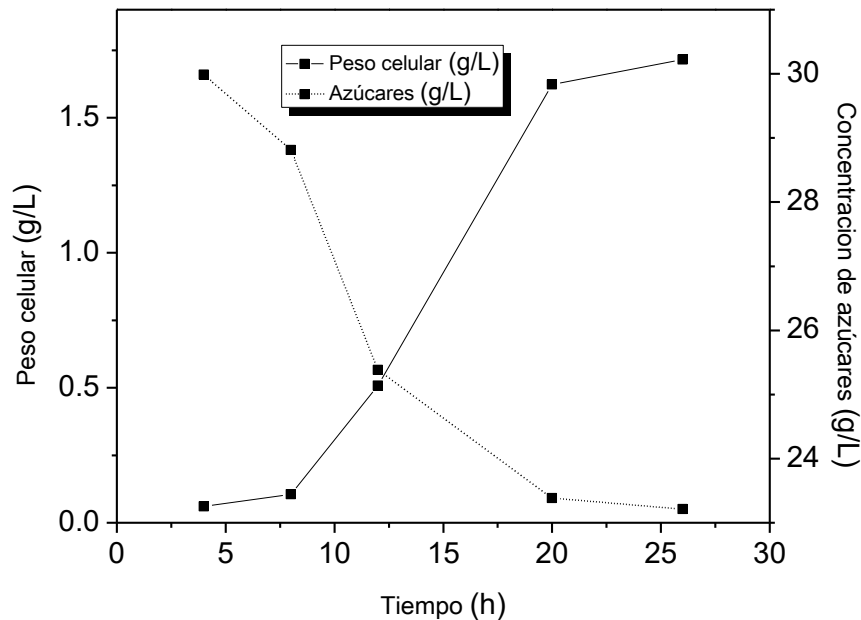


B



**Figura 24. Crecimiento de *A. succinogenes* A) 24 h, B) 72 h.**

Durante la reactivación en medio líquido realizado en tubos roscados se obtuvo un crecimiento celular de 0.56 g/L a las 48 h, siendo esta la cantidad aproximada de células de *A. succinogenes* que se inocularon en botellas serológicas, en la Figura 26 se muestra el crecimiento celular observado en los cultivos en medio líquido (botellas serológicas) como caracterización ya que estas botellas fueron nuestro inóculo madre.



**Figura 25. Cinética de crecimiento y consumo de azúcares para inoculo de fermentaciones**

*Actinobacillus succinogenes* presentó fase de latencia hasta las 9 h, tras la cual comenzó su fase exponencial, mantenida hasta las 20 h de cultivo. Su crecimiento máximo se observó hasta las 26 h, registrando un crecimiento celular de 1.8 g/L. se puede apreciar que la curva de crecimiento y consumo de azúcares mostraron un comportamiento espejo.

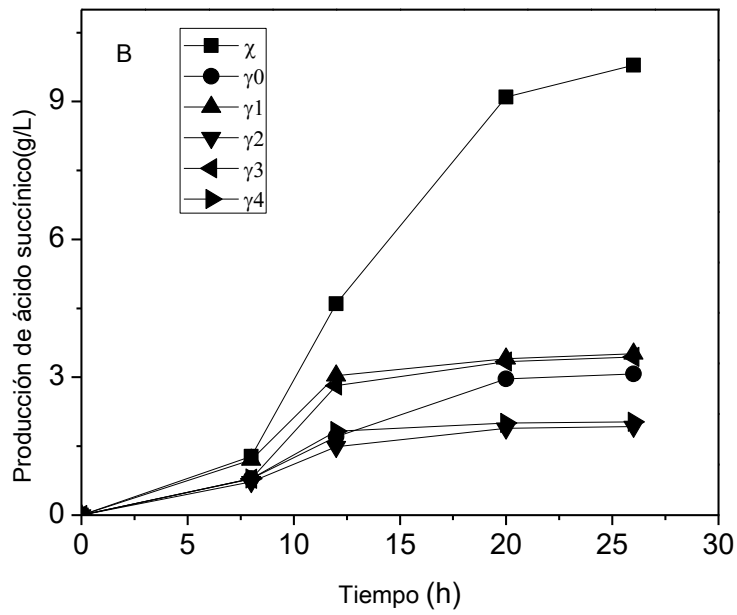
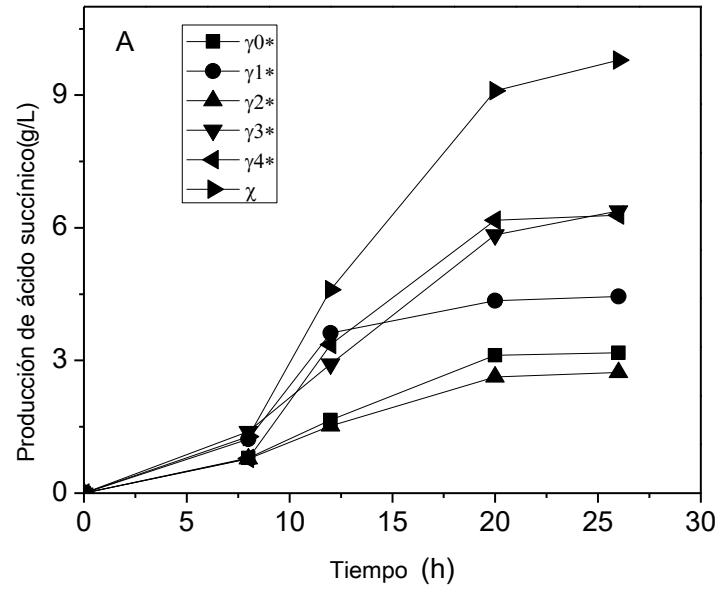
#### *Producción de ácido succínico*

La máxima producción de ácido succínico se obtuvo a partir de los hidrolizados enzimáticos de Op comparado con los de BAg (corrientes  $\Phi$  0,E - 3,E). Para el caso de Op la mayor producción de succínico fue de 6.2 g/L la cual se obtuvo a partir de  $\gamma$ 4\*, seguido de  $\gamma$ 3\* con una producción de 6 g/L (Figura 26 A). Esto fue un indicativo de los hidrolizados enzimáticos sin oxalato de calcio resultaron de mejor asimilación para *A. succinogenes*, comparado con los hidrolizados ácidos.

Para el caso de BAg las máximas producciones de ácido succínico se dieron a partir de los hidrolizados ácidos ( $\gamma$ 1) y los enzimáticos de biomas sin

oxalato de calcio ( $\gamma 3$ ) con una producción de 3 a 3.5 g/L respectivamente (Figura 26 B). En el caso de Op los hidrolizados enzimáticos resultaron de mejor asimilación que los hidrolizados ácido por la posible presencia de inhibidores. Encuentro a BAg los hidrolizados enzimáticos también fueron de mejor asimilación específicamente los que provenían de biomásas sin oxalato de calcio comparado con los hidrolizados ácidos tiene una diferencia de 0.5 g/L.

Sin embargo, la producción de succínico resultó muy baja dejando en claro que los hidrolizado ácidos y enzimáticos de BAg sin oxalato de calcio resultaron de mejor asimilación durante la fermentación, descartando los otros tipos de hidrolizado por la baja producción, lo cual se podría esperar por la concentración inicial de azúcares que se recuperaron de la sacarificación enzimática.



**Figura 26. Dinámica de producción de ácido succínico a partir de hidrolizados de A) Op y B) BAg.**

La Tabla 30 muestra la concentración inicial y final de azúcares reductores lo que da pauta a suponer que todos los sustratos que se evaluaron durante la fermentación fueron asimilados por *A. succinogenes*, independientemente de la concentración inicial.

**Tabla 30. Concentración inicial y final de sustrato de las fermentaciones.**

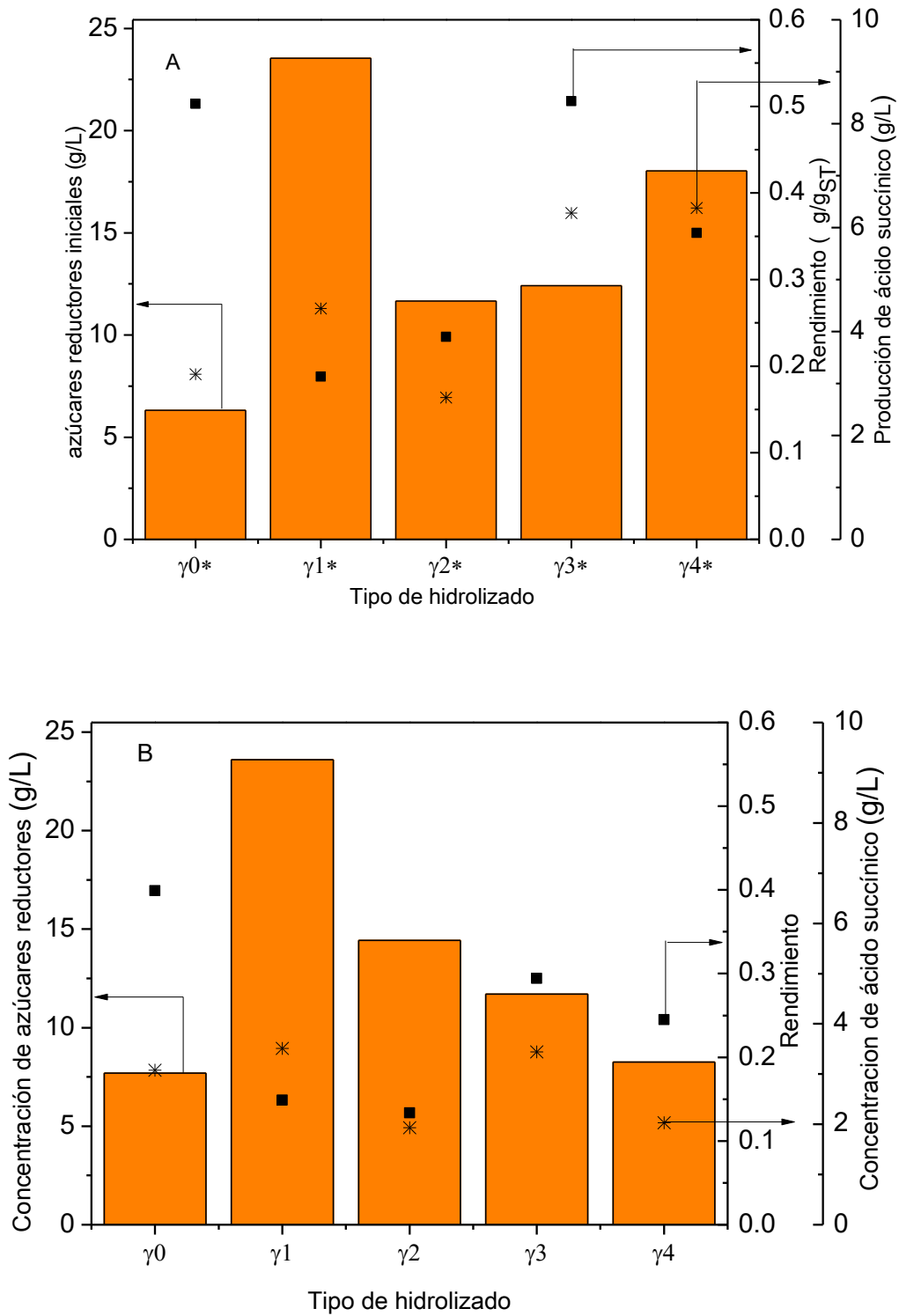
Hidrolizado	Concentración de azúcares reductores (g/L)	
	Inicial	final
$\gamma 0^*$	6.00	2.94
$\gamma 1^*$	23	8
$\gamma 2^*$	6.31	2.94
$\gamma 3^*$	12.40	6.40
$\gamma 4^*$	18	7.58
$\gamma 0$	7.69	4.06
$\gamma 1$	23.6	7.47
$\gamma 2$	14.4	5.77
$\gamma 3$	11.70	4.70
$\gamma 4$	9.60	3.75

Op demostró ser mejor sustrato de asimilación para la producción de succínico debido a que Op no resulta ser un desecho o subproducto de un proceso y lo podemos considerar como materia prima de primera generación, comparado con BAg el cual es un desecho de la industria tequilera aparte de esto el BAg es un material vegetal recalcitrante.

La Figura 27 muestra el rendimiento y la producción de ácido succínico a partir de las diferentes concentraciones iniciales de fermentación. La Figura 27 a corresponde a Op en este caso vemos como el rendimiento de ácido succínico aumentó a bajas concentraciones de azúcares reductores mientras que la producción de succínico bajo aprox. 3 g/L ( $\gamma 0^*$ ) al igual que  $\gamma 2^*$  pero con un rendimiento por debajo de 0.3 g/g<sub>ST</sub> y con una producción de succínico de 2.5 g/L. Para el caso de  $\gamma 3^*$  se obtuvo una producción de succínico alta de 6 g/L partiendo de una concentración inicial de azúcares intermedia siendo el rendimiento muy bueno de ca 0.5 g/g<sub>ST</sub> al igual que  $\gamma 0^*$ , siendo uno de los mejores sustratos comparados con los demás sustratos obtenidos en el proceso. Mientras que  $\gamma 4^*$

resulto ser el mejor sustrato para la producción de succínico obteniendo 6.3 g/L sin embargo, el rendimiento es 0.15 g/g<sub>ST</sub> menos que  $\gamma_3^*$  al igual que  $\gamma_1^*$ . Por otro lado la Figura 27B corresponde a BAg para este caso al igual que Op el rendimiento que succínico aumenta a medida que la concentración inicial de azúcares es menor ( $\gamma_0$ ) teniendo una producción de succínico de 3 g/L, siendo menor en comparación con  $\gamma_1$  y  $\gamma_3$ , hidrolizados con las producciones más altas de succínico de 3.5 y 4 g/L y rendimiento de 0.15 y 0.3 g/g<sub>ST</sub> respectivamente. Por otro lado, es importante destacar la producción y rendimiento más baja la cual corresponde a  $\gamma_2$  las con 2 g/L y 0.1 g/g<sub>ST</sub> respectivamente siendo el peor sustrato para la producción de succínico en BAg. Mientras que para  $\gamma_4$  se obtuvo una producción de succínico baja de 2 g/L h y un rendimiento intermedio comparado con los demás sustratos de 0.25 g/g<sub>ST</sub> debido a su baja concentración de azúcares inicial. Por lo tanto, los hidrolizados enzimáticos sin oxalato de calcio resultaron mejores que los ácidos con rendimientos y concentraciones mayores de 3 g/L y 0.3 g/g<sub>ST</sub> respectivamente.





**Figura 27. Comparación de rendimiento, producción de succínico y azúcares iniciales entre A) Op y B) BAg.**

## 8. Conclusión

- Op y BAg son sustratos con adecuada liberación de azúcares fermentables por tratamientos ácidos, siendo Op superior a BAg debido a la falta de recalcitrancia en Op, permitiendo una mejor accesibilidad y solubilidad de los polímeros estructurales de la biomasa.
- Es posible obtener altas concentraciones de azúcares reductores a altas concentraciones de ácido y sólidos, sin embargo se deben considerar otros elementos para definir condiciones óptimas para Op.
- Estadísticamente el tiempo no fue suficientemente significativo en los procesos de hidrólisis ácida para Op, seleccionando un tiempo intermedio para no incrementar gastos de operación.
- En base al DCC y TMA, se establecieron las condiciones de obtención de hidrolizados ácidos de Op que sirvieron como fuente de carbono para *A. succinogenes* (24% p/p, 4.45 % p/p).
- Se realizó la remoción de oxalato de calcio, comprobado cualitativamente por difracción de rayos X en la biomasa vegetal, por ausencia de señales cristalinas y en los evaporados teniendo presencia de estas señales.
- Op resultó ser un mejor sustrato que BAg en la producción de azúcares enzimáticos.
- Op fue un sustrato de mejor asimilación para *A. succinogenes* que BAg.
- Los hidrolizados enzimáticos en general fueron de mejor asimilación para *A. succinogenes*, comparado con los hidrolizados ácidos a excepción de los hidrolizados ácidos de BAg.
- Los hidrolizados obtenidos de biomasa sin oxalato de calcio en Op fueron de mejor asimilación para *A. succinogenes*.
- La recuperación de azúcares en Op fue favorecida por la unión de los procesos de Remoxcal y HA lo cual para BAg resultó no ser lo más favorecido siendo en este material el mejor proceso las HA.
- Fue factible la producción de ácido succínico hasta 6 g/L y 3 g/L a partir de hidrolizados enzimáticos de Op y BAg mediante el uso de *A. succinogenes*.

## 9. Referencias bibliográficas

- A. Al-Wahsh, I., Wu, Y., & Liebman, M. (2012). A Comparison of Two Extraction Methods for Food Oxalate Assessment. *Journal of Food Research*, 1(2), 233–239. <https://doi.org/10.5539/jfr.v1n2p233>
- A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. S., Slui, J., & ter, D. Templeton, and D. C. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: April 2008; Revision Date: July 2011 (Version 07-08-2011) - 42618.pdf. *Technical Report NREL/ TP -510 -42618*, (January), 1–15. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- AOAC. (1990). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 15th*(Volume 1), 136–138.
- APHA/AWWA/WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, 541. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>
- Ávila-Lara, A. I., Camberos-Flores, J. N., Mendoza-Pérez, J. A., Messina-Fernández, S. R., Saldaña-Duran, C. E., Jimenez-Ruiz, E. I., ... Pérez-Pimienta, J. A. (2015). Optimization of Alkaline and Dilute Acid Pretreatment of Agave Bagasse by Response Surface Methodology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00146>
- Axelsson, L., Franzén, M., Ostwald, M., Berndes, G., Lakshmi, G., & Ravindranath, N. H. (2012). Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J. S., Hodge, D. B., & Walton, J. D. (2011).

- Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: Effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-16>
- Beauprez, J. J., De Mey, M., & Soetaert, W. K. (2010). Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, 45(7), 1103–1114. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.035>
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 326–338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- Biddy, M. J., Scarlata, C., & Kinchin, C. (2016). Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential, (March). <https://doi.org/10.2172/1244312>
- Budzianowski, W. M. (2017). High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70(December 2015), 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.260>
- Bula García, C. (2011). Síntesis y caracterización de oxalatos de metales, 106.
- Cahue Morales, D., Calderón Ortiz, G., & Ruíz Pérez, A. (2006). Congreso Alimentación y Territorios, 7–27.
- Chandler, C., Villalobos, N., Gonzales, E., Arenas, E., Mármol, Z., & Ríos, J. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Revisata Multiciencias*, 12(3), 245–253.
- Chen, K. Q., Li, J., Ma, J. F., Jiang, M., Wei, P., Liu, Z. M., & Ying, H. J. (2011). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresource Technology*, 102(2), 1704–1708. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.011>

- Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M. I., Hernández-Quevedo, G., del Real, A., Rivera-Muñoz, E. M., & Rodríguez-García, M. E. (2011). Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.028>
- Contreras-Padilla, M., Rivera-Muñoz, E. M., Gutiérrez-Cortez, E., del López, A. R., & Rodríguez-García, M. E. (2015). Characterization of crystalline structures in *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Biological Physics*, *41*(1), 99–112. <https://doi.org/10.1007/s10867-014-9368-6>
- Corona-González, R. I., Bories, A., González-Álvarez, V., & Pelayo-Ortiz, C. (2008). Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. *Process Biochemistry*, *43*(10), 1047–1053. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.011>
- D, D. W. P. (2004). Definition of a standard biomass Definition of a standard biomass. *Contract*, 1–14.
- da Costa Sousa, L., Chundawat, S. P., Balan, V., & Dale, B. E. (2009). “Cradle-to-grave” assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.003>
- Dąbrowski, A., Podkościelny, P., Hubicki, Z., & Barczak, M. (2005). Adsorption of phenolic compounds by activated carbon - A critical review. *Chemosphere*, *58*(8), 1049–1070. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.067>
- David, J.-Z., & Abel Moreno Cárcamo. (2004). La Biomineralización Del Oxalato De Calcio En Plantas: Retos Y Potencial. *Reb*, *23*(1), 18–23.
- Draft. (2001). Method 1690 Ammonia-N in Water and Biosolids by Automated Colorimetry with Preliminary Distillation DRAFT January 2001 U . S . Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and

Technology Engineering and Analysis Division ( 4303 ). *Environmental Protection*, (January).

Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H. M., Ponce-Noyola, T., Ríos-Leal, E., Robles-Gonzalez, I., & Rinderknecht-Seijas, N. (2015). Saccharification of fermented residues as integral part in a conceptual hydrogen-producing biorefinery. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(48), 17200–17211. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.164>

Escamilla-Avarado, C. (2009). Proceso integrado para producción de energía y enzimas a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. *Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional; Departamento De Biotecnología Y Bioingeniería*.

Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., & Murali, N. (2006). Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy and Fuels*, 20(4), 1727–1737. <https://doi.org/10.1021/ef060097w>

Fisher, T., Hajaligol, M., Waymack, B., & Kellogg, D. (2002). Pyrolysis behavior and kinetics of biomass derived materials. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 62(2), 331–349. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(01\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(01)00129-2)

Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). CALCIUM OXALATE IN PLANTS: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>

Galati, E. M., Tripodo, M. M., Trovato, A., Miceli, N., & Monforte, M. T. (2002). Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter: Note I: Diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00337-3)

García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J., & Talavera-Magaña, D. (2010). El genero *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Edición*

*Especial*, 5(73), 109–129.

García, Y. G., Reynoso, O. G., & Arellano, J. N. (2005). Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *E-Gnosis*, 3(3), 0.

Gómez, E. A., Ríos, L. A., & Peña, J. D. (2013). Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. *Informacion Tecnologica*, 24(5), 113–122. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500013>

Guettler, M. V., Rumler, D., & Jainf, M. K. (1999). Succinic-Acid-Producing Strain From the Bovine Rurnen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 207–216.

Inguez-Fern´, R. N. D., Andez1, I. A.-V., Azquez2, J. J. C.-P., Erez1\*, J. S. W.-C., J. S. Alvarado-Gonz´ alez1, G. C., On-Dom´, ... Opez1La, E. I. E. N. (2011). Revista Mexicana de Ingenier´a Qu´ımica. *Revista Mexicana de Ingenier´a Qu´ımica*, 10(1), 17–28. <https://doi.org/CC BY-NC 3.0>

Isela Corona-González, R., Varela-Almanza, K. M., Arriola-Guevara, E., De Jesús Martínez-Gómez, Á., Pelayo-Ortiz, C., & Toriz, G. (2016). Bagasse hydrolyzates from Agave tequilana as substrates for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* in batch and repeated batch reactor. *Bioresource Technology*, 205, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.081>

Judprasong, K., Charoenkiatkul, S., Sungpuag, P., Vasanachitt, K., & Nakjamanong, Y. (2006). Total and soluble oxalate contents in Thai vegetables, cereal grains and legume seeds and their changes after cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.002>

Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and

applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>

Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y., Nghiem, L. D., Hai, F. I., ... Wu, Y. (2016). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 219, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.073>

Kokossis, A. C., & Yang, A. (2010). On the use of systems technologies and a systematic approach for the synthesis and the design of future biorefineries. *Computers & Chemical Engineering*, 34(9), 1397–1405.  
<https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.02.021>

Lee, P. C., Lee, W. G., Kwon, S., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1999). Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: Effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(8–9), 549–554. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00156-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00156-2)

Lencar, D. R. (2001). FOULING BY CALCIUM OXALATE IN AQUEOUS SOLUTION by A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
Department of Chemical and Biological Engineering, (1992).

Liu, Y., Zhang, C., Li, B., Li, H., & Zhan, H. (2015). Extraction and determination of total and soluble oxalate in pulping and papermaking raw materials. *BioResources*, 10(3), 4580–4587. <https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4580-4587>

Loayza, D. G., & Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*opuntia ficus.indica*) para el consumo humano. *Revista Sociedad Química Del Perú*, 73(1), 41–45.

McConn, M. M., & Nakata, P. A. (2004). Oxalate Reduces Calcium Availability in the Pads of the Prickly Pear Cactus through Formation of Calcium Oxalate Crystals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1371–1374.



<https://doi.org/10.1021/jf035332c>

- Medina, E. M. D., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2007). Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, *103*(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.064>
- Minocha, R., Chamberlain, B., Long, S., Turlapati, S. A., & Quigley, G. (2015). Extraction and estimation of the quantity of calcium oxalate crystals in the foliage of conifer and hardwood trees. *Tree Physiology*, *35*(5), 574–580. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv031>
- Nacional, U., México, A. De, Íñiguez, G., Parra, J., Velasco, P. A., Supproductos, U. D. E., ... Salto, S. A. D. C. V. C. (2006). Revista Internacional de Contaminación Ambiental BIOSÓLIDOS-BAGAZO DE AGAVE DURANTE EL COMPOSTAJE Nogales . Las Agujas , Mpio . de Zapopan , Jalisco . Apartado Postal 52-93 . Guadalajara 45020 Jalisco , México Universidad de Guadalajara , Departamento de , 22, 83–93.
- Odilia, A. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva*, *21*(273–277), 273–277.
- Pateraki, C., Patsalou, M., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Webb, C., Koutinas, A. A., & Koutinas, M. (2016). *Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, *112*, 285–303. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.005>
- Pérez-Pimienta, J. A., Lopez-Ortega, M. G., Varanasi, P., Stavila, V., Cheng, G., Singh, S., & Simmons, B. A. (2013). Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Bioresource Technology*, *127*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.124>
- Pérez-Pimienta, J. A., Poggi-Varaldo, H. M., Ponce-Noyola, T., Ramos-Valdivia, A. C., Chavez-Carvayar, J. A., Stavila, V., & Simmons, B. A. (2016). Fractional

pretreatment of raw and calcium oxalate-extracted agave bagasse using ionic liquid and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 91, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.001>

Pérez de Paz, P., & Medina, I. (1998). *Catálogo de las plantas medicinales de la flora canaria. Aplicaciones populares.*

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>

Press, A. I. N. (2004). Biomass equations for shrub species of Tamaulipan thornscrub of, 59, 657–674. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.02.010>

Ríos-Badrán, I. M., Santos-Cruz, J., & Gutiérrez-Antonio, C. (2017). Biocombustibles sólidos : una solución al calentamiento global. *Revista Ciencia*, 68(4), i1–i7.

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry*, 59(0), 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>

Salcedo, Luna, J., Castro, Montoya, A. J., Rico, J. L., Campos, García, J. (2010). Optimization of Acid Hydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), 91–97.

Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M. F. A., Nicol, W., Black, B. A., ... Beckham, G. T. (2016). Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0425-1>

Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748–4750. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>

- Song, H., Huh, Y. S., Lee, S. Y., Hong, W. H., & Hong, Y. K. (2007). Recovery of succinic acid produced by fermentation of a metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* strain. *Journal of Biotechnology*, *132*(4), 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.496>
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(3), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043>
- Sousa, D., Martínez-ávila, G. C. G., Monteiro-moreira, A. C. D. O., Noe, C., & Azevedo, R. (2010). Perspectivas Biotecnológicas de hemicelulosas vegetales. *Acta Química Mexicana*, *2*(4), 1–5.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresource Technology*, *83*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Talebna, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
- Union, I., Pure, O. F., & Chemistry, A. (1987). International Union of Pure Commission on Biotechnology \* Measurement of. *Pure and Applied Chemistry*, *59*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Urbance, S. E., Pometto, A. L., DiSpirito, A. A., & Denli, Y. (2004). Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(6), 664–670. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1634-2>
- Valdez, R., Blanco, F., Vázquez, R., & Magallanes, R. (2008). Producción Y Usos Del Nopal Para Verdura. *Vi Simposium Taller Produccion Y Aprovechamiento*

*Del Nopal En El Noresre De México*, 14, 1–19.

Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., & Siika-Aho, M. (2007).

*Biofuels. Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 108).

<https://doi.org/10.1007/978-3-540-73651-6>

Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J. A., Cushman, J. C., Tian, E., & Lin, H. (2015).

Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 76, 43–53.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.004>

Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y. S., Zhang, R., Jenkins, B. M., &

VanderGheynst, J. S. (2013). Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied Energy*, 105, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.070>