

## Evaluación del líquido iónico acetato de etanolamina en la producción de metano utilizando como sustrato hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana* var. *azul*

Raúl Snell-Castro <sup>1,\*</sup>, Jhovana Lizeth Lozano-López <sup>1</sup>, Hugo Oscar Méndez-Acosta <sup>1</sup>, José Antonio Pérez-Pimienta <sup>2</sup> y Alma Toledo-Cervantes <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Planta piloto, Departamento de Ingeniería Química, CUCEI-Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de biorrefinerías, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, México.

\* Autor de correspondencia: [raul.snell@academicos.udg.mx](mailto:raul.snell@academicos.udg.mx); Tel.: +52 33 13785900 ext. 27550.

### Desarrollo Sustentable (Bioprocesos)

Recibido: 13 de junio de 2025

Aceptado: 22 de agosto de 2025

Publicado: 17 de marzo de 2026

DOI: <https://doi.org/10.56845/terys.v5i1.537>

**Resumen:** En este estudio se evaluó el efecto del líquido iónico acetato de etanolamina [EAO][OAc] durante la digestión anaerobia usando como sustrato, hidrolizados enzimáticos de bagazo de *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) para la producción de metano utilizando valores óptimos obtenidos previamente usando como factores glucosa como sustrato modelo y el [EAO][OAc] con la metodología de la superficie de respuesta. Se realizaron pruebas de potencial bioquímico de metano (PBM) usando como sustratos hidrolizados enzimáticos, hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] y solo [EAO][OAc]. Los resultados indicaron que la máxima producción de metano fue obtenida a partir de los hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] ( $2611 \pm 107$  NmL), evidenciándose que tanto las azúcares glucosa y xilosa como el acetato aportado por el [EAO][OAc] fueron asimilados y favorecieron la metanogénesis. En cuanto al rendimiento en la producción de metano, se observaron bajos rendimientos en los tratamientos que contenían [EAO][OAc], lo que podría indicar un fenómeno de inhibición de la simbiosis acetótrofa obligada donde participan bacterias acetógenas y arqueas acetótroficas para la producción de metano. En este contexto, el tratamiento de los hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] y el tratamiento con solo [EAO][OAc] tuvieron una concentración final de acetato equivalente a 4.00 g/L y 5.75 g/L, respectivamente. Dado que esta simbiosis es inhibida por altas concentraciones de acetato, entonces la cantidad de acetato en estos tratamientos pudo colapsar esta vía de producción de metano, impactando negativamente ambos rendimientos.

**Palabras clave:** Producción de metano, líquido iónico, hidrolizados enzimáticos, bagazo de agave, digestión anaerobia

## Evaluation of the ionic liquid ethanolamine acetate on methane production using enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul* bagasse as substrate

**Abstract:** In this study, the effect of the ionic liquid ethanolamine acetate [EAO][OAc] during anaerobic digestion using enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) bagasse as substrate for methane production was evaluated using optimal values previously obtained according to the response surface methodology, applying as factors glucose as a model substrate and [EAO][OAc]. Biochemical methane potential (BMP) tests were performed using enzymatic hydrolysates, enzymatic hydrolysates with [EAO][OAc] and only [EAO][OAc] as substrates. The results indicated that the maximum methane production was obtained from the enzymatic hydrolysates with [EAO][OAc] ( $2611 \pm 107$  NmL), demonstrating that both glucose and xylose contained in the hydrolysates as well as the acetate provided by [EAO][OAc] were assimilated and favored methanogenesis. Regarding the methane production yield, low yields were observed in the treatments containing [EAO][OAc], which could indicate an inhibition phenomenon of obligately-syntrophic acetate transfer where acetogenic bacteria and acetotrophic archaea participate for methane production. In this context, the treatment of the enzymatic hydrolysates with [EAO][OAc] and the treatment with only [EAO][OAc] had a final acetate concentration equivalent to 4.00 g/L and 5.75 g/L, respectively. Since this syntrophy is inhibited by high concentrations of acetate, then the amount of acetate in these treatments could collapse this methane production pathway, impacting negatively both methane yields.

**Keywords:** Methane production, ionic liquid, enzymatic hydrolysates, agave bagasse, anaerobic digestion

### Introducción

La industria tequilera ha contribuido al desarrollo económico, agrícola e industrial en México, no obstante, durante la producción del tequila se genera un residuo sólido conocido como bagazo de agave. En este contexto, el Consejo Regulador de Tequila reporta en 2024 un consumo de 1.891 millones de toneladas de piña de *Agave Tequilana* var. *azul* para la producción de 495 millones de litros de tequila 40% v/v de alcohol (CRT, 2025). Si se considera que el 40% del peso seco de la piña se convierte en bagazo de agave (Cedeño-Cruz, 2003), entonces se puede inferir que se produjeron aproximadamente 756 miles de toneladas de bagazo de *Agave Tequilana* var. *azul* (BATA). Debido al gran

volumen de BATA generado y a la falta de tratamientos biológicos efectivos para su valorización, el bagazo es incorporado inadecuadamente a campos agrícolas, desechado en vertederos ilegales o quemado, lo cual representa un problema ambiental.

El BATA tiene un alto potencial para ser revalorizado en diferentes procesos como es el caso de la producción de metano mediante digestión anaerobia. Sin embargo, por la alta recalcitrancia del bagazo de agave es necesario realizar un pretratamiento con el objetivo de permitir el acceso a las enzimas durante la hidrólisis enzimática y mejorar los rendimientos en la concentración de azúcares obtenidos (sacarificación). Actualmente, el uso de líquidos iónicos (LI) ha generado interés por su capacidad de desestabilizar la matriz lignocelulósica sin la degradación de la celulosa lográndose obtener altos rendimientos en la sacarificación. Sin embargo, una de sus desventajas es su toxicidad para bioprocesos posteriores como la digestión anaerobia, razón por la cual es necesario realizar un lavado de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento para disminuir la concentración de LI residual, aunque este lavado permite la recuperación del LI, también ocasiona que se consuman grandes cantidades de agua en el proceso. Otra de sus desventajas es su elevado costo, por lo que el uso de líquidos iónicos prácticos es una alternativa dado que son menos costosos y más sencillos de producir, como es el caso del acetato de etanolamina [EOA][OAc], el cual ha demostrado ser efectivo para pretratar diversas materias primas lignocelulósicas. En este contexto, el efecto del remanente de [EOA][OAc] proveniente del pretratamiento del BATA sobre el proceso de la digestión anaerobia no ha sido estudiado a detalle (Pérez-Pimienta *et al.*, 2020; Pérez-Pimienta *et al.*, 2021; Pérez-Pimienta *et al.*, 2024). Por lo que, el propósito de este estudio fue evaluar el efecto del líquido iónico [EOA][OAc] sobre la producción de metano en la digestión anaerobia. El desarrollo del conocimiento en esta área permitiría reducir la cantidad de agua necesaria en los lavados después del pretratamiento del BATA.

## Materiales y Métodos

### *Pretratamiento del BATA*

Se realizó una mezcla del BATA con el líquido iónico [EOA][OAc] para obtener una solución con una carga de sólidos al 20%. En seguida, las muestras se calentaron en un horno a 160 °C por 90 minutos siguiendo el protocolo de Pérez-Pimienta *et al.*, (2021). Posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada para eliminar el [EOA][OAc] residual, utilizando una relación de 40 mL de agua destilada por 1 g de BATA pretratado. Finalmente, el bagazo se secó en un horno de convección a 45 °C durante dos días.

### *Sacarificación enzimática*

La hidrólisis enzimática del bagazo pretratado con [EOA][OAc] se realizó utilizando una carga de sólidos del 11.5 % en una solución amortiguadora de citrato 50 mM (pH 4.26). La sacarificación se logró empleando una mezcla de enzimas comerciales formada por Celluclast 1.5 L (1.86 mg proteína/mL buffer) y Viscozyme L (0.76 mg proteína/mL buffer). Las condiciones de reacción fueron de 40 °C durante 72 h en una incubadora rotatoria (Pérez-Pimienta *et al.*, 2024).

### *Pruebas de potencial bioquímico de metano*

Las pruebas de potencial bioquímico de metano (PBM) para evaluar el efecto del [EOA][OAc] sobre la producción de metano usando como sustrato los hidrolizados enzimáticos del BATA se llevaron a cabo en un sistema automático para pruebas de PBM (AMPTS II, Bioprocess Control AB, Suecia). Estas pruebas se realizaron en reactores CSTR en lote por cuadruplicado, que fueron agitados mecánicamente a una velocidad de 120 rpm y mantenidos a una temperatura de 37 °C. El volumen de trabajo de las pruebas PBM fue de 360 mL, que incluyó la adición de 3 g-NaHCO<sub>3</sub>/L para iniciar a un pH entre 7.3 y 7.5. Además del sustrato, dichas pruebas se realizaron con la adición de un medio mineral cuya composición fue la siguiente (g/L): 1 NH<sub>4</sub>Cl, 0.05 CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.1 MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.1 NaCl y 0.4 KH<sub>2</sub>PO · H<sub>2</sub>O (Angelidaki y Sanders, 2004).

En las pruebas de PBM se utilizó como inóculo lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio con flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) de la empresa tequilera Casa Herradura (Amatitán-Jalisco, México), que trata vinazas tequileras. Este lodo tuvo 0.1268 g sólidos totales/g sólido húmedo (gST/gSH) y 0.1125 g sólidos volátiles/g sólido húmedo (gSV/gSH), este inóculo se aplicó en las pruebas de PBM a una concentración de 10 g SV/L. Cabe

mencionar, que previamente a las pruebas de PBM se realizaron dos activaciones al inóculo usando 5 g/L de glucosa como sustrato.

Durante las corridas de PBM se registraron automáticamente en tiempo real los datos correspondientes a la temperatura, presión y volumen de biogás acumulado en NmL (mL normalizado), generando un informe con valores normalizados de caudal y gas acumulado. Adicionalmente, se cuantificaron los monosacáridos, azúcares totales (AT), AGVs iniciales y finales mediante HPLC; además, se realizó la medición de la DQO inicial y final. Las pruebas de PBM incluyeron un control endógeno (datos no mostrados).

### Métodos analíticos

El análisis composicional de carbohidratos y lignina del BATA antes y después del pretratamiento, se determinó utilizando el método de NREL/TP-510-42618 del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL). El procedimiento consistió en una hidrólisis ácida tomando 300 mg de biomasa seca y añadiendo 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 %, después se incubó la mezcla por 1.5 h a 30 °C con agitación cada 10 minutos usando una varilla de vidrio. Posteriormente, se diluyó la concentración del ácido hasta el 4 % añadiendo 84 mL de agua destilada para llevar a cabo otra hidrólisis en una autoclave a 121 °C durante 1 h. Finalmente, el hidrolizado ácido se filtró al vacío en crisoles con fondo poroso para ser secados por 12 h a 105 °C, la cantidad de lignina insoluble se determinó por gravimetría con los sólidos que quedaron después del secado. La concentración de glucosa y xilosa del hidrolizado ácido se midió por HPLC en un cromatógrafo Agilent Technologies Waters e2695 equipado con una columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad.

La caracterización de los hidrolizados enzimáticos implicó la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO), que se realizó siguiendo el método estandarizado de APHA 5220, usando el kit TNT 822 plus HACH, un digestor DRB200 y un espectrofotómetro DR2800. Por otra parte, se llevó a cabo la cuantificación de azúcares totales como monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados empleando el método colorimétrico de DuBois *et al.*, (1956). Adicionalmente, los monosacáridos como las hexosas (glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), lactato y ácidos grasos volátiles (acetato, formiato, propionato, butirato, valerato e isovalerato) se cuantificaron por HPLC en un cromatógrafo Agilent Technologies Waters e2695 equipado con una columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad.

### Resultados y Discusión

El análisis de los principales componentes del BATA sometido al pretratamiento con [EAO][OAc] y el BATA sin pretratamiento indicó incrementos en los porcentajes de glucano y xilano cuando se aplicó el pretratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis composicional de BATA sin pretratar y pretratado

Sustrato	Recuperación de sólidos (%)	Glucano (%)	Xilano (%)	Lignina (%)
BATA sin pretratar	100	33.20	18.30	18.76
BATA pretratado con [EAO][OAc]	63.76	47.60	23.73	13.34

El BATA sometido al pretratamiento con [EAO][OAc] fue usado para realizar la hidrólisis enzimática, al finalizar este procedimiento los hidrolizados enzimáticos de BATA fueron caracterizados en términos de la DQO, azúcares totales, carbohidratos, lactato y ácidos grasos volátiles (Tabla 2). Los resultados mostraron una alta concentración de DQO, que fue un reflejo del rendimiento en azúcares totales obtenidos durante la hidrólisis enzimática. Estos hidrolizados tuvieron altas concentraciones de la aldohexosa glucosa y la aldopentosa xilosa; mientras que la aldopentosa arabinosa tuvo una menor concentración. Por otra parte, las concentraciones de propionato y butirato fueron menores a los valores inhibitorios de la digestión anaerobia 0.9 g/L y 1.8, respectivamente (Wang *et al.*, 2009).

Antes de usar como sustrato los hidrolizados enzimáticos de BATA pretratado con [EAO][OAc], se realizó un estudio utilizando la metodología del ensayo de la superficie de respuesta bajo las mismas condiciones indicadas para las pruebas de PBM. Durante este estudio previo, que no se reporta en este trabajo, se calcularon los puntos óptimos para la producción de metano usando glucosa como sustrato modelo y [EAO][OAc], aplicando valores de 3 a 7 g/L y 1.5 a 3

%, respectivamente. Los resultados de este estudio previo indicaron que los puntos óptimos para la producción de metano fueron 3.839 g/L de glucosa y 2.234 % p/v [EAO][OAc] para producir 2975 NmL de metano.

Tabla 2. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de BATA pretratado con [EAO][OAc]

Compuesto	Concentración (g/L)
DQO	146.56 ± 2.83
Azúcares totales	125.06 ± 2.93
<i>Carbohidratos</i>	
Glucosa	43.13 ± 1.28
Xilosa	14.70 ± 0.46
Arabinosa	3.21 ± 1.07
<i>Lactato y ácidos grasos volátiles</i>	
Lactato	0.420
Fórmico	0.104
Acetato	0.243
Propionato	0.112
Isobutirato	0.084
Butirato	0.072

A partir de los resultados sobre los puntos óptimos para la producción de metano se realizaron las pruebas de PBM usando como los hidrolizados enzimáticos de BATA y en combinación con el líquido iónico [EAO][OAc], manteniendo una relación constante de 3.839 azúcares totales g/L entre las pruebas. Adicionalmente, se incluyó una prueba usando como sustrato solo el [EAO][OAc] para conocer su participación en la producción de metano debido al acetato, que directamente sería convertido en metano por la vía acetótrofa (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la producción de metano (NmL) usando valores óptimos para la glucosa y el [EAO][OAc]

Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Promedio
Hidrolizados enzimáticos	399	399	441	407	412 ± 20
Hidrolizados enzimáticos + [EOA][OAc]	2694	2530	2713	2508	2611 ± 107
[EOA][OAc]	1907	2063	1878	1831	1920 ± 100

Los resultados sobre la producción de metano aplicando los puntos óptimos se calcularon restando los valores obtenidos del control endógeno (15.4 NmL de metano) con el propósito de eliminar el aporte del inóculo a los valores obtenidos en cada prueba de PBM. El tratamiento de los hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] tuvo la mayor producción de metano, el volumen acumulado de metano durante esta prueba de PBM alcanzó un valor cercano al 90 % de la producción máxima teórica esperada de acuerdo al resultado que se obtuvo con la metodología de superficie de respuesta para encontrar los puntos óptimos (2975 NmL de metano). Pérez-Pimienta *et al.*, (2024) logró una producción de 2556 ± 443 NmL de metano bajo las condiciones de 5 g/L de azúcares totales y 2.5 % p/v [EAO][OAc]. Dado que el tratamiento con únicamente hidrolizados enzimáticos tan solo produjo el 14 % de la producción máxima teórica, entonces el acetato del líquido iónico está aportando la mayor parte del carbono para la metanogénesis. En cuanto a la prueba de PBM con solo [EAO][OAc], ésta alcanzó el 34.5 % de la producción máxima teórica. En este contexto, la sumatoria la producción de metano de los tratamientos con los hidrolizados enzimáticos y el [EAO][OAc] equivale a 2332 NmL, la diferencia entre está sumatoria y el tratamiento de los hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] entra en el rango de las desviaciones estándar.

Durante las pruebas de PBM la DQO removida indicó un bajo consumo de la materia orgánica en el tratamiento con hidrolizados enzimáticos, aunque tuvo el mayor rendimiento. En relación con la prueba de PBM de hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] se obtuvo la mayor velocidad volumétrica de producción de metano; mientras que el tratamiento con solo [EAO][OAc] tuvo los menores valores en velocidad y rendimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros sobre la producción de metano usando los valores óptimos para la glucosa y el [EAO][OAc]

Condición	DQO inicial (g/L)	DQO final (g/L)	DQO removida (%)	VVPM <sup>1</sup> (L-CH <sub>4</sub> /L d)	Rendimiento (L-CH <sub>4</sub> /g-DQO <sub>removida</sub> )
Hidrolizados enzimáticos	6.776	2.894	57	0.229	0.295
Hidrolizados enzimáticos + [EAO][OAc]	34.488	8.354	76	0.315	0.278
[EOA][OAc]	30.894	10.362	66	0.157	0.260

<sup>1</sup> VVPM = Velocidad volumétrica de producción de metano.

Los bajos rendimientos en los tratamientos que contenían [EAO][OAc] podrían indicar un fenómeno de inhibición de la sintrofia acetótrofa obligada donde participan bacterias acetógenas y arqueas acetótrofas para la producción de metano (Snell-Castro *et al.*, 2019). En este contexto, el tratamiento de los hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] y el tratamiento con solo [EAO][OAc] tuvieron una concentración final de acetato equivalente a 4.00 g/L y 5.75 g/L, respectivamente. Dado que está sintrofia es inhibida por altas concentraciones de acetato, entonces la cantidad de acetato en estos tratamientos pudo colapsar esta vía de producción de metano impactando negativamente en los rendimientos (Wang *et al.*, 2009).

Por otra parte, los resultados sobre las concentraciones iniciales y finales de azúcares totales, glucosa y xilosa indicaron que el consumo de azúcares totales alcanzó más del 95 % en todos los tratamientos que contenían hidrolizados enzimáticos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de azúcares totales, glucosa y xilosa en los tratamientos que contenían hidrolizados enzimáticos

Tratamiento	Azúcares totales (g/L)		Glucosa (g/L)		Xilosa (g/L)	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
Hidrolizados enzimáticos	3.737 ± 0.09	0.105 ± 0.008	1.749	ND	0.813	ND
Hidrolizados enzimáticos + [EOA][OAc]	3.535 ± 0.06	0.055 ± 0.002	1.717	ND	0.787	ND

Al parecer, la ausencia de altas concentraciones de acetato y el alto consumo de glucosa y xilosa en el tratamiento con los hidrolizados enzimáticos favoreció el desempeño de la comunidad microbiana, que condujo a lograr el mayor rendimiento en la producción de metano.

## Conclusiones

En este estudio se evaluó el efecto del líquido iónico [EAO][OAc] sobre la producción de metano usando como sustrato hidrolizados enzimáticos de BATA utilizando los valores óptimos obtenidos previamente usando como factores glucosa como sustrato modelo y el [EAO][OAc]. En cuanto a la producción de metano, se evidenció que tanto los azúcares glucosa y xilosa como el acetato aportado por el [EAO][OAc] fueron asimilados y favorecieron la metanogénesis. A pesar de este efecto positivo en la producción de metano, se observó un efecto inhibitorio sobre la metanogénesis acetótrofa en los tratamientos que contenían [EAO][OAc], esto fue más evidente en el tratamiento que solo contenía [EAO][OAc].

**Agradecimientos y financiamiento:** Este estudio fue financiado por el Fondo Sectorial SENER-CONACyT Sustentabilidad Energética, Clúster Biocombustibles Gaseosos (Proyecto 247006). Jhovana Lizeth Lozano-López agradece al CONACyT (ahora SECIHTI) por la beca de maestría otorgada.

## Bibliografía

- Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3, 117–129.
- Cedeño-Cruz, M. (2003). Tequila production from agave: Historical influences and contemporary processes. En *The Alcohol Textbook* (p. 223).

- Consejo Regulador del Tequila. (2024). *Informe de actividades 2024. Información estadística*. Recuperado el 10 de junio de 2025 de <https://www.crt.org.mx>
- Pérez-Pimienta, J. A., Icaza-Herrera, J. P., Méndez-Acosta, H. O., González-Álvarez, V., Mendoza-Pérez, J. A., & Arreola-Vargas, J. (2020). Bioderived ionic liquid-based pretreatment enhances methane production from *Agave tequilana* bagasse. *RSC Advances*, *10*(24), 14025–14032. <https://doi.org/10.1039/D0RA01849J>
- Pérez-Pimienta, J. A., García-López, R. M., Méndez-Acosta, H. O., González-Álvarez, V., Simmons, B. A., Mendoza-Pérez, J. A., & Arreola-Vargas, J. (2021). Ionic liquid–water mixtures enhance pretreatment and anaerobic digestion of agave bagasse. *Industrial Crops and Products*, *171*, 113924. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113924>
- Pérez-Pimienta, J. A., Castillo-Preciado, D. J., González-Álvarez, V., & Méndez-Acosta, H. O. (2024). Optimization of cost-effective enzymatic saccharification using low-cost protic ionic liquid as pretreatment agent in agave bagasse. *Waste Management*, *175*, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.01.001>
- Snell-Castro, R., Méndez-Acosta, H. O., Arreola-Vargas, J., González-Álvarez, V., Pintado-González, M., González-Morales, M. T., & Godon, J. J. (2019). Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul* bagasse. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(5), 1618–1630. <https://doi.org/10.1111/jam.14234>
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Meng, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, *33*(5), 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.01.007>