

**APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS GENERADOS EN PROCESOS
AGROINDUSTRIALES EN LA INDUSTRIA MEZCALERA**

EDNA CAROLINA GARZON ROCHA

MARIA CAMILA RODRIGUEZ LEITON

Proyecto integral de grado para optar al título de:

INGENIERO QUÍMICO

Director

DAVID LEONARDO SOTELO TOBON

Químico, MSc., cPhD.

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BOGOTA D.C.

2023

NOTA DE ACEPTACIÓN

David Leonardo Sotelo Tobón

Firma del Director

Jurado 1

Firma del Jurado

Jurado 2

Firma del Jurado

Bogotá D.C., junio de 2023.

DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente Institucional y Rector de Claustro

Dr. Mario Posada García-Peña

Consejero Institucional

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Investigaciones

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Vicerrector Administrativo y Financiero

Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro

Secretario General

Dra. José Luis Macías Rodríguez

Director de la facultad de Ingenierías

Dra. Nalily Patricia Guerra Prieto

Director del departamento de Ingeniería Química

Ing. Nubia Liliana Becerra

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Esta tesis es el resultado de un esfuerzo conjunto, en donde el amor, apoyo y animo fueron fundamentales para alcanzar esta meta. A ustedes les dedico este trabajo, que representa no solo mi esfuerzo y dedicación, sino también su cariño y sabiduría.

Me gustaría comenzar agradeciendo a mi tutor, David Sotelo, por su gran dedicación y guía en el desarrollo de este trabajo, su orientación, paciencia y sabiduría han sido invaluableles en este proceso.

A mi madre, Edna Garzón, por su amor incondicional y por su constante apoyo en cada una de las etapas de mi vida. Has sido mi fuente de inspiración y motivación en todo momento. A mi padrastro, Enrique Mojica, gracias por ser una figura paterna para mí y por su presencia constante en mi vida. Gracias por su apoyo y sabiduría. A mi hermano, David Mojica, por su amistad e incondicional apoyo, me siento afortunada de contar contigo como mi hermano y mi amigo. A mi abuelita, Isabel Rocha, por su amor y paciencia, por todo el apoyo que me ha brindado en todo este tiempo. Gracias por estar siempre presente y brindarme su cariño y apoyo.

A mis amigos y familia por su apoyo incondicional, su amor y su ánimo han sido una fuente constante de motivación para mí.

Por último, quiero agradecer a mi compañera y amiga en este proyecto, Camila Rodríguez. Gracias por tu amistad y por ser una compañera de trabajo increíble. Tu amistad es un tesoro invaluable, y me siento muy afortunada de haber tenido la oportunidad de haber trabajado contigo.

Edna Carolina Garzón Rocha

El presente trabajo de grado es el fruto de los últimos 5 años, en donde, el esfuerzo, dedicación y el apoyo brindado fueron los principales pilares para culminar el pregrado de la mejor manera. Es por esto que llena de alegría dedico este proyecto a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido una pieza fundamental en mi vida para seguir adelante.

A mi padre, Oscar Rodríguez que con su amor y dedicación hizo todo lo posible para cumplir uno de mis grandes sueños y convertirme en una profesional, infinitas gracias por ser el precursor de mis metas, por brindarme el amor más puro e incondicional, por creer en mis capacidades y por impulsarme a ser la mejor en todo lo que me proponga. A mi madre, Ximena Leitón que con su inmenso corazón siempre estuvo para mí, gracias por estar presente no solo en esta etapa de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome todo el amor, cariño y enseñándome todos los valores necesarios para convertirme en la mujer que soy ahora. A mi hermana, Daniela Rodríguez por ser mi compañera de vida, gracias por estar para mí cuando más lo necesito y por ayudarme cuando me siento atascada alentándome a siempre sacar lo mejor de mí, eres el mejor ejemplo a seguir.

También quiero dedicar el trabajo a nuestro tutor de tesis David Leonardo Sotelo que con su sabiduría pudo guiarnos de la mejor manera, impulsándonos a sacar lo mejor de cada una, gracias por la paciencia, por creer en nosotras y por ayudarnos a lograr que se cumpliera lo que en un momento solo fueron palabras.

A mi demás familia que, aunque se encuentran lejos de mí siempre me brindaron ese apoyo, que con cada llamada lograban impulsarme a ser mejor y a no rendirme. A mis amigos de carrera, gracias por todos los momentos de alegría, juntos llegamos hasta el final. A mi amiga, Daniela Jiménez que con su amistad tan incondicional logró hacer que estos 5 años sean memorables, gracias por cada palabra de aliento y por ayudarme a salir adelante.

Por último, quiero agradecer a mi amiga y compañera de trabajo Carolina Garzón con la cual estuve la mayoría de la carrera, tu amistad ha traído felicidad a mi vida. Gracias por tu dedicación y compromiso, hoy logramos lo que un día vimos lejano.

María Camila Rodríguez Leitón

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecerles a todas las personas que nos han apoyado y ayudado en el desarrollo de este proyecto, a cada una de nosotras por nuestra dedicación, esfuerzo y compromiso en la realización de este trabajo.

También queremos agradecer a nuestro tutor, David Sotelo, por su orientación y guía en todo este proceso. Gracias por compartir con nosotras su conocimiento y experiencia, y por su dedicación y apoyo.

A nuestras familias y amigos, gracias por su apoyo incondicional. Su amor y animo han sido una fuente constante de motivación para nosotras. Sus palabras de aliento y su amistad nos han inspirado y nos han dado la fuerza necesaria para seguir adelante.

A la Universidad de América infinitas gracias por el apoyo brindado para la ejecución de este proyecto, sin su colaboración no hubiera sido posible llevar a cabo todo lo planteado.

Al profesor Luis Alberto Ordaz, su equipo de trabajo y estudiantes, quienes nos abrieron las puertas en la Universidad Politécnica de Durango – México, de donde provino la materia prima para el desarrollo de este proyecto y nos recibieron en la ciudad de Durango para realizar la segunda fase experimental, brindándonos reactivos, equipos y recursos de sus laboratorios.

Gracias a todos ellos, hemos podido alcanzar esta meta. Les agradecemos de todo corazón su ayuda y por ser parte de nuestras vidas.

¡Gracias!

Edna Carolina Garzón Rocha - María Camila Rodríguez Leitón

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 Generalidades	18
1.1.1 <i>Celulosa</i>	18
1.1.2 <i>Hemicelulosa</i>	18
1.1.3 <i>Lignina</i>	19
1.1.4 <i>Azúcares reductores</i>	19
1.2 Agave	19
1.2.1 <i>Agave durangensis</i>	20
1.2.2 <i>Características de cultivo</i>	21
1.3 Producción de mezcal	23
1.3.1 <i>Residuos de la industria mezcalera</i>	25
1.4 Etanol	26
1.4.1 <i>Usos del etanol</i>	27
1.4.2 <i>Métodos de obtención de etanol</i>	28
1.5 Espectrofotometría UV-VIS	29
1.5.1 <i>Aplicaciones en la determinación de carbohidratos</i>	30
1.6 Hidrólisis de residuos lignocelulósicos	30
1.6.1 <i>Hidrólisis ácida</i>	30
1.6.2 <i>Hidrólisis enzimática</i>	31
1.6.3 <i>Hidrólisis básica/alcalina</i>	32
2. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.	33
2.1 Caracterización fisicoquímica del bagazo de <i>agave durangensis</i>	33
2.1.1 <i>Análisis de cenizas y humedad</i>	33
2.1.2 <i>Determinación de la materia orgánica (MO)</i>	36
2.1.3 <i>Determinación del carbono orgánico</i>	36
2.1.4 <i>Determinación de la conductividad eléctrica y pH</i>	37
2.1.5 <i>Determinación de la densidad aparente y real</i>	38

2.1.6 <i>Determinación de la porosidad</i>	40
2.2 Hidrólisis ácida	40
2.2.1 <i>Curva de calibración</i>	40
2.2.2 <i>Digestiones en la hidrólisis ácida</i>	45
2.3 Hidrólisis enzimática	53
2.3.1 <i>Cuantificación de proteínas</i>	53
2.3.2 <i>Actividad enzimática</i>	56
2.3.3 <i>Determinación de azúcares fermentables con hidrólisis enzimática</i>	59
2.4 Hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido	65
2.5 Fermentación de azúcares reductores	71
2.6 Rota evaporación para la obtención de etanol anhidro	74
2.6.1 <i>Primera rota evaporación</i>	75
2.6.2 <i>Segunda rota evaporación</i>	76
2.6.3 <i>Tercera rota evaporación</i>	77
2.7 Diseño de planta piloto del proceso de producción de bioetanol a partir de bagazo de agave <i>durangensis</i> .	79
2.7.1 <i>Generalidades del proceso</i>	80
2.7.2 <i>Descripción del proceso</i>	81
2.7.3 <i>Balance de masa</i>	87
3. CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFIA	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del bagazo de agave.	22
Tabla 2. Contenido de humedad.	33
Tabla 3. Porcentaje de cenizas.	34
Tabla 4. Preparación muestras con solución intermedia 1.	41
Tabla 5. Preparación muestras con solución intermedia 2.	42
Tabla 6. Absorbancia de las muestras con glucosa.	43
Tabla 7. Diseño de experimentos para la Hidrólisis ácida.	45
Tabla 8. Concentración de azúcares de las muestras hidrolizadas de la primera digestión.	48
Tabla 9. Concentración de azúcares de las muestras hidrolizadas de la segunda digestión.	48
Tabla 10. Concentración de azúcares de las muestras hidrolizadas de la tercera digestión.	49
Tabla 11. Curva de calibración albumina.	53
Tabla 12. Muestras de enzimas para cuantificación de proteínas.	54
Tabla 13. Concentración de la muestra de enzima.	57
Tabla 14. Resultados de la unidad de actividad de celulosa por litro.	58
Tabla 15. Absorbancia curva de calibración.	58
Tabla 16. Concentraciones obtenidas para hidrólisis enzimática.	61
Tabla 17. Concentración de enzima en cada muestra de hidrólisis.	62
Tabla 18. Concentración de azúcares de la hidrólisis ácida.	66
Tabla 19. Concentración de enzima en cada muestra.	67
Tabla 20. Concentración de azúcares obtenidos en la hidrólisis ácido-enzimática.	68
Tabla 21. Datos experimentales de la fermentación.	72
Tabla 22. Resultados rota evaporación.	77

Tabla 23. Análisis ultanal del bagazo de <i>agave durangensis</i> .	80
Tabla 24. Análisis proxanal del bagazo de <i>agave durangensis</i> .	81
Tabla 25. <i>Especificaciones de operación de equipos.</i>	83
Tabla 26. Balance de masa (fracción másica) primera parte.	86
Tabla 27. Balance de masa (fracción másica) segunda parte.	87
Tabla 28. Balance de masa (fracción másica) tercera parte.	88
Tabla 29. Balance de masa (flujo másico) primera parte.	89
Tabla 30. Balance de masa (flujo másico) segunda parte.	90
Tabla 31. Balance de masa (flujo másico) tercera parte.	91
Tabla 32. Balance de masa (flujo másico) cuarta parte.	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave durangensis</i> o cenizo.	20
Figura 2. Proceso de fabricación del mezcal en Durango, México.	24
Figura 3. Estructura molecular y formula química del etanol.	25
Figura 4. Fermentación de azúcares para la producción de etanol.	28
Figura 5. Determinación de humedad y cenizas.	33
Figura 6. Determinación de conductividad eléctrica.	36
Figura 7. Determinación de pH.	37
Figura 8. Muestras para la curva de calibración.	42
Figura 9. Curva de calibración	44
Figura 10. Montaje hidrólisis ácida.	46
Figura 11. Concentración de azúcares fermentables producidos con hidrolisis acida.	51
Figura 12. Curva de calibración de albumina.	54
Figura 13. Solución buffer.	55
Figura 14. Preparación CMC al 2%.	56
Figura 15. Concentraciones de enzima.	56
Figura 16. Curva de calibración realizada en Durango.	59
Figura 17. Enzimas celulasas.	60
Figura 18. Método DNS de hidrolisis enzimática.	61
Figura 19. Concentración de azúcares en ppm.	63
Figura 20. Digestiones hidrólisis ácida.	65

Figura 21. Montaje digestión ácido-enzimática.	67
Figura 22. Concentración de azúcares en ppm.	69
Figura 23. Levadura TradiPan.	71
Figura 24. Fermentación de hidrolizado ácido.	72
Figura 25. Primera rota evaporación de las fermentaciones.	74
Figura 26. Porcentaje de alcohol de fermentación 2.	75
Figura 27. Porcentaje de alcohol de fermentación 2 después de tercera rota evaporación.	76
Figura 28. Diagrama de bloques de proceso de producción.	79
Figura 29. Diagrama de bloques	99
Figura 30. Diagrama PFD	100

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación es analizar las propiedades fisicoquímicas del bagazo de agave cenizo, realizar diferentes métodos de hidrólisis tales como hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática e hidrólisis ácido-enzimática, con la finalidad de analizar con cuál de las hidrólisis realizadas se produce la mayor cantidad de carbohidratos fermentables. Posterior a esto, realizar una fermentación con el fin de obtener etanol anhidro y diseñar una planta piloto para la producción de esta sustancia.

Las hidrólisis se realizaron consecutivamente, siendo la primera la hidrólisis ácida la cual se llevó a cabo por medio de digestiones en tres distintas condiciones utilizando ácido clorhídrico diluido en pH 2, pH 3 y pH 4 en tiempos de reacción de 15, 30 y 40 minutos, a una temperatura constante de 80 °C y una relación 1:15 % p/v, dando como resultado una concentración final de 13,03 g/L en la condición de pH 3 y 30 min. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando enzimas celulasas a diferentes concentraciones de esta, una temperatura constante de 50 °C, una relación de bagazo enzima de 1:10, 1:5 y 1:1 %p/v , y un tiempo de reacción de 24 horas dando como resultado una mayor producción de carbohidratos con la relación bagazo enzima de 1:5 al obtener una producción de azúcares de 8,46 g/L. Para el desarrollo de la hidrólisis ácido-enzimática se usó la hidrólisis ácida que presentó la menos producción de carbohidratos (2,2 g/L), al tener este pretratamiento se ajustó a un pH 5 y se adicionó tres diferentes concentraciones de enzima siendo 2,39%, 0,956% y 0,478% a una temperatura constante de 50 °C y un tiempo de reacción de 24 horas consiguiendo un aumento de azúcares a 4,8 g/L con una concentración de enzima de 0,956%.

Al realizar los tres métodos se logró evidenciar que la hidrólisis ácida es la que consigue la mayor producción de azúcares fermentables, teniendo en cuenta lo anterior lo obtenido en la hidrólisis ácida se fermentó por medio de la levadura “Tradipan” que contiene *Saccharomyces cerevisiae* para lograr producir etanol para posteriormente destilar y obtener el bioetanol requerido; se logró con 7 días de fermentación y un rendimiento entre 52-72%, alcanzando de esta manera y con ayuda de una destilación extractiva un 96% de etanol de manera experimental. Por otro lado, se realizó el diseño de una planta piloto con ayuda del simulador ASPEN PLUS V10 con base en lo trabajado en el laboratorio en donde se logra obtener un porcentaje de etanol del 98%.

Palabras clave: Bagazo de agave, *agave durangensis*, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, etanol.

INTRODUCCIÓN

El estado de Durango, México cuenta con una infinita cultura y tradición gastronómica con bebidas como lo son el mezcal, un producto representativo del país siendo obtenido por la fermentación del agave, resaltando que su elaboración presenta diferencias en la materia prima para la producción de tequila, teniendo en cuenta que este último se produce únicamente a partir del “*agave tequilana weber*” o agave azul, mientras que en el mezcal se puede emplear una gran variedad de agave.

Para producir un litro de mezcal se necesitan alrededor de 20 litros de agua y 7 kilogramos de agave, de los cuales aproximadamente cinco kilogramos se convierten en bagazo luego de extraer el jugo el cual es empleado para el proceso de fermentación. En este proceso se generan dos tipos de residuos, el bagazo y las vinazas. El bagazo de Agave es un residuo lignocelulósico sólido constituido por 43 % celulosa, 19 % hemicelulosa y 15 % lignina, razón por la cual se le considera como una materia potencial para diferentes usos industriales [1]

La cabeza de piña del agave cenizo (*Agave durangensis*) es la materia prima para el proceso de producción del mezcal en el estado de Durango, su demanda a nivel nacional en México oscila alrededor de 1'200.000 toneladas anuales, en el cual en su procesamiento se puede llegar a generar 200.000 toneladas anuales de bagazo aproximadamente [2]. Este residuo no es aprovechado actualmente, por lo que está generando un problema para el medio ambiente y para los productores mezcaleros al no haber encontrado una alternativa económicamente factible para el aprovechamiento de este residuo agroindustrial.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que no existe una norma que reglamente el manejo y la disposición del bagazo de agave, lo que trae consigo problemas tales como quema de los residuos y vertimiento a los ríos cercanos por parte de los productores de mezcal, apilamiento en parcelas y pastizales para su degradación natural causando impacto ambiental negativo [3]

De acuerdo con lo anterior, es evidente la necesidad de generar nuevas alternativas para el uso de este residuo con el fin de obtener beneficios en la producción, disminuir el impacto ambiental negativo y valorizarlo adecuadamente, por lo cual se quiere generar una oportunidad de uso a este desecho recuperando los azúcares reductores con el fin de lograr la obtención de productos de la biorrefinería como el etanol a partir de hidrólisis ácida y enzimática para posteriormente fermentarlo y con un rota evaporador obtener etanol entre 90% y 95%.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aprovechar los residuos agroindustriales de bagazo de agave (*Agave durangensis*), generados por la industria mezcalera.

Objetivos específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el bagazo de agave cenizo (*Agave durangensis*) generado en la producción de mezcal.
- Evaluar el rendimiento de obtención de azúcares reductores por diferentes métodos de hidrólisis del bagazo de agave cenizo (*Agave durangensis*) generados en la producción de mezcal.
- Elaborar una propuesta de planta piloto para el aprovechamiento del bagazo de agave cenizo (*Agave durangensis*) generado en la producción de mezcal.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades

A continuación, se mencionaran algunas generalidades que se presentan en este proyecto, explicadas brevemente.

1.1.1 *Celulosa*

Este es uno de los más nombrados e importantes materiales lignocelulósicos. La base estructural de las células vegetales, es la sustancia natural más importante, esto por la abundancia que posee y por su aprovechamiento tecnológico. Hoy en día este componente es la base de muchos productos de interés industrial, como materiales de construcción, adhesivos, textiles, papel y biocombustible [4].

La celulosa es un polisacárido que se encuentra presente en las paredes celulares de las plantas y algunas bacterias. Es una sustancia fibrosa e insoluble en agua que proporciona un soporte estructural la cual ayuda a mantener la forma de estas.

La fórmula de la celulosa se escribe como $C_6H_{10}O_5$, siendo un homopolímero lineal el cual está formado por unidades β -glucosa unidas por enlaces 1-4, compuesta por cadenas lineales de glucosa. Estas cadenas se unen mediante enlaces de hidrogeno para formar fibras rígidas y resistentes. Cabe destacar que estas moléculas pueden hidrolizarse con dificultad en medios catalizados por ácido [4].

1.1.2 *Hemicelulosa*

Las hemicelulosas hacen parte de los demás polisacáridos que se encuentran dentro del grupo de los materiales lignocelulósicos en paredes celulares; a diferencia de la celulosa, se encuentra compuesta de diferentes azúcares de tal manera que forman cadenas más cortas y con ramificaciones con una estructura química que es más completa y variable. Estos azúcares que se forman pueden ser clasificados como las pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), ácidos hexurónicos (ácidos glucurónicos, metil-glucurónico y galacturónico) y deoxihexosas (ramnosa y fucosa), y su composición varía según la especie de la planta [5].

Tiene varias funciones en las plantas, como lo es proporcionar soporte estructural, actuar como una reserva de energía y proteger las células vegetales de la deshidratación. También tiene diversas

aplicaciones en la industria alimentaria en donde se puede utilizar como un aditivo para mejorar la textura y viscosidad de los alimentos, y en la producción de biocombustible siendo la materia prima para la producción de etanol y otros biocombustibles [5]

1.1.3 Lignina

Es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, representando entre el 10% al 30% del vegetal. Es un polímero amorfo tridimensional de origen fenólico, es una molécula hidrofóbica, compuesta por tres principales monolignoles, alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico[6].

La definición estructural de la lignina no es tan clara como la de otros polímeros naturales como lo son la celulosa y las proteínas, debido a la gran complejidad que conlleva su aislamiento, análisis de la composición, y la caracterización estructural [7]. El principal problema para obtener una definición precisa se relaciona con la naturaleza de sus diversas unidades estructurales, las cuales no se suelen repetir de forma regular ya que la composición y la estructura de esta varía dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado [6].

Es de gran importancia en las plantas debido a que ayuda a dar soporte estructural y rigidez a los tejidos leñosos, protege a la planta contra patógenos y depredadores y ayuda a transportar agua y nutrientes.

1.1.4 Azúcares reductores

Los monosacáridos o también llamados azúcares simples y los disacáridos de forma libre se denominan azúcares, estos se pueden clasificar según sus reacciones químicas, un claro ejemplo son los azúcares reductores y no reductores.

La principal diferencia entre los azúcares reductores y no reductores se basa en que los azúcares reductores tienen grupos hemiacetal o hemicetal libres y puede ser oxidado por agentes oxidantes débiles. Algunos de los azúcares reductores incluyen glucosa, fructosa y galactosa como monosacáridos y lactosa y maltosa como disacáridos [8]

1.2 Agave

El género Agave pertenece a la familia “*Agavaceae*” que es originaria del continente americano, cuenta con alrededor de 200 especies de las cuales 150 se encuentran en México [9]. El agave se

suele adaptar con facilidad a diferentes condiciones ambientales debido a que sus características morfológicas y fisiológicas le permiten soportar diversos ambientes.

Las diferentes plantas que están dentro el género *Agave* han sido utilizadas con frecuencia a lo largo del tiempo ya que estas poseen una amplia gama de aplicaciones, como lo es la producción de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, también de productos alimenticios y de algunas fibras. Últimamente, se están utilizando para producir fructooligosacáridos que son destinados a ser utilizados como prebióticos y fibras dietéticas [9].

Hoy en día, aproximadamente 15 especies de *Agave* se utilizan para producir bebidas alcohólicas, tales como raicilla, bacanora, pulque, tequila y mezcal; entre estas especies se encuentran *Agave angustifolia*, *Agave durangensis*, *Agave salmiana ssp. crassispina*, *Agave tequilana*, *Agave americana var. oaxacensis* y *Agave cupreata* [9].

1.2.1 *Agave durangensis*

El *Agave durangensis* o también llamado maguey cenizo, es una especie originaria de los estados de Durango, Chihuahua, Coahuila y Zacatecas, y de gran importancia económica que se distribuye particularmente en los municipios de Durango, El Mezquital, Nombre de Dios y Súchil representando un sustento para la industria regional productora de mezcal en el estado de Durango.

El uso principal que se le da a este agave es la producción de mezcal de manera artesanal, en donde, mediante el proceso de jimado, se obtiene la materia prima para la elaboración de mezcal y los residuos, como lo son las hojas o pencas, pueden ser usadas en el proceso de elaboración artesanal del mezcal. También se utiliza para la fabricación de artesanías y medicinas tradicionales.

Figura 1.

Agave durangensis o cenizo.



Nota: Figura de la planta de agave durangensis. Tomado de: NaturalistEc, «Maguey cenizo», 2020. [En línea]. Disponible en: <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/290824-Agave-durangensis>.

El *agave durangensis* tiene una altura de 80 a 120 cm y 120 a 180 cm de cobertura, son de color gris con hojas anchas de dimensiones de 40 a 90 de largo por 14 a 22 de ancho, lanceoladas, con espina de 4 a 6 cm de largo; tiene flores amarillas de 70 a 80 cm de largo, los tépalos externos de 10 a 12 mm de longitud y sus semillas son pequeñas [10].

1.2.2 Características de cultivo

El *agave durangensis* se puede cultivar de dos maneras, a raíz desnuda o en contenedor. Para el proceso de raíz desnuda se realiza la siembra directamente en el suelo y para la producción en contenedores la mayoría de veces se realiza en condiciones de invernadero y utilizando sustrato comercial.

Este requiere que el suelo tenga un buen drenado y sea ligeramente ácido, con una textura suelta y permeable, de preferencia que posea un pH entre 6 y 7,5. Para un crecimiento máximo se requiere de una exposición al sol alta durante al menos 6 meses y con unas temperaturas entre 18 °C y 30 °C a pesar de que el agave es resistente a temperaturas extremas tanto al frío como al calor. En el sistema de riego que se maneje se requiere uno moderado a una profundidad de aproximadamente 15 cm evitando el exceso de humedad para que sus raíces no lleguen a pudrirse[11]

El agave es una especie de lento crecimiento, por lo cual tarda varios años en alcanzar su madurez y su punto óptimo para la cosecha, este tiempo suele estar entre los 7 y 10 años de edad. La planta,

al llegar a dicho punto, debe ser cortada cerca a la raíz y extraer la piña o cabeza que es la parte que se utiliza para la producción de bebidas alcohólicas como el mezcal.

1.2.2.a Regiones de cultivo. El *agave durangensis*, también conocido como "mezcal durangensis" o "cenizo durangensis", se cultiva principalmente en el estado de Durango, México. Este tipo de agave es nativo de la región y es uno de los principales ingredientes utilizados para la producción del mezcal. Además de Durango, el *agave durangensis* también se llega a cultivar en otros estados del país, como lo es Chihuahua, Coahuila y Zacatecas [12]

En estas otras regiones donde se cultiva el agave el proceso de siembra es muy similar al del estado de Durango, cumpliendo con las mismas características que fueron nombradas con anterioridad, teniendo presente que el desarrollo de la planta es un proceso que requiere cuidado y atención durante varios años.

1.2.2.b Contenido nutricional. El bagazo es la fibra obtenida del agave luego que las piñas hayan sido cocidas y molidas para generar azúcares los cuales en la fermentación serán aquellos que producirán alcoholes y otros compuestos químicos, este residuo es de origen orgánico por lo cual es considerado como biodegradable.[13]

El bagazo de agave es un residuo lignocelulósico constituido principalmente por cuatro componentes, carbohidratos siendo estos la celulosa y la hemicelulosa, lignina, sales minerales, agua y residuos de etanol. Este se compone aproximadamente de 40-60% de celulosa, entre 5-12% de hemicelulosa y entre 7-16% de lignina y otras sustancias tal como se puede observar en la tabla 1 que se muestra a continuación.

Tabla 1.

Composición química del bagazo de agave.

PROPIEDAD	COMPOSICION
Humedad %	68,87
Materia seca %	31,13
pH	7,65
Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	1,90
Cenizas (%)	7,05
Materia orgánica (%)	92,95
Carbono orgánico total (COT %)	51,64
Nitrógeno total (NTK %)	0,56
Relación C/N	92,21
Hemicelulosa (%)	8,83
Celulosa (%)	44,85
Lignina detergente ácido (%)	13,06

Nota: En la tabla anterior se observa la composición del bagazo de agave maguey en diferentes propiedades. Tomado de “Tiempos de apilado del bagazo del maguey mezcalero y su efecto en las propiedades del compost para sustrato de tomate” [14].

1.3 Producción de mezcal

Es un procedimiento artesanal por lo cual, su proceso de elaboración puede llegar a variar dependiendo de la región en donde se vaya a fabricar. El proceso en la elaboración de mezcal en el estado de Durango es el mismo que se utiliza en Oaxaca y en Zacatecas[14]. Basado en la investigación de diferentes artículos se procede a la descripción de los pasos para la elaboración del mezcal mediante *agave durangensis*:

- **Labrado y acopio.** También conocido como jimado en donde se eliminan las pencas del maguey cenizo (*Agave durangensis*). Posterior al labrado de las cabezas, se transportan para ser trasladadas a las fábricas o vinatas. Cabe resaltar que el estado de las piñas de maguey es muy importante para lograr un buen procesamiento, es por esta

razón que se sugiere que entre el labrado y el transporte se lleve en el menor tiempo posible [14].

- **Cocción de la piña.** En esta parte del proceso se utiliza un horno circular el cual cuenta con una capacidad para 350 a 400 cabezas de maguey, en el fondo de este se colocan piedras que han sido calentadas previamente con leña. Luego, se ponen las cabezas o piñas, las cuales deben ser tapadas con hojas de palma y con tierra. La fase de cocción del maguey dura alrededor de 6 a 7 días hasta que este obtiene el color clásico, el olor indicativo y un sabor dulce. Esta etapa es una de las más importantes y de mayor cuidado debido a que en esta fase se puede garantizar la buena calidad del Mezcal que se está produciendo [14].
- **Maceración.** El agave cocido se ventila entre uno o dos días, para después ser macerado. Este paso se realiza con un molino de martillos o en algunos casos a mano utilizando diversas herramientas como lo son hachas, machos, martillos o pisones.
- **Fermentado.** Este proceso se realiza en barriles bien sea de madera o cuero, en donde las cabezas del agave cocido y macerado se introducen a estos recipientes junto con agua; al tener esto en el barril se deja fermentar aproximadamente 5 días, aprovechando de esta manera las levaduras que se encuentran en la mezcla y aquellas que quedaron del proceso anterior. Se debe tener en cuenta que la efectividad de este proceso depende de la calidad del agua y de la levadura que se utilice. Durante este proceso, la fermentación inicia espontáneamente por los microorganismos naturales, estos asimilan azúcares, principalmente fructosa y glucosa, y otros compuestos menos disponibles [14].
- **Destilado.** El resultado del proceso anterior se deposita en alambiques, siendo estos instrumentos utilizados para la destilación de líquidos que, generalmente, son de cobre, acero inoxidable o una combinación de madera y cobre. Dentro de este, el líquido se hierve y evapora para después ser enfriado y condensado lentamente por un serpentín, que va a dar a un recipiente en donde se deposita el mezcal. En este proceso se realizan dos cocciones en donde se utiliza de preferencia leña blanda, estas cocciones deben ser lentas. Se obtienen tres variantes de mezcal después de la segunda

destilación o refinación, la primera es el mezcal de punta siendo un líquido que contiene entre 70° y 85° GL de alcohol, la segunda es el mezcal de cuerpo el cual contiene entre 50° y 75° GL y por último se encuentra el mezcal de colas el cual es el líquido resultante del final de la destilación contando con menos del 50 % de alcohol siendo este el que le da sabor al mezcal [14].

- **Mezclado.** Los tres tipos de mezcal producidos en la destilación son enviados a garrafas en las cuales se combinan en donde el estilo y la calidad de cada producto otorgará el olor y sabor del mezcal. En este paso termina el proceso de producción en la fábrica, posterior a esto el mezcal pasa a una planta envasadora para su homogeneización y comercialización.

Figura 2.

Proceso de fabricación del mezcal en Durango, México.



Nota: Figura del proceso de fabricación de mezcal en Durango, México. Tomado de: MezcalUnion, «Proceso de elaboración». [En línea]. Disponible en:

<https://mezcalunion.com/>.

1.3.1 Residuos de la industria mezcalera

Durante el proceso de producción del mezcal, dentro de las cuatro etapas se generan diferentes tipos de residuos, tales como lo son las vinazas y los bagazos. Por un lado, las vinazas las cuales se caracterizan por ser los residuos líquidos que se originan en la etapa de destilación. También se ha estimado que por cada litro de mezcal se generan de 8 a 12 litros de líquidos de vinazas [5].

Estos líquidos están compuestos por ácidos gálicos, fructosa, entre otros compuestos químicos tales como nitrógeno, fosfato y sulfato, los cuales pueden repercutir negativamente en el suelo ya que al afectar el pH afectan la fertilidad de este.

Por otro lado, otro residuo proveniente de la producción del mezcal son los bagazos, los cuales son residuos sólidos generados en la etapa de fermentación y destilación del agave, estos están conformados por fibras húmedas compuestas por celulosa, hemicelulosa y lignina, funcionando como almacén de moléculas y brindan estabilidad al cuerpo de la planta, este residuo representa aproximadamente el 40% del peso total de agave procesado.

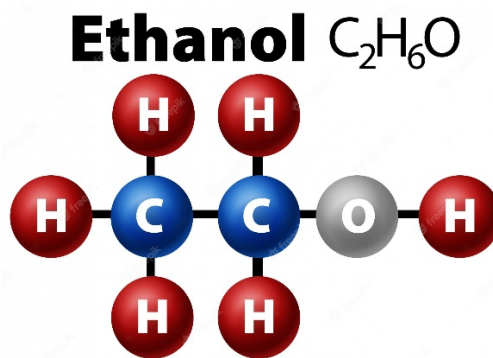
1.4 Etanol

El etanol también llamado alcohol etílico, alcohol vínico o alcohol de melazas es un líquido transparente, volátil, de olor agradable y uno de los ingredientes principales de diferentes bebidas alcohólicas como lo es la cerveza, vino o brandi [14].

Se puede llegar a utilizar como anticongelante, aditivo alimentario y como medio de crecimiento de diversas levaduras. Este alcohol puede disolver una gran cantidad de sustancias, debido a esto es usado como disolvente en la fabricación de fármacos, plásticos, lacas, perfumes, cosméticos, entre otras cosas.

Figura 3.

Estructura molecular y formula química del etanol.



Nota: Figura de la estructura molecular y formula química del etanol. Tomado de:

Freepik, «Diagrama molécula etanol». [En línea]. Disponible en:

https://www.freepik.es/vector-premium/diagrama-molecula-etanol_2440319.htm.

El etanol tiene propiedades bactericidas y fungicidas, en donde a una concentración mínima del 70% puede destruir algunos virus, como se nombró anteriormente es un disolvente muy eficaz y tiene participación en diversas reacciones de síntesis muy importantes [14]

1.4.1 Usos del etanol

Debido a que el etanol es una molécula versátil tiene una gran variedad de aplicaciones tanto industriales como comerciales. Este puede llegar a ser usado como [15]

- **Combustible:** Es uno de los biocombustibles más importantes debido a que es un recurso renovable proveniente de una biomasa que posea un alto contenido de sacarosa. Este combustible ofrece grandes ventajas debido a sus características físicas y químicas, considerando las materias primas de donde proviene, el costo de producción y transporte y los bajos efectos negativos que produce en el medio ambiente [16]
- **Desinfectante:** El etanol es un gran desinfectante, utilizado en la limpieza y desinfección de superficies, equipos médicos y en la fabricación de diversos productos de limpieza. A concentraciones entre 60% y 80% es un potente agente viricida, inactivando una gran cantidad de virus tanto lipofílicos como hidrofílicos [17]
- **Farmacéutica y cosmética:** El etanol es usado en la producción de muchos medicamentos y diversos productos como lo es soluciones para inyecciones, tónicos y jarabes. Se puede utilizar también como tratamiento en caso de intoxicaciones con alcoholes como metanol y etilenglicol si no se llega a disponer de fomepizol siendo este el tratamiento más común. [15]. También se utiliza para la producción de cosméticos, perfumes, lociones, cremas y desodorantes.
- **Industria química:** Es un reactivo químico muy importante utilizado en la producción de otras sustancias químicas como el acetaldehído, el ácido acético, el éter etílico, cloroformo, entre otros.
- **Producción de bebidas alcohólicas:** El etanol es el principal componente alcohólico en bebidas como el vino, la cerveza, el brandí, entre otros, sin embargo, este alcohol no es el que le da ese sabor característico a este tipo de bebidas, sino que son otras sustancias especiales que se adicionan en su proceso de elaboración. Dependiendo de la bebida, la concentración del etanol varia, puede llegar a presentarse entre un 4%, en cervezas, o en un 60% en mezcal [15]

1.4.2 Métodos de obtención de etanol

El alcohol etílico puede ser obtenido por diferentes métodos: Dos métodos sintéticos a partir del etileno, a partir del metanol y la fermentación de las azúcares.

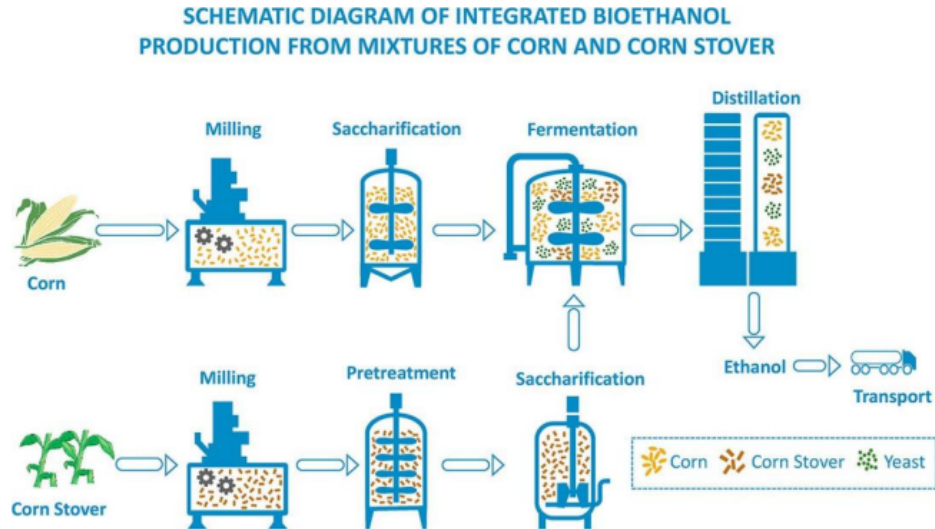
Los métodos sintéticos utilizados a partir del etileno son la hidratación indirecta e hidratación catalítica directa. El primer método mencionado se basa en la adsorción de un volumen grande de etileno en ácido sulfúrico altamente concentrado, se forma etanol y éter dietílico al diluirse el ácido en agua. El segundo método se caracteriza por no utilizar ácido sulfúrico, esta hidratación viene dada por una reacción exotérmica reversible y controlada por el equilibrio entre etileno y agua en la cual, al ser una reacción reversible, se genera dietiléter como subproducto; para que estas reacciones se generen se necesita el uso de catalizadores como lo son el ácido fosfórico-gel de sílice o el de óxido de tungsteno azul-gel de sílice [18]

La hidrocarbonilación del metanol consiste en aumentar la longitud de cadena de un alcohol cuando este reaccione con gas de síntesis en presencia de un catalizador de cobalto el cual trabaja a altas temperaturas y presiones. También se puede producir etanol a partir de la carbonilación del metanol en ácido acético sin embargo este proceso es mucho más costoso debido a que se requieren de equipos que trabajen a altas presiones[18].

La fermentación de las azúcares, es el proceso más común y más usado en la actualidad para la obtención de etanol a partir de macerados de granos, jugos de frutas, miel, leche, papas o productos que contengan un alto contenido de azúcares, en donde la mayoría de veces estos productos contienen azúcares son de origen vegetal. Este proceso de fermentación se utilizan levaduras que contienen enzimas catalizadoras que transforman los azúcares complejos a sencillos y a continuación en alcohol y dióxido de carbono.

Figura 4.

Fermentación de azúcares para la producción de etanol.



Nota: Figura del proceso de fermentación de azúcares para la producción de etanol. Tomado de: ScienceDirect, «Integrated bioethanol production from mixtures of corn and corn stover», 2018.

[En línea]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852418303225>.

El etanol producido es destilado con el fin de conseguir una alta calidad y una concentración adecuada, es decir entre 90% y 95%. Por último, se realiza una deshidratación para conseguir un 99,5% aproximadamente.

1. 5 Espectrofotometría UV-VIS

La espectrofotometría es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Esta técnica consiste en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para poder realizar estas medidas de medidas se requiere de un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

1.5.1 Aplicaciones en la determinación de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos se pueden utilizar diferentes técnicas las cuales tienen como objetivo común la cuantificación de azúcares reductores presentes en una muestra, existen diferentes métodos entre los más utilizados mediante por medio de espectrofotometría son el método DNS y la detección por método fenol sulfúrico.

- a) **Método ácido dinitrosalicílico (DNS):** El método DNS es una técnica de colorimetría la cual usa el ácido 3,5 dinitrosalicílico con el fin de hidrolizar los polisacáridos que se encuentran presentes en una muestra determinada. Es un método colorimétrico que ayuda a determinar absorbancias de luz de una longitud de onda de 540 nm aplicando la ley de Beer-Lambert [19]. Esta técnica también llamada el método Miller tiene como objetivo la determinación de azúcares reductores mediante el ácido 3,5 dinitrosalicílico el cual reacciona con los azúcares de la muestra a través de calor, cambiando el color de la muestra la cual se oxida dando una apariencia amarilla-café.
- b) **Método fenol sulfúrico:** Mayormente conocido como método fenol-ácido sulfúrico ideado por Dubois (1956) es una técnica colorimétrica para determinar azúcares y sus derivados metílicos, polisacáridos y oligosacáridos. La reacción presente entre la adición del ácido sulfúrico provoca una deshidratación de las pentosas a furfural y las hexosas a hidroximetil furfural, dando como resultado de la catálisis ácida de los azúcares varios derivados del furano los cuales se condensan en fenoles y forman un color amarillo-naranja, para posteriormente medir las absorbancias por medio del espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm[20].

1.6 Hidrólisis de residuos lignocelulósicos

1.6.1 Hidrólisis ácida

Para comenzar a hablar de la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos, se debe partir por comprender los diferentes tipos que existen; existen dos tipos, una empleando ácido concentrado y la otra con un ácido diluido, con la diferencia en la temperatura a la cual serán sometidos los residuos. Entre los ácidos más usados en este proceso se encuentra el ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido clorhídrico (HCl), debido a su alta eficiencia en la ruptura de los enlaces poliméricos presentes en la estructura de lignina, celulosa y hemicelulosa, que son los principales componentes de los residuos lignocelulósicos.

Por un lado, el ácido concentrado (30-72%), se pueden emplear a temperaturas entre los 40°C-70°C, el proceso con este ácido facilita un alto rendimiento a la hora de obtención de azúcares provenientes de la hemicelulosa y celulosa a una baja temperatura, demostrando un gasto bajo de energía. Este método posee la desventaja de necesitar reactores con alta resistencia a la corrosión debido que el ácido es tóxico y corrosivo, aumentando significativamente los costos de producción [21].

Por otro lado, el ácido diluido tiene gran potencial para llevarse a escala industrial al necesitar este un ácido entre (0,3% y 2%) y llevarse a cabo a unas temperaturas entre 120 °C y 220 °C con el fin de obtener buenos resultados, y en la mayoría de los casos no se necesita una remoción de ácido. Este funciona con hemicelulosa de manera que libera todos los monosacáridos, cabe mencionar que con ninguno de los dos métodos no se remueve la lignina durante los tratamientos [22].

Esta hidrólisis también se lleva a cabo para el bagazo de agave, y la cantidad de zonas amorfas y cristalinas también repercute en el grado de hidrólisis. Es por esto que es necesario llevar a cabo nuevas estrategias con el fin de mejorar la hidrólisis de la celulosa, reduciendo el grado de la cristalinidad; aunque lo anterior es bastante importante, también se ha reportado que el tamaño de partícula es relevante para el proceso, en donde entre mayor superficie de contacto de la enzima o ácido con el bagazo, mayor será el número de cortes en los enlaces glucosídico y ruptura de los puentes de hidrógeno.

1.6.2 Hidrólisis enzimática

Últimamente se ha demostrado un alto interés la producción de bio-combustibles alternativos a partir de las fuentes de biomasa, por esta razón se ha llevado a cabo grupos de investigación en donde evalúan la habilidad que tienen las enzimas para degradar los sustratos lignocelulósicos para producir azúcares fermentables.

De esta manera los residuos lignocelulósicos se pueden hidrolizar por vía enzimática con el fin de la obtención de monosacáridos. Para poder cumplir con este objetivo se utilizan enzimas como las celulasas y las xilanasas; por el lado de las celulasas, estas están conformadas por tres grupos los cuales ayudan sinérgicamente a romper los enlaces de la celulosa, estas son las endoglucanasas, exoglucanas y B-glucosidasas [23]

Para poder realizar la hidrólisis enzimática se sigue un mecanismo de tres pasos tales como la adsorción de la enzima a la superficie de la celulosa, la bio-degradación de la celulosa y por último la desorción de la enzima; cabe resaltar que cada grupo de enzimas reacciona de manera diferente en la celulosa.

Las estructuras cristalinas juegan un papel importante demostrando que al estar presentes en mayor proporción en la celulosa será más difícil la penetración de las enzimas para poder hidrolizar este polímero. Por otro lado, es importante conocer que en la zona amorfa se permite el mayor acceso de enzimas. ayudando de esta manera el grado de hidrólisis del polímero[23].

1.6.3 Hidrólisis básica/alcalina

La hidrólisis alcalina es un proceso químico el cual consiste en la ruptura de enlaces químicos en presencia de una base fuerte, como lo es el hidróxido de sodio (NaOH) o el hidróxido de potasio (KOH), esta reacción se da en solución acuosa y se puede utilizar en una variedad de aplicaciones industriales y de laboratorio. Durante esta hidrólisis la base fuerte actúa como un nucleófilo atacando los enlaces químicos de las moléculas presentes en la solución, dando como resultado la separación de los componentes originales y la formación de productos diferentes. Esta reacción puede ser de gran utilidad para descomponer compuestos orgánicos complejos en moléculas más simples y solubles [24].

2. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

A continuación, se presentarán de manera conjunta los diferentes procedimientos desarrollados para el presente trabajo, unificando por capítulos las diferentes pruebas, experimentos y procedimientos desarrollados para inmediatamente encontrar sus resultados y discusión frente a referentes bibliográficos que permiten enriquecer el análisis final.

2.1 Caracterización fisicoquímica del bagazo de *agave durangensis*

2.1.1 Análisis de cenizas y humedad

Para realizar el análisis de cenizas y humedad se necesitaron de tres crisoles y 3 g de bagazo de agave cenizo. En primer lugar, se pesan cada uno de los crisoles vacíos en una balanza analítica, se colocan en un desecador alrededor de 30 minutos para extraer la humedad que estos puedan poseer.

Seguido a esto, se agrega 1 g de bagazo en cada uno de los crisoles y se pesan, para luego llevarlos al horno que se encuentra a una temperatura de 110 °C durante 2 horas. Pasado este tiempo se sacan y son llevados al desecador durante 40 minutos aproximadamente. Luego de esto vuelven a ser pesados, esto con el fin de determinar la humedad del bagazo. La humedad expresada en porcentaje en masa se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$Humedad = \frac{(A - B)}{M} \times 100 \quad Ec. 1$$

En donde:

A: Masa de la cápsula más la muestra húmeda (g)

B: Masa de la cápsula más la muestra seca (g)

M: Masa inicial de la muestra (g)

Esta prueba se realizó por triplicado, utilizando 1g de bagazo en cada uno de los crisoles como se mencionó con anterioridad. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 2.

Contenido de humedad.

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
A	71,72	79,83	55,61
B	71,64	79,75	55,51
M	1,0009	1,0007	1,0004
% HUMEDAD	7,99	7,99	9,99

Nota: La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la determinación de humedad de las muestras de bagazo de agave cenizo.

Figura 5.

Determinación de humedad y cenizas.



Nota: Muestras de bagazo en desecador.

En la determinación de las cenizas se toman las muestras finales de la humedad las cuales son llevadas a una mufla para someterlas a ignición durante 3 horas a una temperatura entre los 550 °C y 600 °C. Al pasar el correspondiente tiempo se llevan nuevamente al desecador durante 30 minutos y se pesan. El contenido de cenizas expresado en porcentaje se calcula utilizando la siguiente formula:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(B - C)}{(A - C)} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

En donde:

A: Masa de la cápsula más la muestra (g)

B: Masa de la cápsula más cenizas (g)

C: Masa de la cápsula vacía (g)

Teniendo en cuenta que la prueba anterior (porcentaje de humedad) se realizó por triplicado y se tomaron las muestras resultantes de esta, la determinación de cenizas es realizada también tres veces. A continuación, se evidenciarán los resultados obtenidos:

Tabla 3.

Porcentaje de cenizas.

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
A	71,72	79,83	55,61
B	70,82	78,92	54,71
C	70,72	78,83	54,61
% CENIZAS	10	9	10

Nota: La tabla 3 muestra los resultados obtenidos en la determinación de cenizas de las muestras de bagazo de agave cenizo.

Los resultados obtenidos para la prueba de humedad indican que el bagazo de agave cenizo tiene un porcentaje de humedad promedio de 8,67 % y para la prueba de cenizas da un valor promedio de 9,67 %. La primera prueba mencionada arroja un resultado menor al encontrado en la literatura el cual es de 68,87 %, caso contrario a la prueba de cenizas de la cual se obtuvo un valor un poco más alto en comparación a la literatura el cual fue de 7,05 %.

La principal razón que pudo influir en la diferencia de los datos calculados y los datos reportados por Gutierrez (2013) para el porcentaje de humedad son las condiciones en las que se encontraba el bagazo al momento de realizar las pruebas, ya que el bagazo cenizo empleado en este proyecto fue caracterizado varios meses después de haber sido sacado de la producción mezcalera, donde pasa varias semanas expuesto al sol en Durango México a una temperatura promedio de 27 °C - 30 °C consiguiendo de esta manera una muestra de bagazo con baja humedad. Siendo el caso contrario de Gutierrez (2013), en donde se trabajó el bagazo inmediatamente después de la

extracción de los azúcares de la cabeza del agave la cual se realiza con abundante agua, consiguiendo de esta forma una muestra de bagazo húmeda al momento de trabajar dichas pruebas [25].

En términos más simples, los resultados obtenidos para las pruebas de humedad y cenizas nos brindan una visión general de la condición de la materia prima a trabajar en este proyecto, indicando de esta manera que no es necesario llevar a cabo más procesos de secado antes de iniciar las pruebas posteriores.

2.1.2 Determinación de la materia orgánica (MO)

Con el fin de determinar la materia orgánica presente en el bagazo de *agave durangensis* se tiene en cuenta el procedimiento realizado en el ítem anterior para cenizas y los valores arrojados en este. Con base en esto, la materia orgánica se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Materia organica (MO)} = \text{Peso de cenizas} - \text{Peso seco de la muestra} \quad \text{Ec. 3}$$

Considerando los resultados obtenidos en el ítem anterior se realizó un promedio con estos para la determinación de materia orgánica, al tener este valor se realiza el cálculo el cual da un total de 90,22 %. Según los datos de la tabla 1, el porcentaje de materia orgánica para el bagazo de agave es de 92,95 %, demostrando así que el dato obtenido a nivel laboratorio es relativamente cercano teniendo en cuenta que el peso de cenizas varía con el hallado en la literatura y esta propiedad es dependiente del peso de las cenizas.

2.1.3 Determinación del carbono orgánico

Al igual que la materia orgánica, la determinación del carbono orgánico en el bagazo de agave cenizo se realiza basada en una ecuación que se mostrara a continuación[26], teniendo en cuenta los resultados arrojados en el numeral 7.2.

$$\text{Carbono organico} = \frac{\text{Materia organica}}{1,724} \quad \text{Ec. 4}$$

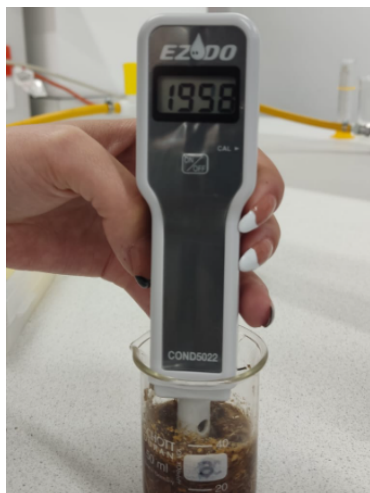
Al realizar el cálculo respectivo teniendo presente el valor obtenido en el ítem anterior (7.2) se pudo obtener el valor del carbono orgánico el cual dio un total de 52,33 %, muy cercano al encontrado en la literatura (51,64 %) partiendo de que este valor está relacionado directamente con el porcentaje de la materia orgánica anteriormente calculada.

2.1.4 Determinación de la conductividad eléctrica y pH

Para la determinación de la conductividad eléctrica y el pH de la muestra de bagazo de *agave duranguensis* se utilizó agua destilada en una relación 1:5 peso/volumen [26]. Con base a esto, se toman 5 g de bagazo con 25 mL de agua destilada para posteriormente medir estas características con sus respectivos instrumentos, conductímetro y potenciómetro de mesa correspondientemente.

Figura 6.

Determinación de conductividad eléctrica.



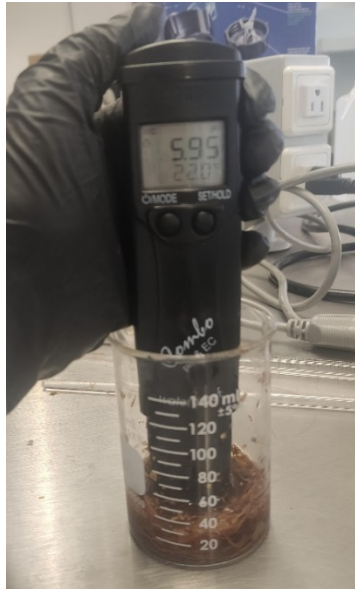
Nota: Se determina la conductividad eléctrica partiendo de la metodología narrada con anterioridad. .

Al tener esta mezcla se procede a introducir el instrumento de medición en ella, empezando con el conductímetro, el cual arroja el valor en unidades de microsiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$) dando un resultado de $1958 \mu\text{S}/\text{cm}$, dato similar al encontrado en artículos como bien se nombra en la tabla 1 ($1,90 \text{ dS m}^{-1}$) demostrando que la determinación de esta propiedad se realizó en condiciones similares a la literatura variando por la proporción a la hora de la experimentación.

Luego de esto, se procede a medir el pH de la misma manera en que se determinó la conductividad eléctrica, del cual se obtuvo un valor de 5,95 como se puede observar en la figura 7. Según datos suministrados en la tabla 1, el pH descrito para un bagazo de agave mezcalero es de 5,65 por lo que el valor determinado a nivel laboratorio se encuentra por encima de lo mencionado esto puede presentarse por las condiciones ambientales de donde se realizó la prueba teniendo en cuenta que la temperatura y humedad pueden afectar la medición de esta propiedad.

Figura 7.

Determinación de pH.



Nota: Determinación del pH en la muestra de bagazo.

2.1.5 Determinación de la densidad aparente y real

Se hizo uso de una probeta seca y limpia la cual es pesada vacía. Se adiciona una masa determinada de 4 g de bagazo con un volumen de agua destilada de 40 mL, luego de esto se compacta el contenido y se pesa la probeta con todo el contenido[26]. A partir de la siguiente ecuación y con los datos obtenidos se determina la densidad aparente:

$$\rho_{aparente} = \frac{m_{con\ muestra} - m_{vacía}}{V_{aparente}} \quad Ec. 5$$

$$\rho_{aparente} = \frac{153,89\ g - 113,21\ g}{48\ mL}$$

$$\rho_{aparente} = 0,85\ g/mL$$

Este resultado se encuentra por encima de los establecidos según el artículo citado, dado que estos están en valores menores a 0,60 g/mL para esto se debe tener en cuenta que se realizó bajo las mismas proporciones que en la literatura, pero la temperatura y presión ambiente puede alterar este valor [27].

Para la determinación de la densidad real, se empleó un picnómetro de 50 mL al cual se le agregó 1 g de muestra de bagazo, luego se le adiciona el solvente el cual es agua destilada hasta el nivel de enrase. Se debe pesa el picnómetro vacío, con agua destilada, con la muestra y con la muestra-agua para poder emplear las siguientes ecuaciones [28]:

Estas primeras ecuaciones se realizan con el fin de determinar el volumen real de la muestra.

$$m = m_{agua} - [m_{muestra-agua} - (m_{muestra} - m_{vacío})] \quad Ec. 6$$

$$m = 79,92 - [78,61 - (29,4 - 28,39)]$$

$$m = 2,41 \text{ g}$$

$$V_{real} = \frac{m}{\rho_{agua}} \quad Ec. 7$$

$$V_{real} = \frac{2,41 \text{ g}}{1 \text{ g/mL}}$$

$$V_{real} = 2,41 \text{ mL}$$

Al tener este dato se utiliza la siguiente ecuación para identificar la densidad real.

$$\rho_{real} = \frac{m_{muestra} - m_{vacío}}{V_{real}} \quad Ec. 8$$

$$\rho_{real} = \frac{29,4 \text{ g} - 28,39 \text{ g}}{2,41 \text{ mL}}$$

$$\rho_{real} = 0,43 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

En base a los resultados obtenidos se puede identificar que la densidad real calculada se encuentra por encima del valor que presenta la literatura (0,1656 g/mL), se debe tener en cuenta que el valor de esta puede variar con la temperatura y presión del lugar en el cual se realice la prueba de determinación de densidad real, y también el tipo de bagazo que se estudia debido a que el dato teórico es de bagazo de agave azul y el estudiado es de bagazo de agave cenizo, por lo que esto, es tomado en consideración las condiciones en las que se evalúa dicha propiedad [14].

2.1.6 Determinación de la porosidad

La porosidad de la partícula en un sólido es la medida de la rugosidad y la capacidad de la superficie, esta se estimó a partir de su relación con la densidad, según la ecuación[28]:

$$e = \frac{\rho_{real} - \rho_{aparente}}{\rho_{real}} \times 100 \quad Ec. 9$$

$$e = 87\%$$

De acuerdo a los datos encontrados en artículos científicos, el espacio poroso total para el bagazo de agave debe ser mayor al 85 % y los resultados obtenidos son similares a este. Cabe destacar que la porosidad del bagazo de agave cenizo puede llegar a variar en función de diferentes factores como lo es el procesamiento del material, la humedad, densidad y edad del agave que se maneje.

2.2 Hidrólisis ácida

Para comenzar con el procedimiento es necesario tener seleccionado el método por el cual se llevará a cabo la cuantificación de los azúcares reductores producidos a partir de la hidrólisis ácida por medio del espectrofotómetro. La técnica de colorimetría elegida es el método DNS (técnica de Miller), el cual permitirá la hidrólisis de los polisacáridos que se encuentran presentes en el *bagazo de agave duranguesis* por medio del ácido 3,5 dinitrosalicílico, determinando de esta manera las absorbancias haciendo uso del espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Se seleccionó este método debido a la disponibilidad de los reactivos necesarios para la prueba, así como el rango de sensibilidad de detección que entrega al momento de medir bajas concentraciones de carbohidratos reductores.

2.2.1 Curva de calibración

Es una representación gráfica de las absorbancias frente a la concentración. Permite determinar de forma matemática la concentración de muestras analizadas bajo las mismas condiciones que los diferentes patrones preparados en la curva de calibración.

La solución patrón a utilizar es una disolución de glucosa en agua; para comenzar se requiere de una solución madre con una concentración de glucosa de 5000 ppm, la cual se preparó en un balón aforado de 100 mL en donde se adicionó 0,5 g de glucosa y se aforó con agua destilada. Para poder realizar el método DNS se elaboró dos soluciones intermedias a partir de la solución madre siendo

estas necesarias a la hora de medir las diferentes concentraciones con el espectrofotómetro, las soluciones intermedias se realizaron a partir de la siguiente ecuación.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad \text{Ec. 10}$$

En donde:

V_1 : Volumen de la solución madre (mL)

C_1 : Concentración de la solución madre (ppm)

V_2 : Volumen de la solución intermedia (mL)

C_2 : Concentración de la solución intermedia (ppm)

La solución intermedia 1 se requiere a una concentración de 500 ppm en un volumen de 100 mL, para poder obtener la concentración necesaria se necesita calcular el volumen de la solución madre que se le adiciona a la solución intermedia 1 a partir de la ecuación 10.

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}$$

$$V_2 = \frac{100 \text{ mL} \times 500 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL}$$

Una vez calculado el volumen se procede a elaborar la solución intermedia 1 en un balón aforado de 100 mL al cual se le adicionó 10 mL de la solución madre y se aforo con agua destilada.

La solución intermedia 2 se requiere a una concentración de 100 ppm en un volumen de 100 mL, para poder obtener la concentración necesaria al igual que la solución intermedia 1 se necesita calcular el volumen de la solución madre que se adicionara a la intermedia 2 para llegar a esa concentración a partir de la ecuación 10.

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}$$

$$V_2 = \frac{100 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}}$$

$$V_2 = 2 \text{ mL}$$

Una vez calculado el volumen se procede a elaborar la solución intermedia 2 en un balón aforado de 100 mL adicionando 2 mL de la solución madre y posteriormente se aforó con agua destilada.

Una vez teniendo las dos soluciones intermedias se procede a preparar la solución DNS con 1,6 g de Hidróxido de sodio (NaOH), 30 g de Tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle) y 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se disuelven en agua destilada en un volumen de 100 mL.

Para iniciar con la medición de absorbancia es necesario realizar la disolución de las soluciones de glucosa y la solución de DNS preparado en tubos de ensayo de 10 mL; para poder realizar la curva de calibración se decide tomar 9 muestras con diferentes concentraciones las cuales se prepararon 5 muestras con la solución intermedia 1 como se muestra en la tabla 4 y 4 muestras con la solución intermedia 2 como se muestra en la tabla 5.

Tabla 4.

Preparación muestras con solución intermedia 1.

Concentración (ppm)	Solución intermedia 1 (mL)	DNS (mL)	Agua destilada (mL)
50	1	5	4
100	2	5	3
150	3	5	2
200	4	5	1
250	5	5	-

Nota: La tabla anterior muestra las concentraciones a las que se llevó a cabo la preparación de la solución intermedia 1.

Tabla 5.

Preparación muestras con solución intermedia 2.

Concentración (ppm)	Solución intermedia 2 (mL)	DNS (mL)	Agua destilada (mL)
10	1	5	4
20	2	5	3
30	3	5	2
40	4	5	1

Nota: La tabla 5 representa la concentración en ppm a las que se llevó a cabo la preparación muestras con solución intermedia 2.

Cabe resaltar que para comenzar la medición en el espectrofotómetro se debe realizar una curva de calibración, también se debe preparar una solución “blanco” el cual será el dato “00” al iniciar, este consta de 5 mL del DNS preparado y 5 mL de agua destilada.

Figura 8.

Muestras para la curva de calibración.



Nota: Muestras de hidrolisis acida con la coloración después del reactivo DNS. .

Para asegurar una disolución completa de las 9 muestras y el blanco se llevaron a calentamiento mediante un termostato a una temperatura de 95 °C por 5 min, una vez frías las muestras se comenzó con las mediciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm iniciando

siempre con el blanco y posterior a eso de la menos concentrada a la más concentrada. Las absorbancias obtenidas se pueden observar en la tabla 6.

Tabla 6.

Absorbancia de las muestras con glucosa.

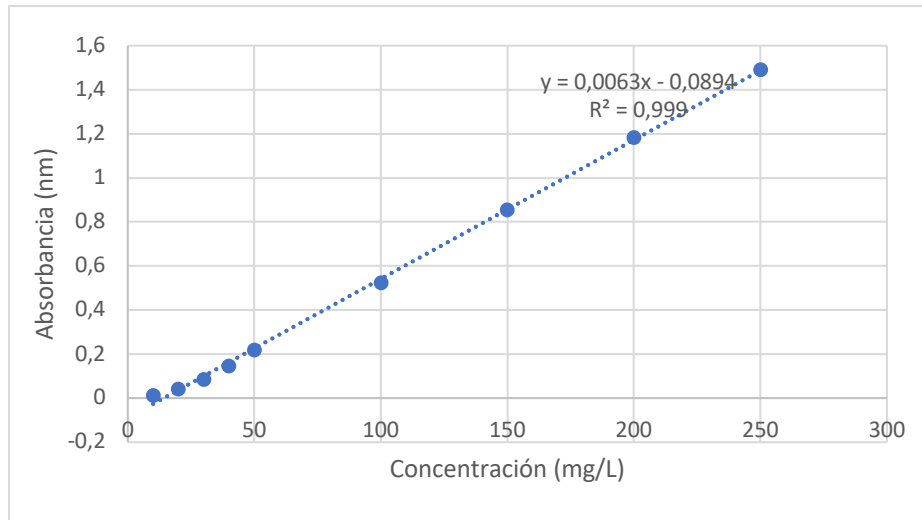
Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)
10	0,012
20	0,041
30	0,086
40	0,146
50	0,22
100	0,523
150	0,854
200	1,184
250	1,49

Nota. Se puede observar la absorbancia de las muestras de glucosa con ayuda del espectrofotómetro.

Se graficó los datos obtenidos con el espectrofotómetro para elaborar la curva de calibración, una vez graficados se realizó una regresión lineal la cual arroja los datos de m y b que serán de vital importancia para obtener los azúcares reductores de las hidrólisis a realizar.

Figura 9.

Curva de calibración.



Nota: Se observa la ecuación de la recta de la curva de calibración.

2.2.2 Digestiones en la hidrólisis ácida

Para comenzar con las digestiones para la hidrólisis ácida se planteó un diseño de experimentos en donde se presentan las 2 variables las cuales va a variar con el fin de obtener diferentes resultados y de esa forma comparar cada método con el fin de conseguir cuál logra extraer más azúcares reductores del *bagazo de agave duranguensis*.

Teniendo en cuenta lo anterior el ácido a utilizar en la hidrólisis es el ácido clorhídrico el cual se manejará en tres pH diferentes a tres diferentes tiempos, de esta manera el procedimiento se dividirá en 3 partes en donde se enumera de uno a tres cada pH secuencialmente en cada experimento en donde “1” corresponde al pH 2, “2” al pH 3 y “3” al pH 4 respectivamente de manera que resultará más fácil la lectura de los resultados, tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7.

Diseño de experimentos para la hidrólisis ácida.

		pH2	pH3	pH4
Tiempo (min)	15	1	2	3
	30	1	2	3
	40	1	2	3

Nota. Se realiza la tabla del diseño de experimentos con los tres diferentes tiempos.

Iniciando con las digestiones se procede a realizar el montaje correspondiente, este consiste en un montaje de reflujo el cual consta de:

- Tubo condensador
- Balón de 250mL
- Mangueras
- Plancha de calentamiento
- Soportes con sus respectivas pinzas

Teniendo en cuenta los materiales requeridos se comienza con el montaje para las 3 digestiones.

1. Se colocan los 3 soportes y con ayuda de pinzas se colocan los tubos condensadores los cuales se sostendrán en el soporte universal.
2. Se posiciona la plancha de calentamiento la cual tiene 6 planchas.
3. Se colocan los balones de 250 mL con la muestra a hidrolizar en cada plancha de calentamiento y se conectan con cada tubo condensador

Figura 10.

Montaje hidrólisis ácida.



Nota. Se realiza el montaje para las tres hidrólisis.

Es importante tener en cuenta que el agua que traspasa por los tubos sea agua fría, esto con el fin de mejorar la eficiencia de la condensación de la muestra gaseosa, el agua de circulación no se mezcla con la muestra a purificar, es por eso que las mangueras están conectadas al condensador de cierta manera específica.

a) Primera digestión.

Para comenzar con la primera digestión se pesó tres veces 10 g de *bagazo de agave duranguesis* se introdujo a cada balón de 250 mL, una vez puesto los 10 g de muestra en cada balón se comenzó a introducir el ácido a cada balón; el balón 1 contiene ácido clorhídrico con pH 2, el balón 2 con clorhídrico con pH 3, y el balón 3 con pH 4. Se colocó al lado de cada balón un beaker de 50 mL con agua con el fin de controlar la temperatura de cada plancha de calentamiento por medio de un termómetro, una vez la temperatura de cada plancha de calentamiento llegó la temperatura deseada 80 °C se comenzó a tomar el tiempo de 15 min teniendo en cuenta revisar de manera constante la temperatura evitando futuros errores.

Al pasar los 15 min se cerró el paso de agua y se desconectó las planchas de calentamiento dejando enfriar el montaje. Una vez se enfrió el montaje con mucho cuidado se desprendió cada balón del

tubo condensador para posteriormente traspasar el líquido obtenido a beakers de 250 mL filtrando la muestra.

Teniendo las tres muestras ya hidrolizadas se procede a medir los azúcares reductores de cada beaker. Para esto se realizó el mismo procedimiento que se hizo para elaborar la curva de calibración anterior. De cada beaker se tomó dos muestras para tener una réplica de cada uno, es decir, se midió los azúcares reductores a 6 tubos de ensayo.

A cada tubo de ensayo se les adiciono 0,5 mL de cada beaker correspondiente, 4,5 mL de agua destilada y 5 mL de DNS preparado como se mencionó previamente. Es importante tener un blanco para el espectrofotómetro así que este se preparó con 5 mL de DNS preparado y 5 mL de agua destilada. Teniendo los tubos de ensayo listos y marcados cada uno, se colocaron a baño María por 5 min a una temperatura de 95 °C, pasado el tiempo se retiran del termostato y se dejan enfriar.

Una vez fría las muestras se procede a medir las absorbancias cada tubo de ensayo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm comenzando primero con el blanco. Al tener las absorbancias de cada muestra se realizó el cálculo correspondiente a los azúcares reductores teniendo en cuenta la siguiente formula sabiendo que los datos de m y b son constantes obtenidos en la curva de calibración previa a la hidrólisis.

$$\text{Concentración} = \frac{ABS - b}{m} \quad \text{Ec. 11}$$

ABS: Absorbancia de cada muestra

b: 0,0894

m: 0,0063

Se aplicó la anterior ecuación a cada una de las muestras y se obtuvo como resultado los datos suministrados en la tabla 8.

Es importante resaltar que para poder obtener las absorbancias de cada muestra se diluyó con agua destilada lo obtenido en cada hidrólisis debido a su alta concentración de azúcares, causando que al reaccionar con el DNS se obtuviera un color marrón oscuro imposibilitando la lectura en el espectrofotómetro. Al diluir cada muestra 0,5 mL en 4,5 mL de agua a la concentración obtenida

anteriormente se multiplicó por 20 para obtener la concentración real en partes por millón de cada muestra. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 8.

Tabla 8.

Concentración de azúcares de las muestras hidrolizadas de la primera digestión.

pH	Absorbancia (nm)	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
2 (1)	1,573	263,9	5277,5
2 (2)	1,592	266,9	5337,8
3(1)	0,644	116,4	2328,3
3(2)	0,595	108,6	2172,7
4 (1)	1,947	323,2	6464,8
4 (2)	2,009	333,1	6661,6

Nota. Se puede observar la concentración real sin dilución de la primera digestión.

b) Segunda digestión

En este caso, se sigue el mismo procedimiento que esta descrito en la sección 8.2.1, con la diferencia de que se aumenta el tiempo de digestión de 15 a 30 minutos. Los resultados de la concentración de azúcares de la segunda digestión se presentan en la tabla 9.

Tabla 9.

Concentración de azúcares de las muestras hidrolizadas de la segunda digestión.

pH	Absorbancia (nm)	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
2 (1)	1,948	323,4	6467,9
2 (2)	1,986	329,4	6588,6
3 (1)	1,713	286,1	5721,9
3 (2)	1,732	289,1	5782,2
4 (1)	1,093	187,7	3753,7
4 (2)	1,110	190,4	3807,6

Nota. Se puede observar la concentración real sin dilución de la segunda digestión.

c) Tercera digestión

Como se mencionó anteriormente se continúa haciendo el mismo procedimiento que esta descrito en la sección 8.2.1, con la diferencia de que se aumenta el tiempo de digestión de 15 a 40 minutos y la dilución para determinar la absorbancia, esta será de 0,1 mL de digestión en 4,9 mL de agua destilada, haciéndose de manera diferente a las dos anteriores debido a que da una coloración marrón más intensa siendo imposible de leer en el espectrofotómetro a la longitud de onda establecida. Dicho esto, varia también la multiplicación de la dilución para saber la concentración real, pasando de multiplicarse por 20 a multiplicarse por 100.

Tabla 10.

Concentración de azúcares de las muestras hidrolizadas de la tercera digestión.

pH	Absorbancia (nm)	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
2 (1)	0,402	78,0	7800,0
2 (2)	0,465	88,0	8800,0
3 (1)	0,674	121,2	12117,5
3 (2)	0,732	130,4	13038,1
4 (1)	0,203	46,4	4641,3
4 (2)	0,213	48,0	4800

Nota. Se puede observar la concentración real sin dilución de la segunda digestión.

Con base a los resultados obtenidos, se puede identificar el comportamiento que tuvo el bagazo de *agave durangensis* al someterse a una solución de ácido clorhídrico diluido con una temperatura estándar de 80 °C a diferentes tiempos de reacción (15, 30 y 40 min) y diferentes valores de pH.

Para la primera digestión se logra evidenciar una producción de azúcares fermentables mayor para la medición inicial de pH 4 con un promedio de 6500 ppm y la condición de menor producción fue para la réplica del pH 3 con una cantidad aproximada de 2200 ppm. También se puede identificar que estos carbohidratos no tienen un comportamiento lineal en aumento al valor de pH respecto a las absorbancias presentadas.

En cuanto a la segunda digestión realizada para un tiempo de reacción de 30 minutos, se puede analizar que hubo un aumento en la producción de azúcares para un pH 2 y 3 en comparación a la

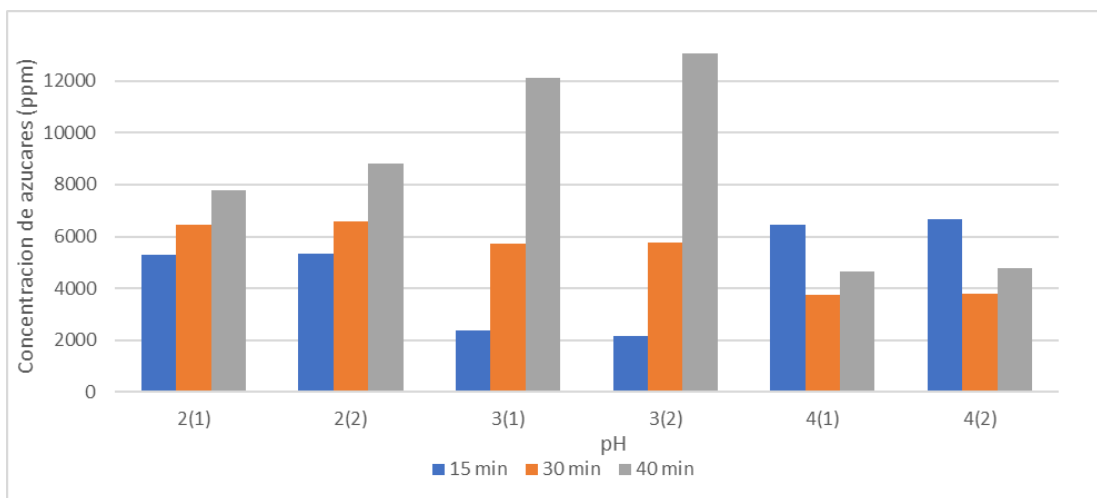
digestión inmediatamente anterior, sin embargo, a diferencia de la digestión previa la obtención de carbohidratos para una condición de pH 4 disminuyó. La mayor producción de azúcares fue en un pH 2 con un valor de 6400 ppm en donde se logra identificar que una solución con un mayor porcentaje de ácido diluido produce una cantidad de azúcares mayor en contraste a los otros dos valores estudiados.

Por último, en la tercera digestión, se logra evidenciar un aumento notorio en la producción de azúcares fermentables presentando una cantidad mayor a condiciones de pH 3 con un valor aproximado de 13000 ppm en un tiempo de reacción de 40 minutos. Se puede deducir también que en las dos últimas digestiones las muestras que contenían ácido clorhídrico pH 4 obtuvieron una producción menor de carbohidratos, evidenciando que a un mayor tiempo de reacción esta concentración de ácido no logra hidrolizar toda la celulosa, lo que se presenta como una baja concentración de azúcares reductores en la solución.

Después de analizar los resultados de los hidrolizados, se decidió realizar una gráfica con los datos experimentales obtenidos para compararlos con el fin de identificar visualmente los parámetros en los cuales se observe un mejor comportamiento de la biomasa ante el ácido. Como se puede evidenciar en la gráfica 2, la mejor condición para la producción de carbohidratos reductores es una concentración de ácido clorhídrico diluido a un pH 3 con un tiempo de reacción de 40 minutos, debido a que se obtuvo una mayor cantidad de glucosa en comparación a los otros parámetros a los que se realizaron las pruebas.

Figura 11.

Concentración de azúcares fermentables producidos con hidrólisis ácida.



Nota: La anterior grafica representa la producción de azúcares fermentables en las diferentes condiciones a las que se sometió el bagazo de agave *durangensis*.

Según la autora Velasco (2019) las condiciones favorables para realizar la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico es a una temperatura de 121 °C, con una proporción 2:10 de bagazo y solución ácida a un tiempo de reacción de 37 minutos para la mayor producción de dicho azúcar dando resultados de alrededor de 21,15 g/L. Teniendo en cuenta dichas condiciones, se puede deducir que al manejar una temperatura más alta al igual que una mayor proporción de bagazo de agave con ácido diluido se obtienen concentraciones superiores de carbohidratos en comparación a los datos obtenidos con una proporción 1:15 de bagazo respecto al ácido diluido y una temperatura de 80 °C en donde se logró recuperar alrededor de 13 g/L de azúcares fermentables.

Con base a esto, se debe tener en consideración que el trabajo realizado se elaboró a nivel laboratorio, utilizando un sistema de reflujo, como se evidencia en la figura 9, en donde se esperaba recuperar el líquido que se evaporaba con el flujo de agua fría en los tubos de condensación con una concentración de HCl de más o menos 0,05% v/v. En contraste con el proyecto realizado por Velasco (2019), en donde se hizo uso de una autoclave con una concentración de ácido clorhídrico de 3% v/v arrojando una producción de azúcar con un pH de 0,6 demostrando que a concentraciones mayores de ácido diluido y temperaturas altas a las que fue sometido el bagazo de agave tequilana se logra extraer la mayor cantidad del producto deseado [29]

La hidrólisis ácida realizada con ácido clorhídrico diluido en tres diferentes concentraciones obteniendo tres valores de pH y tres tiempos de reacción siendo estos 15, 30 y 40 minutos, con el fin de identificar las condiciones apropiadas para recuperar la mayor cantidad de azúcares fermentables para su posterior uso.

Por último, se calcula el rendimiento de lo obtenido en la hidrólisis ácida, para esto se toma como base de cálculo 44,85 g/L dato teórico de la cantidad de carbohidratos reductores que se pueden producir a partir del bagazo de agave cenizo, teniendo en cuenta el anterior dato se obtiene el porcentaje de rendimiento de la condición de pH 3 con un tiempo de reacción de 30 min, en donde al tener una concentración 13,2 g/L alcanza un rendimiento de 29,05%.

2.3 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática del bagazo de agave cenizo se basa en la adición de enzimas celulolíticas comerciales para la descomposición de la celulosa en azúcares fermentables. Debido a que estas enzimas tienen la capacidad de romper enlaces glucosídicos que se encuentran en diferentes polisacáridos son particularmente eficaces en este proceso. Se pueden encontrar de forma natural en varios organismos, como bacterias, hongos y algunos insectos, y también se pueden obtener comercialmente en forma de preparados enzimáticos.

2.3.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realiza con el fin de identificar la cantidad de proteínas en la solución de enzimas utilizada, permitiendo asumir que dicha concentración en su totalidad correspondiente a celulasas. En este caso se empleó el método Biuret, el cual se basa en la reacción de las proteínas con una solución alcalina de sulfato de cobre (II) produciendo una coloración medible a 545 nm en el espectrofotómetro, siendo necesaria la preparación de una curva de calibración de albumina para posteriormente realizar la determinación respectiva de las proteínas.

La curva de calibración con albumina se preparó tomando 1 g de albumina el cual será transferido a un balón aforado de 100 mL agregando agua destilada mientras se agita vigorosamente hasta disolver el sólido por completo. Esta preparación será utilizada como la solución madre estándar, siendo esta el punto más alto en la curva de calibración. La concentración final de esta solución es de 10.000 ppm.

Posteriormente se prepararon 100 mL del reactivo Biuret, para el cual es necesario mezclar 0,19 g de sulfato de cobre(II) pentahidratado y 0,335 g de EDTA disódico en 50 mL de agua desionizada,

se agita hasta que se disuelven completamente ambos sólidos y se procede a agregar 5 g de hidróxido de sodio, se agita y se afora hasta 100 mL con agua destilada.

Para la curva de calibración se transfieren de manera secuencial alícuotas definidas de la solución madre en tubos de ensayo individuales, mezclando también 1 mL de la solución Biuret para cada uno de ellos. Se mide la absorbancia de las muestras para la curva de calibración utilizando una longitud de onda de 545 nm.

Tabla 11.

Curva de calibración de albumina.

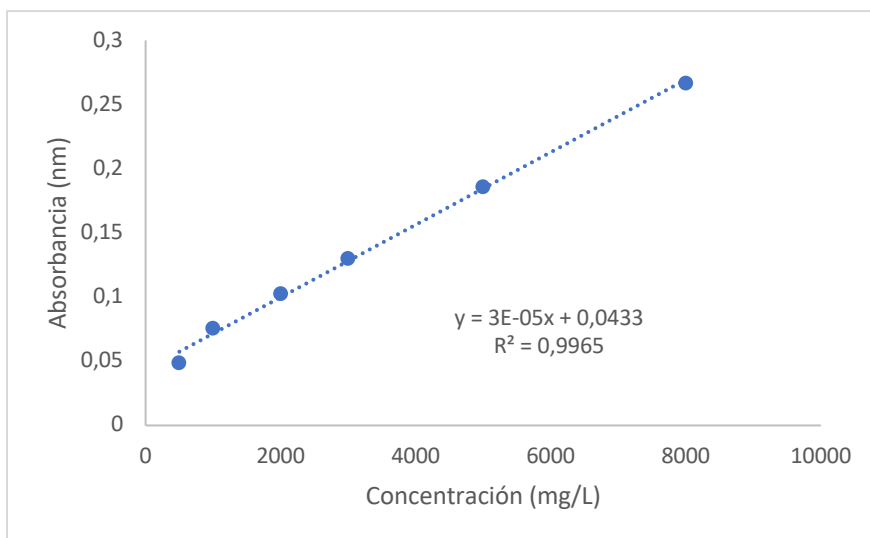
Punto de la curva	Volumen solución Biuret (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen de Biuret (mL)	Concentración final (ppm)	Absorbancia A 545 nm
1	0,5	8,5	1	500	0,049
2	1	8	1	1.000	0,076
3	2	7	1	2.000	0,103
4	3	6	1	3.000	0,130
5	5	4	1	5.000	0,186
6	8	1	1	8.000	0,267

Nota: La anterior tabla demuestra las absorbancias obtenidas para la curva de calibración de la albumina.

Se graficaron los datos obtenidos con el espectrofotómetro para elaborar la curva de calibración, una vez graficados se realizó una regresión lineal la cual arroja los datos de m y b que serán de vital importancia para obtener los resultados en concentración ppm.

Figura 12.

Curva de calibración de albumina.



Nota: Se observa los datos obtenidos para la curva calibración de albumina. .

Seguidamente, se realiza la cuantificación de proteínas de las enzimas en donde se deben tomar alícuotas de estas, las cuales se transfieren a tubos de ensayo individuales agregando también 1 mL de reactivo Biuret para cada una y su respectivo duplicado como se puede observar en la tabla 12, en donde se lee la absorbancia con una longitud de onda de 545 nm al igual que la curva de calibración. Posteriormente, se calcula la concentración en ppm para cada una de las muestras analizadas en el espectrofotómetro teniendo en cuenta el valor de la pendiente y corte obtenidos en la gráfica 3.

Tabla 12.

Muestras de enzimas para cuantificación de proteínas.

Volumen de enzima (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen de Biuret (g)	Absorbancia 545 nm	Concentración (ppm)	Porcentaje
1	8	1	0,182	4623,3	4,62
1	8	1	0,187	4790,0	4,79

Nota: Determinación cuantificación de proteínas.

Con respecto a los datos obtenidos con esta cuantificación de proteínas se logró identificar que la enzima utilizada de Biozymex con celulasas neutras tiene un porcentaje de proteína del 4,70 % lo que quiere decir que por cada 100 mL de solución de enzima se tiene alrededor del porcentaje obtenido en enzimas.

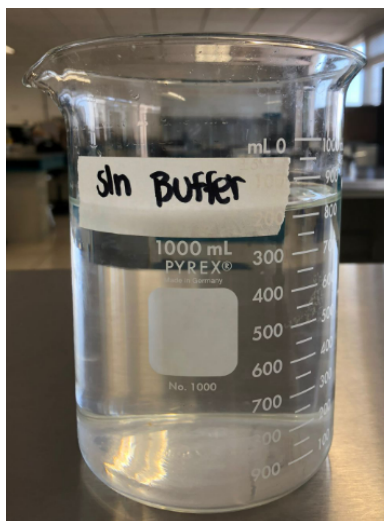
2.3.2 Actividad enzimática

Fue necesario realizar la medición de la actividad enzimática de la solución de enzimas que se utilizarían en el procedimiento de obtención de azúcares fermentables. Este proceso se llevó a cabo con el fin de medir la velocidad de una reacción catalizada por la mezcla para generar combinaciones de soluciones de sustrato y enzima en condiciones de temperatura constante junto con una solución buffer pH 5.

Para iniciar con la medición se preparó la solución buffer la cual consiste en 12,903 g de citrato de sodio y 9,606 g de ácido cítrico diluido en un litro de agua destilada, al mezclar todo de manera homogénea se procedió a medir el pH de la solución procurando que esta quede en un pH 5 como se puede observar en la figura 11.

Figura 13.

Solución buffer.

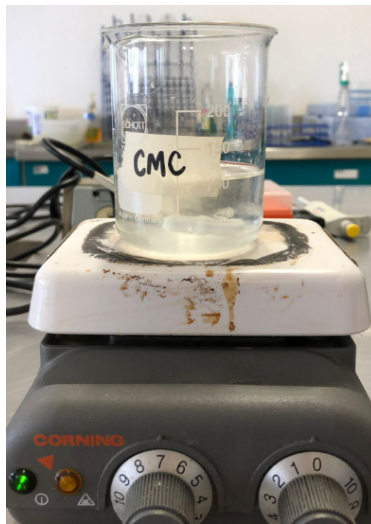


Nota: Se observa la solución buffer. .

Posterior a lo anterior para identificar la actividad se tomaron 2 g de carboximetilcelulosa (CMC) y se diluyeron en 100 mL de la solución buffer previamente elaborada con ayuda de agitación constante tal como lo muestra la figura 11.

Figura 14.

Preparación CMC al 2%.



Nota. Preparación de CMC. .

Para ver el comportamiento de la enzima se procedió a realizar la disolución de concentraciones de enzima que se va a analizar, para este caso se analizó 10 mL de enzima con 5 mL de CMC preparado anteriormente y 5 mL de agua destilada, se realizó duplicado a esta disolución y se llevó a calentamiento a una temperatura constante de 50 °C en un tiempo de reacción de 60 minutos como se observa en la figura 12.

Figura 15.

Concentración de enzima.



Nota: Cuantificación de proteína en la enzima. .

Pasada la hora se deja enfriar la muestra y se procede a realizar la lectura de los azúcares reductores obtenidos mediante el mismo método de DNS. Al tener las absorbancias de cada muestra se realizó

el cálculo correspondiente a los azúcares reductores según la ecuación 11 teniendo en cuenta que los datos de m y b son constantes obtenidos en la curva de calibración en donde m es 0,0078 y b es 0,1301. Al diluir cada muestra 0,1 mL en 4,9 mL de agua a la concentración obtenida anteriormente se multiplicó por 100 para obtener la concentración real en partes por millón de cada muestra. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13.

Concentración de la muestra de enzima.

Muestra enzima	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración (ppm)
10 mL (1)	2,178	295,9	29591,0
10 mL (2)	2,182	296,4	29642,3

Nota. Se observan la concentración real de cada muestra de enzima.

Una vez teniendo la concentración en ppm se procedió a realizar el cálculo de la actividad enzimática para el cual se utilizó la siguiente ecuación.

$$\frac{UA}{L} = \frac{(C_{gm} - C_{gb})}{MMa} \times 10^6 \times D \quad Ec (15)$$

Donde

C_{gm} : Concentración de azúcar en la muestra en g/L.

C_{gb} : Concentración de blanco en la muestra en g/L.

MMa : Masa molecular del azúcar patrón en g/mol.

t_R : Tiempo de reacción en minutos.

Para desarrollar la anterior ecuación se convirtió los datos obtenidos en la tabla 14 a g/L, se utilizó una masa molecular constante de 180,156 g/mol y un C_{gb} de CMC siendo este el blanco obtenido de la muestra a analizar con un valor de 1,68 g/L. Los resultados obtenidos al realizar la ecuación anterior se pueden evidenciar en la tabla 14.

Tabla 14.

Resultados de la unidad de actividad de celulosa por litro.

Muestra enzima	Concentración (g/L)	UA/L
10 mL (1)	29,591	5164,090
10 mL (2)	29,642	5173,579

Nota. Se registran los datos obtenidos de la unidad de actividad de celulosa por litro de las muestras con enzima.

Al tener los anteriores resultados se pudo evidenciar que la enzima que se utilizara para las posteriores hidrólisis funciona para la producción de azúcares, siendo esta la principal forma de obtención de carbohidratos reductores a partir del bagazo de agave cenizo.

2.3.3 Determinación de azúcares fermentables con hidrólisis enzimática

Para iniciar con la hidrólisis enzimática es importante volver a realizar una curva de calibración de la misma manera como se mencionó anteriormente al inicio de las digestiones ácidas al prepararse con glucosa (sección 8.1), dando como resultado las absorbancias que se observan en la siguiente tabla.

Tabla 15.

Absorbancia curva de calibración.

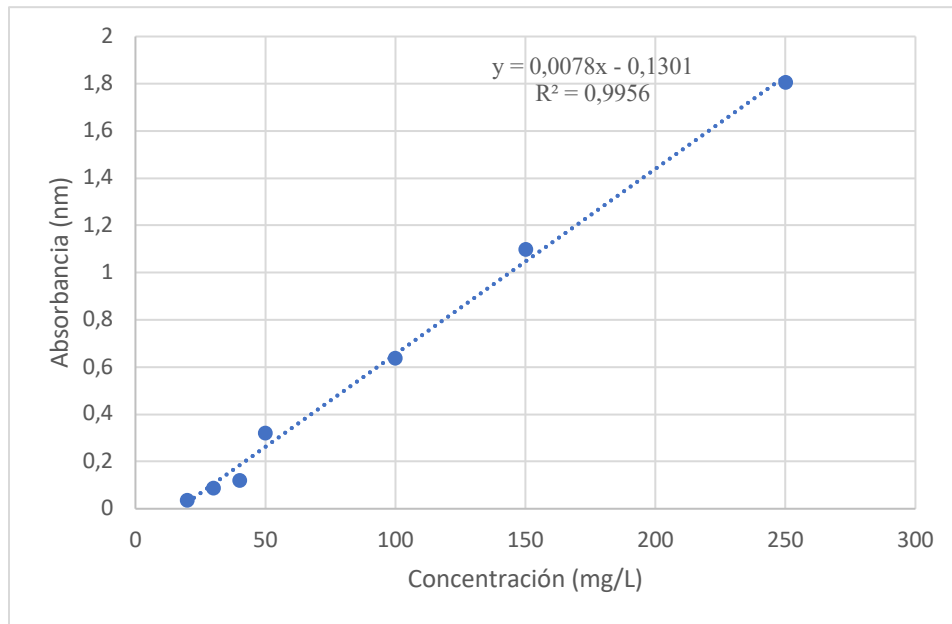
Concentración (ppm)	Absorbancia
20	0,036
30	0,088
40	0,122
50	0,321
100	0,639
150	1,100
250	1,806

Nota. Se puede observar la absorbancia de las muestras de glucosa con ayuda del espectrofotómetro.

Se graficó los datos obtenidos con el espectrofotómetro para elaborar la curva de calibración, una vez graficados se realizó una regresión lineal la cual arroja los datos de m y b que serán de vital importancia para obtener las lecturas de la actividad enzimática, hidrólisis ácido-enzimática e hidrólisis enzimática.

Figura 16.

Curva de calibración realizada en Durango.



Nota. Se realizó una segunda curva de calibración con ayuda del espectrofotómetro.

Una vez elaborada una nueva curva de calibración y con esta una nueva ecuación de la recta arrojando los datos de m y b se procede con la hidrólisis enzimática.

Para comenzar con la hidrólisis se preparó una solución buffer a un pH de 5, esto descrito en el ítem 9.2 en la determinación de la actividad enzimática. Esta solución se emplea para mantener un pH óptimo para la actividad enzimática debido a que tienen la capacidad de resistir cambios significativos en el pH cuando se agregan ácidos o bases, y las enzimas son altamente sensibles a cambios en esta propiedad y su actividad puede llegar a variar dependiendo de la condición en la que se encuentren.

Luego de esto, se realiza un diseño de experimentos de un factor con el fin de encontrar las condiciones de mayor producción de azúcares, en este se varia el volumen de enzimas

suministradas, la cual se decide por cantidades de 100 mL, 50 mL y 10 mL cada una con su respectiva replica garantizando así resultados con mayor precisión, agregando como sustrato 10 g de muestra de bagazo de *agave durangensis*. Para cada muestra se agregan 150 mL de la solución buffer preparada anteriormente teniendo presente que el pH se mantenga en un valor de 5, con una temperatura de 50 °C y un tiempo de reacción de 24 horas.

Figura 17.

Enzimas celulasas.



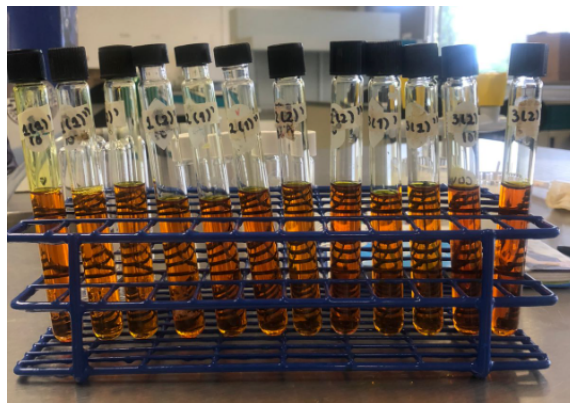
Nota: La figura anterior muestra la enzima utilizada en el proceso. Enzimas celulasas neutras

<Mercado libre> Tomada de: <https://listado.mercadolibre.com.mx/celulasas-enzimas>

Pasado el tiempo de reacción se procede a la determinación de los azúcares producidos en esta hidrólisis por lo que es necesario identificar el método por el cual se iban a cuantificar los azúcares reductores, que al igual que las dos anteriores hidrólisis, la técnica elegida fue la técnica de Miller por espectrofotometría utilizando DNS con una longitud de onda de 540 nm basándose en los datos recolectados en la curva de calibración, la medición se realizó de la misma manera que la sección 8.2.3 con su respectivo duplicado tal como se muestra en la figura 14.

Figura 18.

Método DNS de hidrólisis enzimática.



Nota: Se evidencia lo obtenido en la hidrólisis enzimática diluido junto con DNS para su medición.

Teniendo en cuenta la ecuación 11, se calcula la concentración de cada uno de los resultados obtenidos con el valor de la pendiente y el corte en la recta como se evidencia en la gráfica 3, con un valor de 0,0078 y 0,1301 respectivamente. Luego de esto se procede a multiplicar este valor por su correspondiente dilución, debido a que se tomó una alícuota de 0,1 mL de digestión para la medición del espectrofotómetro dando como resultado las concentraciones que se evidencian a continuación, en donde la muestra 1 contiene 100 mL de enzima, la muestra 2 contiene 50 mL de enzima y la muestra 3 contiene 10 mL de enzima.

Tabla 16.

Concentraciones obtenidas para hidrólisis enzimática.

Muestra	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
1(1)	0,39	66,7	6667,9
1(2)	0,38	65,4	6539,7
2 (1)	0,474	77,4	7744,9
2 (2)	0,53	84,6	8462,8
3 (1)	0,307	56,0	5603,8
3 (2)	0,247	48,3	4834,6

Nota: Concentración real de digestiones. .

Al haber adicionado diferentes cantidades de enzima en distintos volúmenes es necesario conocer la concentración de la enzima en cada muestra, por lo que para saber el porcentaje de concentración final de la enzima es necesario realizar la ecuación 10. En donde:

C_1 : Concentración inicial de enzima (4,70 %).

V_1 : Volumen inicial (mL).

C_2 : Concentración final de enzima (%).

V_2 : Volumen final (mL).

Se realiza la ecuación 10 para cada muestra debido a que todas tienen un volumen inicial y volumen final distinto, respecto a la concentración inicial esta es constante para todas las muestras puesto que esta es la concentración a la que viene la enzima cuyo dato fue obtenido en la sección 9,1 en la cuantificación de proteínas, teniendo esos tres datos se hace el debido despeje y se conoce la concentración final de enzima en porcentaje como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 17.

Concentración de enzima en cada muestra de hidrólisis.

Muestra	Concentración inicial (%)	Volumen inicial (mL)	Concentración final (%)	Volumen final (mL)
1	4,70	100	1,88	250
2	4,70	50	1,17	200
3	4,70	10	0,29	160

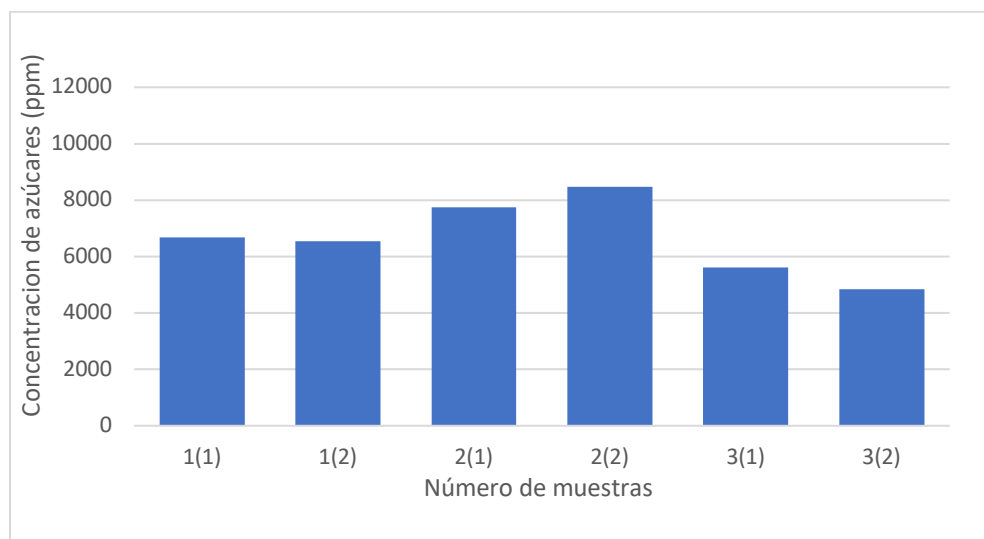
Nota. Se evidencia la concentración de enzima en cada muestra hidrolizada.

Basándose en los datos experimentales obtenidos en esta hidrólisis enzimática se puede deducir que las enzimas utilizadas en este proceso, producen de manera eficiente carbohidratos reductores. Las condiciones a las que se trabajó dicha enzima fueron favorables para la producción de azúcares, teniendo en cuenta que a pesar de que el volumen de enzimas adicionado cambiaba, con 100 mL y 50 mL de enzima se logra obtener resultados óptimos, en donde se tiene presente que la temperatura y el pH son muy importantes en el proceso.

En base a los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática con celulasas neutras, se logra deducir que la mayor producción de azúcares fermentables se obtuvo con una proporción de 1:5 m/v, es decir, por cada 10 g de bagazo de agave cenizo se utilizaron 50 mL de enzimas del diseño de experimentos planteado y mencionado anteriormente, las cuales pueden ser evidenciadas en la gráfica 4. Esto en comparación a lo publicado por Velasco (2019) que utiliza una proporción diferente, siendo esta 1:10 m/v (5 g de muestra con 50 mL de enzima) para el bagazo de agave tequilana de la cual obtiene una cantidad de 8,14 g/L de azúcares, un pH de 5 y un tiempo de reacción de 24 horas en agitación constante. Debido a esto se puede analizar que al aumentar la proporción de bagazo con enzima se puede lograr obtener una cantidad mayor de producción, que para este proyecto es de 8,4 g/L evidenciando que esta generación de carbohidratos es proporcional a la cantidad de bagazo/enzima que se agrega teniendo en cuenta que cumpla con las condiciones óptimas para el uso de dicha enzima.

Figura 19.

Concentración de azúcares en ppm.



Nota: La figura demuestra la concentración de azúcares obtenida en el proceso de hidrólisis enzimática.

Cabe resaltar que para tener una correcta lectura de la gráfica es necesario tener en cuenta que la muestra 1 contiene 100 mL de enzima con la cantidad de sustrato mencionado anteriormente y su

respectivo duplicado, de igual manera las muestras 2 y 3 en donde cada una contiene 50 mL y 10 mL respectivamente.

Es de gran importancia el uso de una solución buffer de citratos para lograr mantener la mezcla de enzimas con bagazo al pH correspondiente para lograr rendimientos altos de las celulasas neutras obteniendo de esta manera una producción óptima de carbohidratos.

También se puede observar que la enzima trabajada se utiliza principalmente en la industria textil, se pueden encontrar variedad de estas que son específicas para hidrolizar materiales lignocelulósicos como bien lo es la Novozymes. Sin embargo, se logra obtener una concentración de carbohidratos altos con una enzima diferente como lo es la Biozymex. dando a entender que la condición óptima en este proceso sería una solución de 50 mL de enzima.

Para calcular el rendimiento de lo obtenido en la hidrólisis enzimática se realiza de la misma manera que en la hidrólisis ácida en donde se toma como base de cálculo dato teórico sobre la cantidad de carbohidratos reductores producidos a partir de la muestra de bagazo siendo este 44,85 g/L, teniendo en cuenta el anterior dato se obtiene el porcentaje de rendimiento de la condición de la muestra 2 a la cual se le adicionó 50 mL de enzimas teniendo una concentración de 8,4 g/L alcanza un rendimiento de 18,86%.

2.4 Hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido

El siguiente procedimiento trata de la prueba ácido-enzimática que se le realizó al bagazo de agave cenizo con el mismo fin de obtener los azúcares fermentables y de esta manera llevar a cabo la debida comparación entre los diferentes procedimientos utilizados y cuál es el más eficaz para la producción de carbohidratos reductores.

En cuanto a lo anterior esta prueba consiste en la adición de las enzimas celulasas neutras a la prueba anteriormente realizada siendo de manera un pretratamiento para realizar la hidrólisis enzimática.

Una vez teniendo los datos de la concentración de la enzima y el cálculo de actividad enzimática se procedió a continuar con lo propuesto inicialmente de realizar una tercera hidrólisis siendo esta con la adición de la enzima celulasa neutra.

La hidrólisis ácido – enzimática o también nombrada como hidrólisis con pretratamiento consiste en utilizar lo obtenido de la hidrólisis ácida anteriormente descrita y adicionarle la enzima que será la que aumentará la producción de azúcares reductores. Teniendo en cuenta lo anterior se decidió realizar esta hidrólisis repitiendo inicialmente la hidrólisis ácida con la cual dio la menor producción de azúcares para observar el comportamiento de esta con la enzima, y de esta manera observar si hay incremento de carbohidratos presentes en el bagazo de *agave duranguesis*.

Se repitió el mismo procedimiento de hidrólisis ácida pero esta vez solo con el método que produjo menor cantidad de azúcares, según los resultados anteriores la menor producción de carbohidratos fermentables ocurrió en un pH 3 con un tiempo de reacción de 15 min por lo que se volvió a realizar esta hidrólisis con el mismo ácido clorhídrico y la misma cantidad de bagazo de agave cenizo. Se llevó a cabo tres digestiones en condiciones iguales como se puede observar en la figura 14 y se determinó la cantidad de azúcares obtenidos por el método DNS como anteriormente se mencionó con una dilución 0,1 mL de muestra de hidrólisis con 4,9 mL de agua destilada.

Figura 20.

Digestiones hidrólisis ácida.



Nota. Se observan las tres hidrólisis en pH 3 y tiempo de reacción de 15 min.

Tabla 18.

Concentración de azúcares de la hidrólisis ácida.

Muestra	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
1 (1)	0,028	20,3	2026,9
1 (2)	0,035	21,2	2116,6
2 (1)	0,037	21,4	2142,3
2 (2)	0,036	21,3	2129,5
3 (1)	0,035	21,2	2116,6
3 (2)	0,030	20,5	2052,6

Nota. Se observan la concentración real de cada muestra hidrolizada.

Al tener los resultados nuevos de la hidrólisis ácida con pH 3 en un tiempo de reacción de 15 min, se procedió a comenzar con la hidrólisis ácido-enzimática tomando lo resultante de las digestiones ácidas, se filtró y se le adicionó diferentes concentraciones de enzima para analizar su comportamiento dependiendo de la cantidad de enzima presente.

Lo obtenido en la hidrólisis ácida de las tres digestiones se lleva a un pH 5 con ayuda de hidróxido de sodio, una vez estabilizado el pH se adicionó 100 mL en cada balón de condensación a los cuales se adicionó 100 mL, 50 mL y 10 mL de enzimas celulasas neutras como se muestra en la tabla 19, se llevó a calentamiento a una temperatura de 50 °C y se dejó un tiempo de reacción de 24 horas, el montaje se puede observar en la figura 16.

Para determinar la concentración de la enzima en cada una de las muestras se realiza lo mismo que en la sección 9.3 utilizando la ecuación 10 variando la cantidad de volumen, dando una concentración.

Tabla 19.

Concentración de enzima en cada muestra.

Muestra	Concentración inicial (%)	Volumen inicial (mL)	Concentración final (%)	Volumen final (mL)
1	4,70	100	2,35	200
2	4,70	50	1,56	150
3	4,70	10	0,43	110

Nota. Se observan las concentraciones de la enzima adicionada a la muestra.

Figura 21.

Montaje digestión ácido-enzimática.



Nota. Se observa el montaje de la hidrólisis ácido-enzimática con tres diferentes concentraciones de enzima.

Una vez pasadas las 24 horas se desmontó la digestión, se dejó enfriar y se determinaron los azúcares presentes por medio del método DNS, en donde se realizó la lectura de la misma manera que la hidrólisis ácida, se realizó duplicado de cada una de las muestras y se obtuvo una producción de azúcares.

Tabla 20.

Concentración de azúcares obtenidos en la hidrólisis ácido-enzimática.

Muestra	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
1 (1)	0,234	46,679	4667,948
1 (2)	0,250	48,730	4873,076
2 (1)	0,156	36,679	3667,948
2 (2)	0,195	41,679	4167,948
3 (1)	0,102	29,756	2975,641
3 (2)	0,140	34,628	3462,820

Nota. Se puede observar la concentración de azúcares obtenidos de cada muestra.

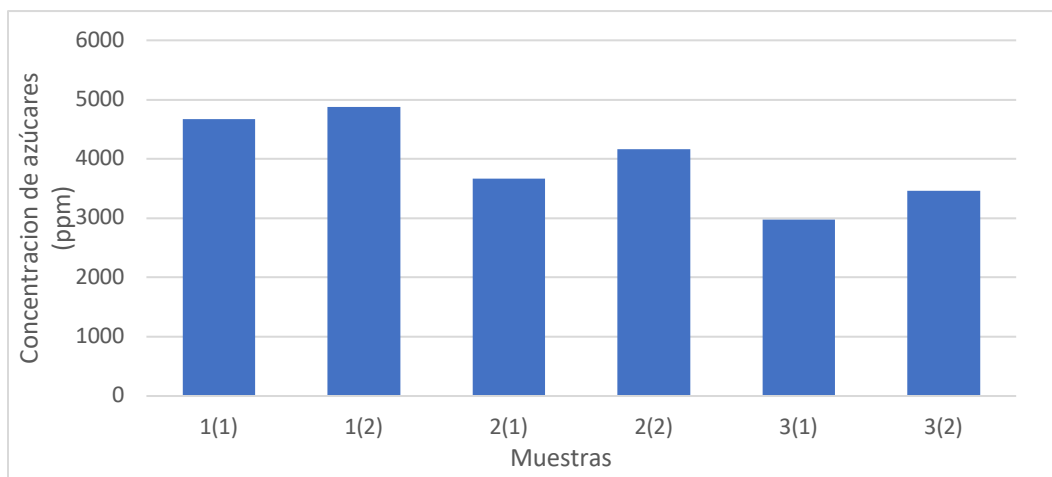
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática con un pretratamiento ácido, se pueden analizar diferentes aspectos como bien es el pretratamiento que se realizó ya que fue elegido con unas condiciones de ácido clorhídrico diluido con un pH 3, a un tiempo de reacción de 15 minutos debido a que este es el que menor cantidad de carbohidratos produjo con el fin de aumentar dicha producción. Este tratamiento es clave para obtener una conversión más alta dado que hay diversos factores que pueden afectar la producción de azúcar.

El ácido que comúnmente es usado para este tipo de pretratamientos es el ácido sulfúrico, sin embargo, en este trabajo se utilizó ácido clorhídrico se puede obtener un aumento considerable en la producción de carbohidratos en comparación a la hidrólisis ácida realizada anteriormente con un tiempo de reacción de 15 minutos, se logra el aumento de azúcares fermentables, pero no supera la cantidad generada en este mismo tipo de hidrólisis a un mayor tiempo de reacción.

Como se observa en la gráfica 6, la concentración en las muestras uno, con un volumen de 100 mL de enzimas tienen un promedio de azúcares producidos de 4770 ppm, las muestras dos con 50 mL de enzimas, un promedio de 3917 ppm y las muestras tres un promedio de 3219 ppm con 10 mL de enzimas, en donde se evidencia que las primeras muestras fueron las que mayor producción de carbohidratos se obtuvieron.

Figura 22.

Concentración de azúcares en ppm.



Nota: La figura demuestra la concentración de azúcares obtenida en el proceso de hidrólisis ácido-enzimática.

Cabe resaltar que para tener una correcta lectura de la gráfica es necesario tener en cuenta que la muestra 1 contiene 100 mL de enzima con la cantidad de sustrato mencionado anteriormente y su respectivo duplicado, de igual manera las muestras 2 y 3 en donde cada una contiene 50 mL y 10 mL respectivamente.

Según Velasco (2019), se trabaja con bagazo de agave tequilana bajo un pH de 5 con una solución enzimática, a una temperatura de 50 °C, con un tiempo de reacción de 20 horas y una proporción de 2:10 (%m/v) en donde obtienen una producción de azúcares fermentables de 58,12 g/L utilizando Cellucyme como enzimas que contiene celulasas, hemicelulasas y betaglucosidasas.[29] El presente proyecto se llevó a cabo con bagazo de agave cenizo bajo un pH de 5 con una solución enzimática de Biozymex la cual contiene celulasas neutras, una temperatura constante de 50 °C y un tiempo de reacción de 24 horas, teniendo en cuenta la proporción manejada para esta hidrólisis, por cada 100 mL de hidrolizado ácido se agregan 100 mL, 50 mL y 10 mL de enzimas correspondientemente.

Según Gutiérrez y Trujillo, al realizar un pretratamiento ácido posterior a la hidrólisis enzimática se pueden obtener concentraciones de azúcar más altas en comparación a una hidrólisis sin este

pretratamiento cómo se logra observar la hidrólisis realizada con pretratamiento ácido y sin este [30]

La hidrólisis enzimática con un pretratamiento demostró un aumento considerable de azúcares reductores, teniendo en cuenta que fueron utilizadas las condiciones en las que se observó una menor producción de azúcares desde la hidrólisis ácida con la cual se realizó el pretratamiento. Sin embargo, la hidrólisis ácida con un tiempo de 40 minutos a una temperatura constante de 80 °C sigue teniendo una producción mucho mayor que esta hidrólisis, por lo que se puede analizar que realizar un pretratamiento al hidrolizado ácido mejora la producción de carbohidratos, pero con un mayor tiempo de reacción se pueden obtener resultados óptimos de azúcar sin la necesidad de utilizar enzimas.

Para calcular el rendimiento de lo obtenido en la hidrólisis ácido-enzimática se realiza de la misma manera que las anteriores dos hidrólisis tomando como base de cálculo dato teórico sobre la cantidad de carbohidratos reductores producidos a partir de la muestra de bagazo siendo este de 44,85 g/L, teniendo en cuenta el anterior dato se obtiene el porcentaje de rendimiento de la condición de la muestra 1 a la cual se le adicionó 100 mL de enzimas teniendo una concentración de 4,8 g/L alcanza un rendimiento de 10,7%.

2.5 Fermentación de azúcares reductores

En esta sección se realizará la fermentación alcohólica de la hidrólisis que obtuvo una mayor producción de azúcares fermentables siendo esta la hidrólisis ácida a una temperatura de 80 °C durante un tiempo de reacción de 40 min, utilizando una levadura comercial de la especie *Saccharomyces cerevisiae* para panificación “TradiPan”. La mezcla resultante del hidrolizado se neutralizo con hidróxido de sodio (NaOH) hasta obtener un pH de 7 para lograr iniciar con la fermentación.

Figura 23.

Levadura TradiPan.



Nota: Se puede observar la levadura utilizada para la fermentación. Tomado de: Panadis levadura tradi pan. <HScomercial> <https://hscomercial.mx/producto/panadis-levadura-tradi-pan-56-55g/>

Inicialmente se debe activar la levadura para lo cual se utilizó un beaker de 250 mL de agua destilada y se calentó hasta una temperatura de 28 °C, una vez que la muestra es calentada se añadieron 2 g de levadura por cada 100 mL de hidrolizado a fermentar. Luego de esto, se dejó reposar de 10 a 15 minutos y finalmente se agregó esta mezcla al hidrolizado.

Se hizo uso de tres botellas con una capacidad de 1 litro cada una, se agregaron aproximadamente 300 mL de hidrolizado ácido con 6 g de levadura luego de su respectiva activación. Posteriormente se dejó una salida de aire en la parte superior de la botella con el fin de que el CO₂ producto de la fermentación pueda ser liberado, estos envases se cubren con papel aluminio para evitar la luz directa a la mezcla y son dejados en reposo en un lugar cálido.

Figura 24.

Fermentación de hidrolizado ácido.



Nota: Se puede observar las fermentaciones del hidrolizado ácido. .

Esta fermentación tiene un tiempo de reacción de 7 días en dónde se miden en repetidas ocasiones los azúcares fermentables con el fin de poder identificar cuántos de estos han sido consumidos por la levadura adicionada, también se realiza la medición de alcohol al finalizar el tiempo de reacción utilizando un alcoholímetro. Estos datos se pueden observar en la tabla 21, que se encuentra a continuación evidenciando la concentración en ppm de carbohidratos.

Tabla 21.

Datos experimentales de la fermentación.

Muestra	Azúcares iniciales. (ppm)	Azúcares día 1 (ppm)	Azúcares día 2 (ppm)	Azúcares día 7 (ppm)	Grados de alcohol.
Fermentación 1	2635,9	2600,6	2360,3	2244,9	20°
Fermentación 2	2353,8	2341,0	2161,6	2033,3	35°

Nota: Se puede observar la concentración de azucares en los 7 días de fermentación. .

Con base a los resultados obtenidos en la fermentación del hidrolizado ácido se puede deducir que dicho hidrolizado proporcionó las condiciones necesarias para que la levadura pudiera tener una producción óptima de alcohol, como bien es el agua y azúcares reductores, cabe resaltar que al dejar un tiempo de reacción de 7 días no fue necesario la adición de ningún suplemento de nutrientes al medio de cultivo, esto debido que a medida que pasaban los días el principio activo de la levadura iba fermentando la cantidad de azúcares necesarios para producir los grados de alcohol necesarios para posteriormente rota evaporar con un agente extractivo y separar el agua del etanol.

Para dicha fermentación, fue de gran importancia la activación de la levadura a una temperatura establecida dependiendo del tipo de microorganismo que se vaya a trabajar. También, se lograron identificar factores claves para el desarrollo óptimo de esta levadura como lo es la temperatura en la que se realiza, un mínimo flujo de oxígeno teniendo en cuenta que es un proceso anaerobio y que debe tener una salida del dióxido de carbono generado y mínima iluminación debido a que puede afectar el proceso de fermentación.

Es importante tener en cuenta que la producción de alcohol (etanol) durante la fermentación depende de varios factores, incluyendo la fuente de azúcares fermentables, la cepa de levadura utilizada, las condiciones de fermentación y el tiempo de fermentación. Debido a que se obtuvo un valor alto de etanol, pero no se percibía el olor característico de esta sustancia, es posible que haya habido otras sustancias presentes en la muestra que enmascararon el olor del alcohol o que la fermentación no haya sido completa.

En el estudio mencionado de Alvarado (2021), se obtuvo un hidrolizado enzimático como fuente de azúcares fermentables y una temperatura de 60 °C, lo que podría haber favorecido la producción de alcohol por parte de la levadura utilizada, incluso si esa levadura normalmente se usa para panadería y no tiene como objetivo principal la producción de alcohol.

2.6 Rota evaporación para la obtención de etanol anhidro

Por último, se realizan varias destilaciones con el uso del rota-evaporador el cual es un equipo de destilación a vacío, con el fin de poder separar mezclas líquidas que tienen un punto de ebullición cercano, pero al presentarse en estas condiciones puede ocasionar algunas variaciones en estos parámetros.

Teniendo en cuenta que se realizaron dos fermentaciones las cuales obtuvieron un grado de alcohol entre 20° y 35° posterior a dicho proceso, se continúa con la separación del etanol producido a través de tres destilaciones: la primera destilación destinada a separar inicialmente el alcohol producido de restos de la hidrólisis realizada, la segunda y tercera destilación se basan en utilizar un solvente que en este caso será el glicerol con el fin de lograr romper el azeótropo formado entre el agua y el etanol producido para obtener un alcohol más puro y pueda llegar a ser usado en la industria de la biorrefinería.

Cada una de las corridas en la rota evaporación se lleva a cabo con una temperatura de 78-80 °C teniendo en cuenta el punto de ebullición del etanol en la ciudad de Durango, México; a una velocidad de rotación de 50 rpm, una presión al vacío de -0,35 atm y con un tiempo de 1 hora.

2.6.1 Primera rota evaporación

La primera rota evaporación realizada para cada una de las muestras de la fermentación se realiza una destilación a vacío sin el uso de un solvente debido a que se requiere aumentar la concentración y pureza del etanol producido en dicho proceso, separando esta sustancia que se encuentra junto al agua y demás residuos obtenidos en el hidrolizado ácido.

Figura 25.

Primera rota evaporación de las fermentaciones.



Nota: Se puede observar el montaje para realizar las rota evaporaciones. .

Después de transcurrido el tiempo, se obtiene la mezcla entre agua-etanol con una pureza alrededor de 60°- 80° de alcohol, por lo que se requiere de una segunda rota evaporación, pero como ya se

presenta el azeótropo entre estas dos sustancias es necesario el uso de un solvente que en este caso se utilizará el glicerol.

2.6.2 Segunda rota evaporación

Como se mencionó anteriormente, en esta segunda rota evaporación se lleva a cabo una destilación extractiva utilizando las mismas condiciones de la primera, es decir, una temperatura entre 78 °C y 80 °C con una velocidad de rotación de 50 rpm durante aproximadamente 1 hora y un solvente el cual es el glicerol.

Teniendo en cuenta la cantidad obtenida en ítem 12.1 son requeridos 30 mL de glicerol para lograr una mayor separación de las dos sustancias. El glicerol es agregado antes de iniciar con el procedimiento a temperatura ambiente, se agita y posteriormente se inicia.

Luego del tiempo requerido se obtiene una mezcla con un porcentaje de alcohol entre el 84° y 86° evidenciando de esta manera que aún se presenta cierta cantidad de agua en la mezcla y es requerida otra destilación extractiva.

Figura 26.

Porcentaje de alcohol de fermentación 2.



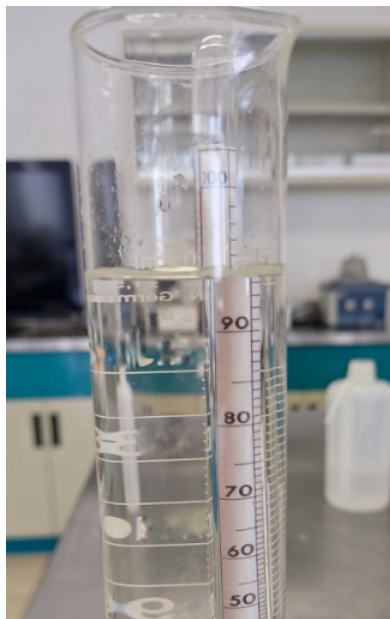
Nota: Se puede observar los grados de alcohol obtenidos después de la segunda rota evaporación. .

2.6.3 Tercera rota evaporación

Por último, se realiza nuevamente una tercera destilación extractiva teniendo en cuenta el azeótropo formado entre el agua y el etanol por lo que se sigue viendo necesario el uso del solvente para extraer con mayor facilidad el etanol. Se usan las mismas condiciones de las anteriores rota evaporaciones utilizando una temperatura de 80 °C con una velocidad de rotación de 50 rpm con 30 mL de glicerol.

Figura 27.

Porcentaje de alcohol de fermentación 2 después de tercera rota evaporación.



Nota: Se puede observar los grados de alcohol obtenidos después de la tercera rota evaporación.

En la siguiente tabla se pueden evidenciar los resultados obtenidos para cada una de las fermentaciones después de las destilaciones presentadas anteriormente.

Tabla 22.

Resultados de rota evaporación.

	Porcentaje de alcohol		
	1 ^{ra} rota evaporación	2 ^{da} rota evaporación	3 ^{ra} rota evaporación
Fermentación 1	64	84	92
Fermentación 2	66	87	96

Nota: Se puede observar los grados de alcohol obtenidos en cada rota evaporación. .

Una vez finalizada las rota- evaporaciones se mide el volumen de etanol recuperado al final de cada proceso, se obtuvo un volumen de 132 mL de la primera fermentación y 150 mL de la segunda fermentación, también cabe resaltar que los grados de alcohol obtenidos fueron medidos con un alcoholímetro de escala laboratorio.

Al tener todos los datos finales de la producción de etanol se calculó el rendimiento producto respecto al sustrato, es decir, el rendimiento del etanol producido respecto a la glucosa. Este dato se calcula mediante la ecuación 11.

$$Y'_{ps} = \frac{dP}{dS} = \frac{r_P}{r_S} \quad \text{Ec 11}$$

En donde

r_P : Es la diferencia entre el producto inicial y el producto final.

r_S : Es la diferencia entre el sustrato inicial y el sustrato final.

Con la ecuación 11 se obtuvo el cálculo del rendimiento del etanol producido respecto a la glucosa consumida en la fermentación dando un resultado de 0,266 para la fermentación 1 y 0,369 para la fermentación 2. Según literatura el rendimiento teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0,511, teniendo en cuenta el anterior valor los rendimientos experimentales comparándolos con el teórico son de 52% y 72% respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos por las rota- evaporaciones realizadas se pudo evidenciar que es necesaria una primera corrida en el equipo para conseguir la mayor cantidad de mezcla etanol-agua producida posterior a la fermentación, separando los residuos sólidos del hidrolizado ácido y el líquido sobrante que no logra fermentar. En la segunda destilación es necesario el uso

de un solvente para lograr romper el azeótropo formado entre dicha mezcla, como se mencionó anteriormente la sustancia extractiva seleccionada fue el glicerol teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Puchin y Ruiz (2017) en donde esta sustancia alcanza una separación óptima[31]. Por último, la tercera rota evaporación se realizó con el fin de obtener etanol con un mayor porcentaje de pureza para poder usarlo en la industria de la biorrefinería, utilizando también el glicerol como solvente y las mismas condiciones de operación que las anteriores.

Es de vital importancia tener presente la temperatura a la que se programa el rota-evaporador debido a que esta debe superar el punto de ebullición del etanol, pero no la del agua, en base a que el proceso se lleva a cabo a una presión menor a la atmosférica la cual es -0,35 atm. Debido a que esta parte del proyecto se realizó en la ciudad de Durango, México, la cual tiene una altitud de 1.775 metros sobre el nivel del mar, influyendo en algunas propiedades de las sustancias trabajadas como lo es el punto de ebullición, es por esto que se tomó el rango de temperatura del proceso mencionado con anterioridad.

Respecto a la cantidad obtenida de etanol se logra recuperar entre el 31% y 32% del total de solución fermentada, en donde según el documento de Montiel (2017) el cual alcanza una recuperación de etanol del 4% aproximadamente de la mezcla inicial utilizando una destilación azeotrópica a 30 °C con n-Pentano como sustancia extractiva con ayuda del simulador ASPEN PLUS, deduciendo que a pesar que se obtiene un porcentaje mayor de pureza con otra sustancia como solvente se recupera muy poco volumen de etanol en comparación a la cantidad inicial de fermentado [32]. En relación con el presente proyecto, se obtiene una mayor proporción de etanol resultado del destilado, pero con un porcentaje menor de pureza, evidenciando que se puede hacer uso de una sustancia extractiva diferente al glicerol para lograr un alcohol más puro utilizando una proporción similar a la trabajada con el fin de producir una cantidad más alta de alcohol con una pureza mejor.

2.7 Diseño de planta piloto del proceso de producción de bioetanol a partir de bagazo de *agave durangensis*.

En este capítulo se describirán las generalidades del proceso de producción de etanol a partir de bagazo de *agave durangensis*, mostrando el diseño de una planta piloto de este mediante diagramas de bloques y PFD, realizando una descripción de los equipos seleccionados junto con los

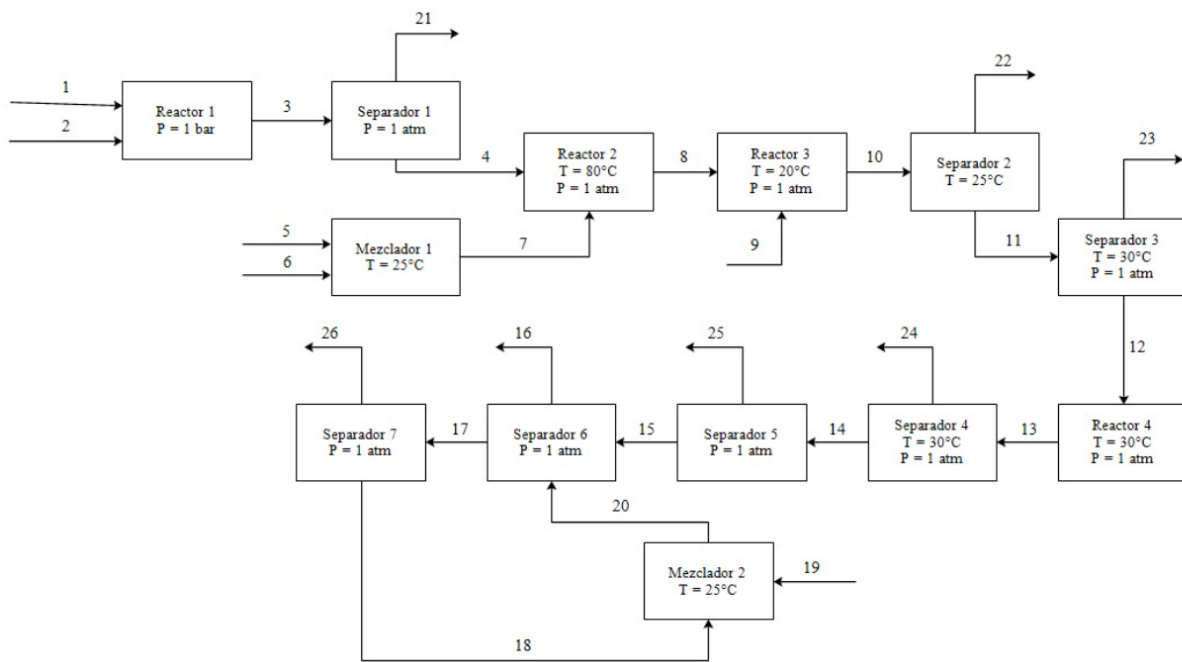
respectivos balances de masa en base a los resultados obtenidos mediante el simulador Aspen Plus V10.

2.7.1 Generalidades del proceso

En el proceso de producción de bioetanol se hace un escalado 1:10000 teniendo en cuenta que se diseñó con base en lo realizado en el laboratorio; se requiere realizar primeramente un secado a la biomasa con el fin de retirar la humedad que esta pueda contener, luego de esto se procede a realizar la respectiva hidrólisis, con el fin de producir la glucosa necesaria para el siguiente proceso a desarrollar siendo este la fermentación, para posteriormente destilar este producto utilizando como solvente glicerol y obtener bioetanol.

Figura 28.

Diagrama de bloques de proceso de producción.



Nota: Se puede observar el proceso de obtención de bioetanol a partir de bagazo de agave.

Se establece un flujo de alimentación de 100 kg/h de bagazo de *agave durangensis* húmedo para los procesos planteados anteriormente, teniendo en cuenta que la humedad de salida promedio del bagazo de agave se encuentra entre 60-90% [33].

La elección del modelo termodinámico adecuado para simular la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos es fundamental. Varios artículos sugieren que el modelo Non Random Two Liquids (NRTL) es el más apropiado debido a la presencia de componentes polares, mezclas azeotrópicas y dos fases líquidas en algunas etapas del proceso, por lo tanto, en el estudio en cuestión, se utilizó el modelo NRTL como modelo termodinámico para cada uno de los procesos presentes.

2.7.2 Descripción del proceso

En la primera sección del proceso de producción de bioetanol se realiza el secado de la materia prima utilizando un reactor RStoic a una temperatura de 20 °C y una presión de 1 atm en el cual entran 100 kg/h de bagazo de agave cenizo (corriente 1) como se puede evidenciar en el Anexo 2 y 500 kg/h de aire con una composición de 79% de nitrógeno y 21% de oxígeno (corriente 2). Para esto, se deben especificar las propiedades: ULTANAL y PROXANAL de esta materia que se pueden observar a continuación.

Tabla 23.

Análisis ultanal del bagazo de *agave durangensis*.

ANÁLISIS ULTANAL	
Cenizas	7,4
Carbono	41,25
Hidrógeno	5,96
Nitrógeno	2
Cloro	0
Azufre	0
Oxígeno	43,14

Nota: Datos tomados del documento “Estudio de reducción de briquetas compuestas de mineral de hierro y bagazo de agave”[34].

Tabla 24.

Análisis proximal del bagazo de agave durangensis.

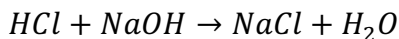
ANÁLISIS PROXIMAL	
Humedad	23,5
FC	14,5
VM	78,1
Cenizas	7,4

Nota: Datos tomados del documento “Estudio de reducción de briquetas compuestas de mineral de hierro y bagazo de agave”[34]

Para realizar la hidrólisis ácida se debe tener una humedad en el bagazo de aproximadamente 6,44 por lo que es también necesario un equipo de separación (Flash) para tener la mayor fracción de biomasa seca en el proceso.

Posteriormente, se inicia con el proceso de hidrólisis ácida en donde se hace una mezcla de 3 kg/h de ácido clorhídrico (HCl) y 1497,47 kg/h de agua con el fin de obtener un pH de 4; esta mezcla (corriente 7) entra al reactor R-102 con la biomasa seca (corriente 4). El reactor trabaja a una temperatura de 80 °C y una presión de 1 atm y es configurado para que los rendimientos masicos de los productos de este sean: Para la glucosa 0.7, el agua con un porcentaje de 0,03 y, por último, se encuentran los residuos con 0.27, estos tomados de artículos de investigación [35]

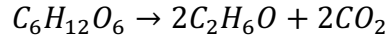
Teniendo en cuenta que el proceso anterior se realiza con ácido, esta mezcla resultante es neutralizada con 10 kg/h de hidróxido de sodio (NaOH) que viene en la corriente 9 hacia el reactor R-103, en donde esta solución se lleva a dos equipos flash, el primero para retirar el exceso de soda caustica y el segundo para separar la sal que se produce en la reacción entre el HCl y el NaOH de la neutralización:



Ácido clorhídrico + Hidróxido de sodio → Cloruro de sodio + Agua

Luego de eso, se procede a realizar la fermentación de la glucosa en donde es usado otro reactor RStoic (R-103) con las condiciones necesarias para que la levadura pueda desarrollarse de manera correcta en donde se tiene en cuenta la conversión de la glucosa la cual es del 52%, dato obtenido

en la fermentación realizada a nivel laboratorio; en esta parte del proceso se genera otra reacción en donde se obtiene el producto deseado, es decir, etanol. En base que la fermentación libera dióxido de carbono se agrega un equipo flash para que este sea extraído del reactor R-104.



Glucosa → Etanol + Dióxido de carbono

Se produce alrededor de 512 kg/h de etanol junto a otras sustancias, siendo la mayoría agua, en donde se encuentra un porcentaje de pureza del etanol del 11% aproximadamente. Para obtener un etanol de mayor pureza, se emplea un tren de separación utilizando tres torres de destilación (RadFrac).

La primera torre de destilación utilizada es la T-105, la cual cuenta con 20 etapas y una tasa de destilado de 100 kg/h, con una relación de reflujo de 30 en base másica. Esta torre se utiliza para evidenciar el azeótropo formado entre el agua y el etanol.

La segunda torre de destilación (T-106) se utiliza para realizar una destilación extractiva usando como solvente el glicerol con un flujo de 200 kg/h, esto permite separar con mayor facilidad el azeótropo que se forma y obtener el etanol con una pureza mayor al 98%.

Por último, está la torre de recuperación del solvente (T-107) la cual opera con un número de etapas de 30, una tasa de destilado de 150 kg/h y una relación de reflujo de 3 en base másica. El objetivo de esta torre es optimizar el proceso y recuperar el glicerol utilizado como solvente para ser recirculado al proceso, para esto se debe tener en cuenta que debe estar a la misma temperatura y presión que se maneja en la torre T-106.

Tabla 25.

Especificaciones de operación de equipos.

Nombre del equipo	Condiciones de operación	Descripción del proceso
R-101 (RStoic)	$BIOMASA \rightarrow 0,05 H_2O$ Conversión fraccionaria de 0,2. Para este equipo es necesario el uso de una calculadora en el simulador Aspen Plus V10, con el fin de poder secar la materia prima eliminando su humedad inicial que es de 23,5 hasta un valor de 6,44.	Posee dos corrientes de ingreso, una de bagazo de agave con 100 kg/h y otra con 550 kg/h de aire. Se hace uso de un reactor para un mayor control y eficiencia del proceso de secado.
R-102 (RYield)	Este reactor opera a una temperatura de 80 °C y 1 atm de presión. Los rendimientos para cada uno de los productos obtenidos en esta parte son: Glucosa 0,7 Agua 0,03 Residuos 0,27	En este equipo ocurre la hidrólisis ácida, en donde se produce glucosa a partir de la biomasa con la solución de HCl en pH 3, durante un tiempo aproximado de 40 minutos.
R-103 (RStoic)	Trabaja a una temperatura de 20 °C y una presión de 1 atm. $HCl + NaOH \rightarrow H_2O + NaCl$ Conversión fraccionaria de 0,87.	Ingresa una corriente de NaOH con un flujo masico de 10 kg/h a una temperatura de 20 °C. En este reactor ocurre la neutralización de la solución posterior a la fermentación.
R-104 (RStoic)	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$ Se tiene una conversión fraccionaria del 52% para la producción de etanol. Este equipo trabaja a una temperatura de 30 °C y 1 atm de presión.	En este último reactor ocurre la fermentación de la glucosa para la producción de etanol, este sale con cierto porcentaje de agua y otras sustancias.

T-101 (Flash2)	Opera a una temperatura de 52 °C y una presión de 1 atm.	Este equipo es necesario para el secado de la biomasa, separa el nitrógeno proveniente del secado y el agua de esta misma para obtener una biomasa seca.
T-102 (Sep)	Temperatura ambiente de 20 °C y presión de 1 atm. Fracción de separación del 100% para NaOH.	Esta torre es utilizada para la separación del hidróxido de sodio después de la neutralización.
T-103 (Flash2)	Opera a una temperatura de 20 °C y una presión de 1 atm.	La torre T-103 es empleada para la separación de la sal producida en la neutralización de la glucosa generada en la hidrólisis ácida.
T-104 (Flash2)	Opera a una temperatura de 20 °C y una presión de 1 atm.	Es destinada para la salida del CO ₂ que es uno de los productos generados en la fermentación de la glucosa.
T-105 (RadFrac)	Número de etapas: 20 Condensador total Tasa de destilado: 100kg/h Relación de reflujo: 30 Etapa de alimentación: 10	En esta torre de destilación se genera un aumento en el porcentaje de pureza del etanol con el fin de evidenciar el azeótropo formado etanol-agua.
T-106 (RadFrac)	Número de etapas: 40 Condensador total Tasa de destilado: 320 kg/h Relación de reflujo: 1 Etapa de alimentación de etanol: 33 Etapa de ingreso de solvente: 2	Se realiza una destilación extractiva utilizando como solvente el glicerol con el fin de obtener etanol con un porcentaje mayor de pureza.

T-107 (RadFrac)	Número de etapas: 30 Condensador total Tasa de destilado: 150 kg/h Relación de reflujo: 3 Etapa de alimentación: 15	Se utiliza para la recuperación del glicerol utilizado en la destilación extractiva con el objetivo de recircularlo.
M-101	Opera a temperatura ambiente, alrededor de 20 °C y presión de 1 atm	Posee dos corrientes de entrada, una de ácido clorhídrico y otra de agua, estos dos se mezclan para obtener una solución con un pH de 3 con un flujo de 1500 kg/h aproximadamente.
M-102	Este mezclador opera a temperatura ambiente, alrededor de 20 °C y presión de 1 atm. Es necesario un diseño de especificaciones para asegurar un ingreso de glicerol constante en la torre T-105 de 200 kg/h.	Entra una corriente de glicerol de reposición y la corriente de recirculación de este mismo para optimizar el proceso de producción.
E-101	Temperatura de 20 °C Presión de 1 atm	Es empleado para regular la temperatura del glicerol recuperado y poder utilizarlo nuevamente en el proceso.
MB-101	Molino de bolas con capacidad de 200 kg.	Se usa para reducir el tamaño del bagazo seco y luego de esto iniciar el proceso de producción de etanol.
TK-101	Capacidad de 200 kg.	Tanque de almacenamiento del bagazo de agave cenizo.

Nota: La anterior tabla describe las condiciones de operación de cada uno de los equipos planteados para la planta piloto.

2.7.3 Balance de masa

A continuación, se puede evidenciar el balance de masa para la planta piloto planteada con una masa inicial de bagazo de agave de 100kg/h con el fin de la producción de bioetanol con un porcentaje de pureza mayor al 97% mostrando inicialmente la fracción másica de cada uno de las sustancias en las corrientes.

Tabla 26.

Balance de masa (fracción másica) primera parte.

	Corrientes (Fracción másica)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hidrógeno	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Agua	0	0	0,02	0	0	1	1	0,03	0
Glucosa	0	0	0	0	0	0	0	0,70	0
Etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glicerina	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bagazo de agave	1	0	0,10	1	0	0	0	0	0
Residuos	0	0	0	0	0	0	0	0,27	0
Nitrógeno	0	0,77	0,67	0	0	0	0	0	0
Dióxido de Carbono	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxígeno	0	0,23	0,20	0	0	0	0	0	0
Temperatura (°C)	20	52,6	52,68	52,6	20	20	20,13	80	20
Presión (atm)	1	1	0,99	1	1	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la primera parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguense. Tomado de. ASPEN PLUS V10. .

Tabla 27.*Balance de masa (fracción másica) segunda parte.*

	Corrientes (Fracción másica)								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Hidrógeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua	0,03	0,03	0,04	0,04	0,06	0,01	0,01	0,09	0
Glucosa	0,70	0,70	0,96	0,49	0,18	0,10	0	0	0
Etanol	0	0	0	0,11	0,74	0,89	0,99	0,32	0
Glicerina	0	0	0	0	0	0	0	0,59	1
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
Bagazo de agave	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Residuos	0,27	0,27	0	0	0	0	0	0	0
Nitrógeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dióxido de Carbono	0	0	0	0,36	0,01	0	0	0	0
Oxígeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura (°C)	20	80	30	30	30	78,2 0	78,2 3	85,8 9	30
Presión (atm)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la segunda parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguensis. Tomado de. ASPEN PLUS V10. .

Tabla 28.*Balance de masa (fracción másica) tercera parte.*

	Corrientes (Fracción másica)								
	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Hidrógeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua	0	0,07	0,04	0	0,01	0	0,04	0,21	0
Glucosa	0	0,39	0	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	0,50	0	0	0	0,09	0,79	0,72	0
Glicerina	1	0,03	0	0	0	0	0	0,06	1
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Bagazo de agave	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Residuos	0	0	0	0	0,99	0	1,32 e ⁻⁵	0	0
Nitrógeno	0	0	0,96	0	0	0	0	0	0
Dióxido de Carbono	0	0	0	0	0	0,90	0,16	0	0
Oxígeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura (°C)	20	20	52,6 8	20	30	30	70	79,7 6	20
Presión (atm)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la tercera parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguensis. Tomado de. ASPEN PLUS V10. .

Seguidamente se observan los flujos másicos de cada una de las corrientes con su composición de las sustancias utilizadas en el proceso de simulación de obtención de etanol a partir de la hidrólisis acida del bagazo de *agave durangensis*.

Tabla 29.*Balance de masa (flujo másico) primera parte.*

	Corrientes (Fracción másica, kg/h)						
	1	2	3	4	5	6	7
Hidrógeno	0	0	0	0	0	3	3
Agua	0	0	18,23	0	1497,4 7	0	1497,4 7
Glucosa	0	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	0	0	0	0	0	0
Glicerina	0	0	0	0	0	0	0
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	0	0	0	0	0	0	0
Bagazo de agave	100	0	81,77	81,77	0	0	0
Residuos	0	0	0	0	0	0	0
Nitrógeno	0	536,95	536,95	0	0	0	0
Dióxido de Carbono	0	0	0	0	0	0	0
Oxígeno	0	163,04	163,04	0	0	0	0
Temperatura (°C)	20	52,6	52,68	52,6	20	20	20,13
Presión (atm)	1	1	0,99	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la primera parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguensis. Tomado de. ASPEN PLUS V10. .

Tabla 30.*Balance de masa (flujo másico) segunda parte.*

	Corrientes (Fracción másica, kg/h)						
	8	9	10	11	12	13	14
Hidrógeno	0	0	0	0	0	0	0
Agua	47,47	0	47,47	47,47	42,41	42,41	40,04
Glucosa	1107,5	0	1107,5	1107,5	1107,5	110,76	110,76
Etanol	0	0	0	0	0	509,79	424,16
Glicerina	0	0	0	0	0	0	0
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	0	10	10	0	0	0	0
Bagazo de agave	0	0	0	0	0	0	0
Residuos	427,20	0	427,20	427,20	0	0	0
Nitrógeno	0	0	0	0	0	0	0
Dióxido de Carbono	0	0	0	0	0	487,01	8,20
Oxígeno	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura (°C)	80	20	20	80	30	30	30
Presión (atm)	1	1	1	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la segunda parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguensis. Tomado de ASPEN PLUS V10. .

Tabla 31.*Balance de masa (flujo másico) tercera parte.*

	Corrientes (Fracción másica, kg/h)						
	15	16	17	18	19	20	21
Hidrógeno	0	0	0	0	0	0	0
Agua	37,97	9,84	28,12	0	0	19,54	18,23
Glucosa	110,76	0	0	0	0	110,76	0
Etanol	424,16	140,15	284,01	0	0	142,59	0
Glicerina	0	0	10,1	10,1	10,1	10,1	0
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	0	0	0	0	0	0	0
Bagazo de agave	0	0	0	0	0	0	0
Residuos	0	0	0	0	0	0	0
Nitrógeno	0	0	0	0	0	0	536,96
Dióxido de Carbono	0	0	0	0	0	0	0
Oxígeno	0	0	0	0	0	0	0
Temperatura (°C)	78,20	78,23	85,89	30	20	20	52,68
Presión (atm)	1	1	1	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la tercera parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguensis. Tomado de. ASPEN PLUS V10. .

Tabla 32.*Balance de masa (flujo másico) cuarta parte.*

	Corrientes (Fracción másica, kg/h)					
	22	23	24	25	26	27
Hidrógeno	0	0	0	0	0	0
Agua	0	5,05	0	2,07	8,58	0
Glucosa	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	0	45,92	39,72	141,42	0
Glicerina	0	0	0	0	5	10,1
Cloruro de sodio	0	0	0	0	0	0
Hidróxido de sodio	10	0	0	0	0	0
Bagazo de agave	0	0	0	0	0	0
Residuos	0	426,40	0	6,59e ⁻³	0	0
Nitrógeno	0	0	0	0	0	0
Dióxido de Carbono	0	0	478,80	8,21	0	0
Oxígeno	0	0	0	0	0	0
Temperatura (°C)	20	30	30	70	79,76	20
Presión (atm)	1	1	1	1	1	1

Nota. La tabla representa la cuarta parte del balance de materia de la hidrólisis del bagazo de agave duranguensis. Tomado de. ASPEN PLUS V10. .

3. CONCLUSIONES

En este trabajo se determinaron inicialmente las características fisicoquímicas del bagazo de agave cenizo para las cuales se pudo concluir que para la medición de estas es necesario tener presente el estado en el que se encuentra la biomasa debido a que esto desempeña un papel crítico en los resultados de estas propiedades como bien lo es en la humedad, en la cual, entre más tiempo se almacene el bagazo se pueden obtener resultados variables dado que recién se obtiene el bagazo del proceso de producción de mezcal se encuentra con un porcentaje de humedad alto y al paso del tiempo este comienza a secarse. También se llega a la conclusión de que, en comparación a otros tipos de especies de agave estudiadas en la literatura, la caracterización fisicoquímica tiene valores muy similares para el agave *durangensis* sugiriendo que al ser del mismo género poseen afinidad química y estructural entre ellas, sin embargo, pueden llegar a existir diferencias bien sea en factores genéticos, ambientales o de cultivo de cada una de ellas.

Respecto a la hidrólisis ácida realizada con ácido clorhídrico a diferentes pH y diferentes tiempos de reacción, se pudo evidenciar que a un pH 3 y un tiempo de reacción de 40 minutos la cantidad de azúcares reductores producidos en la digestión es mucho mayor en comparación de las otras disoluciones de ácido dando una concentración de 13 g/L. Caso contrario del pH 4 con una concentración de 4,8 g/L en donde se observa un comportamiento en donde la producción de azúcares comienza a disminuir con el paso del tiempo de reacción, es decir, llega a un punto en donde deja de producir azúcares al no ser un pH lo suficientemente ácido para que termine por hidrolizar los monómeros de glucosa que tiene la celulosa.

Una vez realizadas las tres hidrólisis propuestas como objetivo principal del proyecto, se puede decir teniendo en cuenta los resultados obtenidos que la hidrólisis ácida es la más efectiva a la hora de producir azúcares reductores a partir del bagazo de agave *duranguensis* como materia prima, esto debido que en un menor tiempo de reacción y con la misma cantidad inicial de biomasa logra obtener aproximadamente 13 g/L en un tiempo de 40 minutos. Además de ser la que más carbohidratos reductores arroja es la más viable considerando que es la que menos insumos gasta en cada digestión al ser esta la que menor tiempo gasta en hidrolizar los azúcares de la solución.

Como se menciona anteriormente la hidrólisis ácida es la que produce una mayor cantidad de azúcares, sin embargo, también es un buen pretratamiento para empezar a incluir las enzimas con el fin de observar cómo estas se comportan a la hora de seguir hidrolizando y produciendo azúcares

aumentando las concentraciones de hidrólisis ácida de 2,1 g/L a 4,8 g/L con las enzimas, es por esto que la hidrólisis ácido-enzimática se puede considerar una buena opción para aumentar la concentración de los azúcares reductores que arroja la previa hidrólisis ácida, obteniendo de esta manera un incremento de carbohidratos y aprovechando al máximo la materia prima.

Las enzimas que se emplearon “enzimas celulasas neutras” de biozymex son utilizadas principalmente en el sector textil en el proceso de lavandería, sin embargo, al tener estas como principal activo celulosas estas fueron de vital importancia en nuestro proceso de obtención de azúcares reductores, teniendo en cuenta que esta enzima realiza la hidrólisis de la celulosa en moléculas de glucosa libre, demostrando que a pesar de que las enzimas son para otros usos sirven de manera eficaz para la producción de carbohidratos.

Por otro lado, cabe resaltar que previo al uso de la enzima en el hidrólisis enzimática y ácido-enzimática es importante realizar una revisión de la actividad enzimática, esto se hizo con el fin de conocer si la enzima está funcionando de manera que cumpla con el objetivo de producir azúcares. Esta prueba se llevó a cabo con la solución de CMC preparada, a la cual como se menciona antes se le hace un blanco que obtiene un dato de absorbancia muy mínimo a comparación de la solución de CMC con la enzima, demostrando que la cantidad de carbohidratos sube y que la enzima está trabajando de la mejor manera.

En el proceso de fermentación realizado, se hizo uso de la levadura “tradi pan” la cual como lo menciona el nombre su principal uso se da para la elaboración de pan, sin embargo, como se observa en el desarrollo de la parte final del proyecto esta levadura demostró fermentar los azúcares producidos en la hidrólisis ácida y convertirlos en etanol, teniendo en cuenta que entre los principios activos contiene *Saccharomyces cerevisiae* la cual es la encargada de producir la fermentación alcohólica.

Respecto a la simulación realizada en ASPEN PLUS V10 para el diseño de la planta piloto, se observa que en el proceso se puede llegar a obtener etanol al 98% utilizando glicerol como solvente en el cual se utilizan tres torres de destilación para la separación y purificación del etanol y la respectiva recuperación del solvente utilizado para su posterior recirculación dentro del proceso.

RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente proyecto se recomienda hacer la caracterización fisicoquímica e hidrólisis con bagazo fresco, es decir, que este tenga un corto tiempo de almacenaje y secado debido a que se obtienen resultados mucho más favorables.

En la destilación extractiva en la cual es usado el glicerol como solvente es recomendable para un proceso a gran escala, realizar una recuperación de este para disminuir costos de operación a partir de una destilación entre el agua y la sustancia ya mencionada. También es de gran relevancia tener presente la altitud del lugar en donde se realice el proceso dado que esta cambia el punto de ebullición de las sustancias y al momento de realizar la rota evaporación se puede llegar a afectar el proceso de separación de estas sustancias.

La fermentación realizada puede obtener resultados más altos del porcentaje de alcohol si se llega a trabajar con una levadura destinada para la producción de etanol teniendo en cuenta que esta debe ser activada previo al agregarse al hidrolizado. También se recomienda aumentar el tiempo de reacción durante este proceso de fermentación con el fin de obtener un mayor consumo de los azúcares y de igual manera una cantidad más alta de etanol.

En el caso de las hidrólisis, se recomienda realizar la hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido a unas condiciones de 40 minutos con un pH 3 debido a que se obtuvo la mayor producción de carbohidratos para este caso y con el uso de las enzimas aumentar esta cantidad con el fin de obtener, posterior a la fermentación, un mayor volumen de etanol. En base a que las enzimas utilizadas en este proyecto son destinadas para la industria textil, se recomienda de igual manera manejar diferentes enzimas que se usen para la producción de etanol.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Salomon Abreu Sherrer and F. Alatraste Mondragón, “Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno.”
- [2] A. M. Escalera Martínez, “Aprovechamiento del bagazo tequilero en la elaboración de precursores de vainilla.”
- [3] F. Elizabeth Rodríguez Contreras, L. Manuel Martínez Rivera, and C. Palomera García, “Contextualización socioambiental del agave en Socio-environmental contextualization of agave in Tonaya, Jalisco, Mexico.”
- [4] P. Gañán *et al.*, “CELULOSA: UN POLÍMERO DE SIEMPRE CON MUCHO FUTURO”.
- [5] “MATERIALES LIGNOCELULOSICOS 1.1 Situación actual.”
- [6] M. Chávez-Sifontes and M. E. Domine, “LIGNINA, ESTRUCTURA Y APLICACIONES: MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL LIGNIN, STRUCTURE AND APPLICATIONS: DEPOLYMERIZATION METHODS FOR OBTAINING AROMATIC DERIVATIVES OF INDUSTRIAL INTEREST,” Chávez-Sifontes & Domine, 2013. [Online]. Available: http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/15
- [7] M. A. Quintana Vega, “Aprovechamiento integral del bagazo de la piña de Agave tequilana Weber: Caracterización de fracciones lignocelulosicas obtenidas por un proceso organosolv.,” Diciembre, 2012.
- [8] M. Bener, E. Akyüz, F. B. Sen, K. S. Başkan, E. Tütem, and R. Apak, “A simple automated microplate method for determining reducing sugars in food extracts and synthetic serum using cupric-neocuproine as reductant,” *Turk J Chem*, vol. 42, no. 3, pp. 794–807, 2018, doi: 10.3906/kim-1707-30.
- [9] Elba Montserrat Alcázar Valle, “Caracterización de saponinas de Agave durangensis y salmiana, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*”.
- [10] P. M. , H.-R. A. , M.-G. J. , M.-S. M. , A.-C. O. , V.-L. B. , C.-R. J. J. 2021. López-Serrano, “Mejores prácticas de manejo y ecuaciones alométricas de biomasa de Agave durangensis Gentry en el estado Durango.”
- [11] Rosales Mata Sergio, M. Hernandez, H. Sarmiento, and J. Sigala, “PRODUCCIÓN DE PLANTA DE Agave durangensis EN SISTEMA DE ACOLCHADO Y RIEGO POR GOTEÓ,” 2008.
- [12] R. Medina Imelda, C. Robles Aurelio, N. Jimenez Néstor, and R. García Jair Hissarly, “El mezcal de Durango, México: un análisis histórico, biológico y económico para su producción sustentable.”

- [13] H. Vidales, “Métodos de extracción de nanocelulosa a partir de residuos de Agave spp.,” 2019.
- [14] G. Alberto *et al.*, “TIEMPOS DE APILADO DEL BAGAZO DEL MAGUEY MEZCALERO Y SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES DEL COMPOST PARA SUSTRATO DE TOMATE.”
- [15] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), “Etanol-Cadena agroindustrial,” 2004.
- [16] S. Alvarez, P. Evelson, and A. Boveris, “El combustible del futuro,” 2008.
- [17] Asociación Argentina de Farmacéuticos de Hospital (AAFH-EH)., “Alcohol Etilico como Antiséptico y Desinfectante Alcohol Etilico como Antiséptico y Desinfectante Ethyl Alcohol as an Antiseptic and Disinfectant.”
- [18] R. Sanchez and M. Campoy, “Ingeniería básica de una planta de producción de etanol a partir de gas de síntesis,” 2020.
- [19] L. J. Burgos Montañez, “Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico,” *Questionar: Investigación Específica*, vol. 7, no. 1, pp. 57–66, Dec. 2020, doi: 10.29097/23461098.308.
- [20] J. Yessenia and Y. Lita, “Estudio comparativo de los Métodos Fenol- Ácido Sulfúrico y Antrona para determinar la pureza de dos almidones; usando muestras de almidon de maíz (*Zea mays*) y papa (*Solanum tuberosum*).”
- [21] W. J. Saucedo-Luna, A. J. Castro-Montoya, J. L. Rico, and J. Campos-García, “OPTIMIZATION OF ACID HYDROLYSIS OF BAGASSE FROM Agave tequilana Weber,” 2010. [Online]. Available: www.amidiq.com
- [22] Marlén Morales Zamora-Imilsis Espino Leal- LEyanis Mesa Garriga- Delvis Acosta Martine- Erenio Gonzalez Suarez- Eulogio Castro Galiano, “Evaluación de residuales de la hidrólisis ácida del bagazo como productos de alto valor añadido.”
- [23] ZAVALZA NAVARRETE LESLIE ELIZABETH, “EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SOBRE EL BAGAZO DE LA PIÑA DEAGAVE TEQUILANA WEBER VAR. AZUL PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES”.
- [24] D. Elizabeth, C. Úsuga, D. Carolina, and B. Montes, “Evaluación de métodos de extracción para la obtención de Evaluación de métodos de extracción para la obtención de azúcares a partir de la cascarilla de arroz Paddy azúcares a partir de la cascarilla de arroz Paddy Citación recomendada Citación recomendada,” 2022. [Online]. Available: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentoshttps://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/74

- [25] G. Alberto *et al.*, “TIEMPOS DE APILADO DEL BAGAZO DEL MAGUEY MEZCALERO Y SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES DEL COMPOST PARA SUSTRATO DE TOMATE.”
- [26] de Azúcar, “Caracterización físico química del bagazo de caña natural utilizado como biosorbente en la remoción de hidrocarburos en agua”, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223154251006>
- [27] Pastora de la C. Martínez-Nodal, Elena Rosa-Domínguez, Iván Rodríguez-Rico, and Jorge Leiva-Mas, “Caracterización físico química del bagazo de caña natural utilizado como biosorbente en la remoción de hidrocarburos en agua”, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223154251006>
- [28] Pastora de la Concepción Martínez Nodal, Iván Rodríguez Rico b, Guillermo Esperanza Pérez, and Jorge Leiva Mas, “Caracterización y evaluación del bagazo de caña de azúcar como biosorbente de hidrocarburos,” 2013.
- [29] Velasco Rodríguez Sandra, “Extracción de azúcares a partir de residuos de Agave tequilanapara la producción de ácido succínico por fermentación.” <https://www.riudg.udg.mx/visor/pdfjs/viewer.jsp?in=j&pdf=20.500.12104/83811/1/MCU CEI10314FT.pdf> (accessed May 09, 2022).
- [30] A. Gutiérrez Hernández and M. A. Trujillo-Roldán, “EVALUACIÓN DE PARAMETROS FISICOQUÍMICOS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE CEBADA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL.”
- [31] Puchin Hoyos Rafael and Ruiz Ines, “DESTILACION EXTRACTIVA CON DIFERENTES AGENTES DE SEPARACION PARA LA DESHIDRATACION DE ETANOL.”
- [32] L. Rivas, “Diseño y simulación del proceso de obtención de etanol a partir de bagazo de caña.”
- [33] P. Juan Manuel Ruvalcaba Barrios Director Gilberto Iñiguez Covarrubias Zapopan, “Uso de bagazo de agave como sustrato en el cultivo hidropónico de fresa (*Fragaria x ananassa*),” 2017.
- [34] Sanchez Mirando Mario Alberto, “ESTUDIO DE REDUCCIÓN DE BRIQUETAS COMPUESTAS DE MINERAL DE HIERRO Y BAGAZO DE AGAVE.”
- [35] I. Q. J. Luis and M. Rivas, “Diseño y simulación del proceso de obtención de etanol a partir de bagazo de caña.”