

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Integración de un proceso modelo de biorrefinería para la
obtención de hidrógeno, metano, enzimas y sacarificados a
partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. CARLOS ESCAMILLA ALVARADO

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA

Directores de la Tesis:

Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo
Dra. Ma. Teresa Ponce-Noyola

México, D.F.

AGOSTO 2014

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Josefina Barrera Cortés	Asesor
Dr. Fernando Esparza García	Asesor
Dr. Jaime García Mena	Asesor
Dr. Héctor M. Poggi Varaldo	Director
Dra. M. Teresa Ponce Noyola	Director
M. en C. Noemí Rinderknecht Seijas	Asesor Extraordinario
Mtra. Elvira Ríos Leal	Asesor Extraordinario
Dra. Ileri V. Robles González	Asesor

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en los laboratorios 33, 34 (Biotecnología Ambiental y Energías Renovables), 17 (Genética Microbiana) y Central Analítica, bajo la dirección del Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo y de la Dra. Ma. Teresa Ponce-Noyola, del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Carlos Escamilla Alvarado agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (no. de registro 209665) y por el apoyo para la investigación de enzimas celulolíticas (no. 104333), al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYTDF) por el apoyo económico para la investigación de biorrefinerías (proyecto PICCO 10-27) y al CINVESTAV por los apoyos económicos para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy profundamente a los estudiantes de servicio social y prácticas profesionales que realizaron labores técnicas y analíticas del proyecto de biorrefinería bajo mi supervisión. Debido a su trabajo este proyecto logró el alcance que tiene. En orden cronológico, ellos son IB Natali Romero Soriano, IQI Jesús Vázquez Barragán, IB Óscar Martínez Zamarripa, IBQ Elthon Nava Rosado, IQI Norma Rivas Romero, IA Laura A. González Albarrán, IQI Abraham Flores Rodríguez, IQI Samuel García Soberanes. Gracias por su esfuerzo, dedicación y empeño por aprender.

Por su participación en diferentes actividades relacionadas con este proyecto, agradezco:

- a la M. en C. Odilia Pérez Ávalos por su invaluable auxilio en numerosas técnicas analíticas.
- a los Ing. Cirino Rojas, Ing. Miguel Márquez Robles, Biól. Lourdes Rojas, M. en C. Víctor Hugo Rosales G., por los apoyos técnicos especializados en las áreas de cromatografía, caracterización de sólidos, microscopía electrónica y citometría.
- al M. en C. Rafael Hernández Vera por las gestiones administrativas y apoyo en laboratorio.
- a Verónica Soto y David Portilla por sus servicios técnicos.
- a las Sritas. Blanca Reyna Arizona y Gina Hernández por sus servicios secretariales.
- y en general a los trabajadores y vigilantes del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería que realizan con responsabilidad y buena voluntad sus actividades laborales.

De manera muy personal, agradezco

a mis Directores de tesis por sus enseñanzas de carácter personal y profesional,

a mis amigos por darle los matices a la vida diaria,

a mi pareja por darle la justa dimensión a esta palabra.

Este trabajo está dedicado a mis padres y hermanos, que con su ejemplo y consejos han dado dirección a mis pasos, tal vez mucho más de lo que se imaginan.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	xvii
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	20
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	21
1.1. Procesos hidrogenogénicos-metanogénicos.....	24
1.1.1. Bioquímica y microbiología de la producción de H ₂	29
1.1.2. Bioquímica y microbiología de la producción de CH ₄	31
1.1.3. Identificación de microorganismos en ecosistemas complejos.....	33
1.1.4. Biomasa para la producción de biocombustibles.....	36
1.2. Producción enzimática a partir de residuos orgánicos.....	37
1.2.1. Mecanismo de acción de las celulasas.....	37
1.2.2. Mecanismo de acción de las xilanasas.....	38
1.2.3. Microorganismos productores de celulasas y xilanasas.....	38
1.2.3.1. <i>Trichoderma reesei</i>	39
1.2.3.2. Mutación de microorganismos.....	41
1.2.4. Fuentes de carbono.....	42
1.3. Sacarificación de la biomasa.....	45
1.3.1. Pretratamientos para la sacarificación de la biomasa.....	46
1.3.2. Procesos de sacarificación de residuos orgánicos.....	48
1.4. Evaluación de sistemas: recursos-energía-productos-desechos (ES-Reprode).....	49
1.4.1. Evaluación de ciclo de vida (LCA).....	49
1.4.2. La LCA en procesos de producción de energéticos.....	53
2. JUSTIFICACIÓN.....	56
3. HIPÓTESIS.....	57
4. OBJETIVOS.....	58
5. ALCANCE.....	59
6. METODOLOGÍA.....	60
6.1. Plan de trabajo.....	60
6.2. Actividad 1a. Producción de hidrógeno en sustrato sólido en régimen semi-continuo.....	62
6.2.1. Propósito.....	62
6.2.2. Diseño experimental.....	62
6.2.4. Métodos y procedimientos.....	65
6.2.4.1. Preparación de la FORSU.....	65
6.2.4.2. Inoculación y arranque.....	66
6.2.4.3. Operación hidrogenogénica (DASS-A).....	66
6.2.4.4. Análisis cromatográfico.....	67
6.2.4.5. Análisis de sólidos.....	67
6.2.4.6. Análisis de celulosa, lignina, hemicelulosa y nitrógeno Kjeldahl total.....	68

6.2.4.7. Análisis de biología molecular	68
6.2.4.7.1. Extracción de DNA.....	69
6.2.4.7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos	70
6.2.4.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	70
6.2.4.7.4. Electroforesis de gel por gradiente de temperatura.....	71
6.3. Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno	73
6.3.1. Propósito	73
6.3.2. Diseño experimental.....	73
6.3.3. Programa de seguimiento y análisis.....	73
6.3.4. Métodos y procedimientos.....	74
6.3.4.1. Montaje y manejo de unidades FASSH-VI	74
6.3.4.2. Montaje de unidades FASSH-VI del experimento complementarios..	76
6.4. Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados	78
6.4.1. Propósito	78
6.4.2. Diseño experimental.....	78
6.4.3. Programa de seguimiento y análisis.....	79
6.4.4. Métodos y procedimientos.....	81
6.4.4.1. Inoculación y arranque.....	81
6.4.4.2. Operación metanogénica (DASS-M)	81
6.4.4.3. Producción de metano en DASS-M a partir de FORSU (control)	81
6.4.4.4. Potencial y flujo energético del sistema H-M.....	81
6.4.4.5. Observación de la interacción microorganismos-sustrato por medio de microscopia de barrido electrónico (SEM).....	84
6.5. Actividad 3. Producción enzimática con <i>T. reesei</i> MCG 80	86
6.5.1. Propósito	86
6.5.2. Diseño experimental.....	86
6.5.3. Programa de seguimiento y análisis.....	88
6.5.4. Métodos y procedimientos.....	88
6.5.4.1. Sustratos.....	88
6.5.4.2. Reactivación y propagación la cepa <i>T. reesei</i> MCG 80.....	89
6.5.4.3. Producción enzimática con <i>T. reesei</i> MCG 80.....	90
6.5.4.4. Análisis.....	92
6.5.4.5. Recuperación y concentración del extracto enzimático.....	94
6.6. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de <i>T. reesei</i> MCG 80	95
6.6.1. Propósito	95
6.6.2. Diseño experimental.....	95
6.6.3. Programa de seguimiento y análisis.....	96
6.6.4. Métodos y procedimientos.....	97
6.6.4.1. Sacarificación.....	97
6.6.4.2. Análisis.....	97
6.7. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos	98
6.7.1. Propósito	98
6.7.2. Diseño experimental.....	98

6.7.3. Definición de objetivo y alcance	98
6.7.3.1. Objetivo	98
6.7.3.2. Unidad funcional	99
6.7.3.3 Límites del sistema	99
6.7.3.3.1. Recursos.....	99
6.7.3.3.2. Energía	99
6.7.3.3.3. Productos.....	100
6.7.3.3.4. Desecho.....	100
6.7.4. Análisis de inventarios de ciclo de vida	100
6.7.5. Evaluación de impactos de ciclo de vida.....	102
6.7.5.1. Escenario de comparación	103
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
7.1. Actividad 1a. Producción de hidrógeno en sustrato sólido en régimen semi-continuo.....	105
7.1.2. Operación de la Etapa H	106
7.1.3. Biología molecular	115
7.2 Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno	122
7.2.1. Experimentos complementarios	130
7.3 Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados	134
7.3.1 Arranque de digestores	134
7.3.2 Operación de Etapa M con sólidos fermentados de la Etapa H como sustrato.....	135
7.3.3 Operación de digestores control.....	142
7.3.4. Potencial energético del sistema H-M.....	145
7.3.5. Observación de la interacción microorganismos-sustrato por medio de microscopia de barrido electrónico (SEM).....	147
7.4. Actividad 3. Producción enzimática con <i>T. reesei</i> MCG 80	149
7.4.1. Fermentación en sustrato sólido contra fermentación en cultivo sumergido.	149
7.4.2. Fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones de FORSU y con sustratos celulósicos refinados (controles).....	154
7.4.3. Producción enzimática usando sólidos de las etapas H y M.....	157
7.4.4. Producción enzimática en fermentadores Sixfors®.	162
7.5. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de <i>T. reesei</i> MCG 80	165
7.5.1 Sacarificación de sustratos celulósicos	165
7.5.2. Sacarificación utilizando diferentes relaciones enzima:sustrato	168
7.5.3. Ensayos de actividad enzimática residual.....	172
7.6. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos (ES-Reprode).....	175
7.6.1. Balance de masa.....	183
7.6.2. Balance de energía	184
7.6.3. Evaluación ambiental	186
8. CONCLUSIÓN	192

8.1. Actividad 1a. Producción de hidrógeno por fermentación en sustrato sólido en régimen semi-continuo.....	192
8.2. Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno	192
8.3. Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados	193
8.4. Actividad 3. Producción enzimática con <i>T. reesei</i> MCG 80	193
8.6. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de <i>T. reesei</i> MCG 80	194
8.7. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos	194
9. PERSPECTIVAS.....	196
10. REFERENCIAS	197
11. ANEXOS.....	208
11.1. Tablas y figuras.....	208
11.1.1. Actividad 1a. Producción de hidrógeno en sustrato sólido en régimen semi-continuo	208
11.1.2. Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno	208
11.1.2.1. Experimentos complementarios	209
11.1.3. Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados.....	213
11.1.4. Actividad 3. Producción enzimática con <i>T. reesei</i> MCG 80.....	214
11.1.5. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de <i>T. reesei</i> MCG 80	216
11.1.6. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos.....	217
11.1.6.1. Exergía.....	217
11.1.6.2. Tablas	218
11.2. Premios	219
11.3. Publicaciones emanadas de la Tesis.....	220
11.3.1. Artículos en revistas internacionales con arbitraje estricto indexadas en SCI-JCR Thomson Reuters.....	220
11.3.2. Capítulos en libros	225
11.3.3. Publicaciones en Congresos Internacionales.....	225

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operación y rendimientos de procesos de fermentación oscura hidrogenogénica-metanogénica	27
Tabla 2. Clasificación taxonómica de arqueas metanogénicas (adaptado de Demirel & Scherer, 2008).....	33
Tabla 3. Microorganismos presentes en consorcios anaerobios.....	34
Tabla 4. Diversidad de microorganismos celulolíticos (adaptada de Lynd et al., 2006)	39
Tabla 5. Actividades xilanolíticas y celulolíticas de hongos y bacterias en residuos lignocelulósicos.....	43
Tabla 6. Métodos de pretratamientos para sacarificación	46
Tabla 7. Procesos de sacarificación de residuos orgánicos.....	48
Tabla 8. Descripción de indicadores de impacto	52
Tabla 9. Evaluaciones de sistemas aplicadas a bioenergéticos y bioproductos	55
Tabla 10. Diseño experimental de la Etapa H	62
Tabla 11. Análisis y seguimiento experimental de DASS-A	64
Tabla 12. Variables de respuesta para evaluar desempeño de la Etapa H	64
Tabla 13. Iniciadores para PCR de eubacterias	71
Tabla 14. Composición de las PCR para eubacterias	71
Tabla 15. Programa de PCR para eubacterias.....	71
Tabla 16. Condiciones para TGGE.....	72
Tabla 17. Diseño experimental 2 ³ para experimentos de adición de fuente de nitrógeno.....	73
Tabla 18. Análisis y seguimiento experimental de FASSH-VI.....	74
Tabla 19. Variables de respuesta para evaluar el desempeño de los FASSH-VI	74
Tabla 20. Constitución de reactores FASSH-VI	75
Tabla 21. Características de los ensayos FASSH-VI a tiempo inicial	75
Tabla 22. Constitución de componentes del FASSH- VI.....	76
Tabla 23. Condiciones de operación para ensayos FASSH-VI complementarios.....	76
Tabla 24. Características de los ensayos FASSH-VI complementarios a tiempo inicial	77
Tabla 25. Diseño experimental de la Etapa M.....	78
Tabla 26. Análisis y seguimiento experimental de digestores mesofílicos	80
Tabla 27. Variables de respuesta para evaluar el desempeño de la Etapa M	80
Tabla 28. Condiciones de operación para los experimentos (i).....	86
Tabla 29. Condiciones de ensayos de producción enzimática.....	87
Tabla 30. Análisis y seguimiento de la producción enzimática.....	88
Tabla 31. Características fisicoquímicas de los sustratos	89
Tabla 32. Composición del medio mineral para el crecimiento de <i>T. reesei</i> en medio líquido y en sustrato sólido	90
Tabla 33. Caracterización típica del inóculo madre.....	91
Tabla 34. Condiciones de ensayo para las determinaciones enzimáticas	93
Tabla 35. Diseño experimental de la sub-actividad de sacarificación de diferentes sustratos (SS-1).....	95

Tabla 36. Análisis y seguimiento de pretratamiento y sacarificación	96
Tabla 37. Variables de respuesta para evaluar el desempeño de la Etapa S.....	96
Tabla 38. Condiciones experimentales y resultados seleccionados de la biorrefinería H-M-Z-S	101
Tabla 39. Descripción de entradas y salidas del balance de masa.....	101
Tabla 40. Descripción de consumos y producción de energía.....	102
Tabla 41. Caracterización del sustrato	105
Tabla 42. Caracterización de los biorreactores de arranque.....	106
Tabla 43. Resultados promedio de la operación hidrogenogénica mesofílica y termofílica	110
Tabla 44. Caracterización de los sólidos fermentados de la Etapa H	115
Tabla 45. Resultados de FASSH-VI	124
Tabla 46. Resultados de hidrogenogénesis en lote en otros trabajos del grupo.....	124
Tabla 47. Resultados de FASSH-VI complementario.....	130
Tabla 48. Perfil de metabolitos orgánicos.....	133
Tabla 49. Caracterización de arranque de biorreactores metanogénicos	134
Tabla 50. Resultados promedio de la Etapa M.....	136
Tabla 51. Selección de variables de respuesta de la Etapa M para evaluar el diseño experimental 2 ²	138
Tabla 52. Resultados promedio de la operación metanogénica control.....	143
Tabla 53. Parámetros de operación y principales resultados de las etapas H, M y FASSH-VI	145
Tabla 54. Desempeños energéticos	146
Tabla 55. Condiciones de operación y resultados para los experimentos de fermentación en sustrato sólido y fermentación en cultivo sumergido	150
Tabla 56. Condiciones de operación y resultados para los experimentos fermentaciones en cultivo sumergido a pHinicial 4.8 y 250 rpm.....	154
Tabla 57. Condiciones de operación y resultados para experimentos de producción enzimática usando sólidos de las etapas H-M	158
Tabla 58. Condiciones de operación y resultados para experimentos de producción enzimática en fermentadores Sixfors, usando como sustrato SF 1.5 %SV	163
Tabla 59. Resultados de sacarificación a 60 FPU/g SV de sustrato a las 86 h.....	165
Tabla 60. Características enzimáticas de Celluclast y del Extracto Tr	168
Tabla 61. Resultados de sacarificación para ensayos de relación enzima:sustrato	169
Tabla 62. Resultados de sacarificación confirmatoria para ensayos de relación enzima:sustrato	171
Tabla 63. Características composicionales de sólidos utilizados/generados	172
Tabla 64. Recuperación de actividad enzimática	173
Tabla 65. Tecnologías incluidas en la evaluación de sistemas y sus principales flujos	180
Tabla 66. Balance de masa del modelo de biorrefinería	183
Tabla 67. Balance de energía del modelo de biorrefinería	184
Tabla 68. Impactos totales de la biorrefinería.....	188
Tabla A1. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre la productividad de hidrógeno	208

Tabla A2. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura, nitrógeno adicionado y sales de fosfato adicionadas sobre la producción acumulada de hidrógeno	208
Tabla A3. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura, nitrógeno adicionado y sales de fosfato adicionadas sobre la productividad inicial de hidrógeno	209
Tabla A4. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de nitrógeno sobre la producción acumulada de hidrógeno.....	209
Tabla A5. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de nitrógeno sobre la productividad inicial de hidrógeno.....	210
Tabla A6. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de sales sobre la producción acumulada de hidrógeno.....	210
Tabla A7. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de sales sobre la productividad inicial de hidrógeno.....	210
Tabla A8. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre la producción de biogás.....	213
Tabla A9. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre la productividad de metano	213
Tabla A10. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre el rendimiento de metano por sustrato alimentado	213
Tabla A11. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre el rendimiento de metano por sustrato removido	214
Tabla A13. Análisis de varianza de los efectos del tipo de sustrato y tipo de enzima sobre la producción de sacarificados	216
Tabla A14. Análisis de varianza del efecto de la relación enzima sustrato sobre la producción de glucosa.....	216
Tabla A15. Análisis de varianza del efecto de la relación enzima sustrato sobre el rendimiento de sacarificación	216
Tabla A16. Análisis de varianza del efecto de la relación enzima sustrato sobre la actividad enzimática residual después de 72 h de sacarificación de SF.....	217
Tabla A17. Factores de normalización para impactos ambientales seleccionados, de acuerdo con el método CML 2001.....	218

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de potenciales bioproductos a partir de biomasa. Basado en Zeikus <i>et al.</i> (1980,1999), Zhenying <i>et al.</i> (2009), Bozel <i>et al.</i> (2010).	23
Fig. 2. Ruta metanogénica a) a partir de acetato, b) a partir de CO ₂ y H ₂ . Adaptado de Madigan <i>et al.</i> (2009). ATP, adenosín trifosfato; CoA, coenzima A; CODH, monóxido deshidrogenasa; Corr, proteína corrinoide; CoB, coenzima B; CoM, coenzima M; MF, metanofurano; MP, tetrahidrometanopterinina	26
Fig. 3. Esquema simplificado de producción de hidrógeno. Adaptado de Madigan <i>et al.</i> (2009)	31
Fig. 4. Metabolismo energético en arqueas. Adaptado de Thauer <i>et al.</i> (1998).	32
Fig. 5. Estrategias para la identificación o seguimientos de comunidades microbianas	35
Fig. 6. Esquema de un LCA (ISO, 2006).	50
Fig. 7. Esquema del plan de trabajo	61
Fig. 8. Esquema y fotografía de un digestor anaerobio en sustrato sólido.....	63
Fig. 9. Diagrama de arranque para un digestor anaerobio en sustrato sólido acidogénico	67
Fig. 10. Procedimiento de pretratamiento y extracción de DNA genómico	69
Fig. 11. Procedimiento de limpieza de muestras de DNA genómico.....	70
Fig. 12. Diseño de operación de los digestores H-M y de sus controles.....	79
Fig. 13. Diagrama de flujo del proceso de alimentación del proceso H-M y control...	83
Fig. 14. Efecto del (a) TRM y de la (b) temperatura sobre la productividad de hidrógeno.....	107
Fig. 15. Dinámicas de producción de biogás, productividad de hidrógeno y pH en régimen mesofílico para (a) 21 d TRM y (b) 14 d TRM; • Producción de biogás, □ productividad de hidrógeno, ◇ pH.	108
Fig. 16. Dinámicas de producción de biogás, productividad de hidrógeno y pH en régimen termofílico para (a) 21 d TRM y (b) 14 d TRM; • Producción de biogás, □ productividad de hidrógeno, ◇ pH.	109
Fig. 17. Distribución de metabolitos en Etapa H. a) mesofilia a 14 d TRM, b) mesofilia a 21 d TRM, c) termofilia a 14 d TRM, d) termofilia a 21 d TRM. Símbolos: ■, acetona; ▽, metanol; ▼, etanol; ▲, butanol; ○, ácido acético; □, ácido propiónico; △, ácido butírico; ●, ácido láctico.	112
Fig. 18. Geles de agarosa al 1.3 %. Cada gel muestra en el primer carril un marcador de peso molecular y el triplicado del ensayo realizado, con excepción del carril 4 de la figura c. a) DNA genómico recién extraído, b) DNA genómico purificado, c), comparativo del producto de PCR de 465 pb (carriles 1 – 3) y producto de PCR purificado de 465 pb (carril 4).	116
Fig. 19. Geles de poliacrilamida. A) productos de PCR sin purificar, B) productos de PCR purificados, C) TGGE para encontrar el intervalo de temperatura óptimo, D) productos de PCR purificados a gradiente de temperatura óptimo, E) productos de PCR purificados en gel con variante de contenido de poliacrilamida y formamida.....	117

- Fig. 20. Gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante 48-58% para amplificados del 16S rDNA de eubacterias. Carriles: 1, excreta de vaca; 2, lodos activados; 3, inóculo metanogénico de arranque; 4, control *E. coli*. 118
- Fig. 21. Gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante 35 - 58% para amplificados del 16S rDNA de eubacterias. Carriles: 1, excreta de vaca; 2, lodos activados; 3, inóculo metanogénico de arranque; 4, muestra de reactor metanogénico en operación; 5, control *E. coli*. 119
- Fig. 22. Producción de hidrógeno, a) acumulada en mesofilia, b) por ciclo en mesofilia, c) acumulada en termofilia, d) por ciclo en termofilia. ●, sin adición de lodos ni sales; ▽, sólo adición de lodos; ■, sólo adición de sales; ◇, adición de lodos y sales..... 123
- Fig. 23. Efectos sobre la producción acumulada de hidrógeno P_{H_2} de (a) temperatura, (b) adición de nitrógeno, (c) adición de sales. Efectos sobre la productividad inicial de hidrógeno R_{H_2} de (d) temperatura, (e) adición de nitrógeno, (f) adición de sales. 126
- Fig. 24. Producción de hidrógeno, a) acumulada en mesofilia, b) por ciclo en mesofilia, c) acumulada en termofilia, d) por ciclo en termofilia. ●, sin adición de lodos ni sales; ▽, sólo adición de lodos; □, adición de lodos y sales..... 131
- Fig. 25. Dinámicas de operación promedio para duplicados de la Etapa M. Condiciones: a) mesofílico alimentado con sólidos fermentados de 21 d TRM, b) mesofílico alimentado con sólidos fermentados de 14 d TRM, c) termofílico alimentado con sólidos fermentados de 21 d TRM, d) termofílico alimentado con sólidos fermentados de 14 d TRM; (•) Q_{bg} : producción de biogás; (□), I_{CH_4} : productividad de metano; (◇) pH. 137
- Fig. 26. Dinámicas de operación de la Etapa M comparando la operación mesofílica (claras) con la termofílica (negras) con alimentación proveniente de sólidos fermentados de a) 21-H y b) 14-H..... 138
- Fig. 27. Efecto del origen de alimentación y la temperatura sobre: la producción de biogás (a y b), la productividad de metano (c y d), el rendimiento de metano por sustrato alimentado (e y f), y el rendimiento de metano por sustrato removido (g y h)..... 139
- Fig. 28. Micrografías de sólidos digeridos 148
- Fig. 29. Cinéticas de producción enzimática utilizando FORSU como sustrato: a) actividad de papel filtro; b) rendimiento enzimático de actividad de papel filtro; c) actividad de carboximetilcelulasas; d) rendimiento enzimático de carboximetilcelulasas. Círculos vacíos, 1 %SV; círculos rellenos 2 %SV; triángulos, 3%SV..... 155
- Fig. 30. Comparación de actividades enzimáticas de diferentes sustratos con y sin adición de lactosa. a) FPx, b) CMCx. (S) Solka flocc 2%, (S+L) Solka flocc 2% adicionada con lactosa, (FP) papel filtro, (FP + L) papel filtro adicionado con lactosa como sustratos, (O) FORSU, (O+L) FORSU adicionado con lactosa. . 157
- Fig. 31. Dinámicas de actividad enzimática para la evaluación de diferentes sustratos. a) actividad de papel filtro, b) rendimiento enzimático de actividad de papel filtro, c) actividad de carboximetilcelulasas. Símbolos: cuadros, FORSU 1 %SV; triángulos, SF 1 %SV; círculos, SD 1 %SV..... 159

Fig. 32. Cinética de actividad enzimática. Ensayos en lote: (■) Ensayo 27 pH 4.8, (●) Ensayo 28 y 30 pH 5.8. Las flechas indican los pulsos de alimentación.	164
Fig. 33. Efectos de la sacarificación sobre (a) sustratos, (b) enzimas.	166
Fig. 34. Cinéticas de sacarificación. Símbolos negros, extracto enzimático; símbolos blancos, Celluclast ^{mr} ; Triángulos, papel filtro; Cuadros, SF; Círculos, FORSU.	166
Fig. 35. Comparativo de los experimentos de relación enzima:sustrato y el control Celluclast a 60 FPU/g SV, a) concentración final de glucosa, b) eficiencia de sacarificación en base holocelulosa, c) rendimiento de sacarificación. Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento. Los errores del diseño fueron 0.246 y 0.165 para la producción de glucosa y para el rendimiento de sacarificación, respectivamente (Anexo, Tabla A14 y A15).	170
Fig. 36. Diagrama de bloques de operación serie-paralelo del modelo de biorrefinería H-M-Z-S. FORSU, fracción orgánica de residuos sólidos urbanos; SF, sólidos fermentados; SD sólidos digeridos; TL, tratamiento de lavado; Lx, lixiviados; SFL, sólidos fermentados lavados; C, centrifugación; UF, ultrafiltración; SRF, sólidos re-fermentados; B, biomasa; Ez, extracto enzimático concentrado; F, filtrados; LS, licores sacarificados; Ez,r, enzima residual; SH, sólidos hidrolizados.	176
Fig. 37. Diagrama del flujo de procesos del modelo de biorrefinería H-M-Z-S.	177
Fig. 38. Principales impactos de la biorrefinería en (a) acidificación (punto de corte 6 %), (b) eutroficación (punto de corte 5 %) y (c) calentamiento global (punto de corte 5 %).	187
Fig. 39. Impactos normalizados para los escenarios de biorrefinería y relleno sanitario.	190
Fig. A1. Efectos de la temperatura sobre la (a) producción acumulada de hidrógeno y (b) productividad inicial de hidrógeno. Efectos de la adición de nitrógeno sobre la (c) producción acumulada de hidrógeno y (d) productividad inicial de hidrógeno.	211
Fig. A2. Efectos de la temperatura sobre la (a) producción acumulada de hidrógeno y (b) productividad inicial de hidrógeno. Efectos de la adición de sales sobre la (c) producción acumulada de hidrógeno y (d) productividad inicial de hidrógeno.	212
Fig. A3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto enzimático de <i>T. reesei</i> MCG 80.	214
Fig. A4. Cinética de actividad enzimática. (a) actividad de carboximetilcelulasas, (b) actividad de celulasas en papel filtro. (●) Ensayo con inoculación de micelio al 6 % v/v, (□) Ensayo con inoculación de micelio al 10 % v/v.	215
Fig. A5. Cinética de actividad enzimática. (●) Ensayo pH 3.8, (■) Ensayo control pH 4.8.	215

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Az	actividad enzimática (UI/mL o FPU/mL)
A/B	relación acético/butírico
CMC _x	actividad de carboximetilcelulasas (UI/mL)
C/N	relación carbono nitrógeno
DASS	digestión anaerobia en sustrato sólido
DQO	demanda química de oxígeno (g)
E _F	flujo energético
EL	carga enzimática
Ê _P	potencial energético
ES-Reprode	evaluación de sistemas Recursos- Energía-Productos-Desechos
FASSH-VI	fermentación anaerobia en sustrato sólido hidrogenogénico con venteo intermitente
FCS	fermentación en cultivo sumergido
FORSU	fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
FP	papel filtro
FPU	unidad de papel filtro
FP _x	actividad de papel filtro (FPU/mL)
FSS	fermentación en sustrato sólido
GEI	gases de efecto invernadero
GX	concentración de glucosa y xilosa (g/L)
H	etapa de producción de hidrógeno
H-M	producción acoplada de hidrógeno y metano
I	productividad (NmL/kg/d)
LCA	Evaluación de ciclo de vida (del inglés Life Cycle Assessment)
LS	licores sacarificados de la Etapa S
M	etapa de producción de metano
NKT	nitrógeno Kjeldahl total
NL, NmL	litro, mililitros normalizados
PF	papel filtro
P _{H₂}	producción acumulada de hidrógeno (µmol H ₂ /g _{SV})
Q	producción de biogás (NmL/d)
R _{H₂}	productividad inicial de hidrógeno (µmol H ₂ /g _{SV} /h)
RSM	residuos sólidos municipales
RSO	residuos sólidos orgánicos
S	etapa de producción de sacarificados
SD	sólidos digeridos de la Etapa M
SF	sólidos fermentados de la Etapa H
SH	sólidos hidrolizados de la Etapa S
SRF	sólidos re-fermentados de la Etapa Z
ST	sólidos totales
SV	sólidos volátiles
Tr	<i>Trichoderma reesei</i>

TRM	tiempo de residencia másico (d)
UI	unidades internacionales
Xilx	actividad de xilanasas (UI/mL)
Y	rendimiento
Y'	rendimiento en base alimentación
Y'z	rendimiento enzimático (UI/g holocelulosa o FPU/ g holocelulosa)
Z	etapa de producción enzimática

Letras griegas

Δ	cambio, diferencia
η	eficiencia de conversión o remoción
γ	radio de alcalinidad:sustrato
Σ	sumatoria

Subíndices

bg	biogás
bh	base húmeda
bs	base seca
bSV	base sólidos volátiles
CH ₄	metano
H ₂	hidrógeno
r	masa húmeda del reactor

RESUMEN

Se desarrolló un modelo de biorrefinería a escala laboratorio en cuatro etapas para la producción de hidrógeno, metano, enzimas holocelulolíticas y sacarificados (H-M-Z-S).

El proceso hidrogenogénico (Etapa H) fue alimentado con la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) en régimen semi-continuo y en lote, ambos en condiciones de fermentación en sustrato sólido (20.9 %ST). La hidrogenogénesis en el proceso semi-continuo se vio favorecida por el régimen termofílico operado a 21 d TRM, dando como resultado la máxima productividad de 202 NmL H₂/kg_r/d. En el proceso en lote y contrario a lo esperado, los lodos activados no tuvieron efecto positivo sobre la producción de H₂, por lo que a condiciones de termofilia sin adición de sales de fosfato ni de lodos activados se obtuvo la mayor producción acumulada de 1 983 μmol H₂/g SV.

Los sólidos fermentados (SF) fueron los purgas provenientes de proceso semi-continuo de la Etapa H. Éstos se alimentaron a la etapa metanogénica (Etapa M) que se realizó en proceso semi-continuo a 28 d TRM. Tanto la temperatura de operación como el origen de los SF tuvieron un efecto significativo en la producción de CH₄. La mejor productividad de 2 023 NmL CH₄/kg_r/d se obtuvo en régimen termofílico con alimentación de SF provenientes de la hidrogenogénesis a 14 d TRM. Comparando la productividad de CH₄ de la Etapa M contra digestores control alimentados con FORSU a 28 d TRM, se determinó que los SF propiciaban una mayor metanogénesis que la FORSU. Por lo tanto, en la Etapa H además de producirse el hidrógeno como combustible limpio, se generaron SF que permitieron mayores productividades y rendimientos de metano.

En la producción de enzimas (Etapa Z) utilizando *Trichoderma reesei* MCG 80, se determinó que la fermentación en sustrato sumergido tuvo mejores títulos enzimáticos que la fermentación en sustrato sólido, por lo que se eligió la primera para los posteriores ensayos. Al utilizar como sustratos lignocelulósicos los SF, las purgas de la Etapa M (sólidos digeridos, SD) y la FORSU, se observó que todos indujeron la actividad enzimática pero el mejor sustrato fueron los SF. Al utilizar reactores tipo Sixfors en lote alimentado con SF se obtuvieron 2.06 FPU/mL y 1.23 UI_{CMC}/mL.

En el proceso de sacarificación (Etapa S) se comparó la producción de azúcares con SF y FORSU usando extracto enzimático de la Etapa Z o enzima comercial Celluclast. Independientemente de la enzima utilizada, el mejor sustrato para la producción de sacarificados fueron los SF. El extracto enzimático de la Etapa Z tuvo mayor sacarificación en 13 – 16 % comparado con la enzima Celluclast; y se alcanzaron eficiencias de sacarificación cercanas al 50 %_{bSV} para la FORSU, y de hasta 65 %_{bSV} para los SF. Tras 72 h de sacarificación sería posible recuperar y reciclar el extracto enzimático.

A partir de los datos experimentales se realizó una evaluación de sistemas de los recursos, energía, productos y desechos del modelo de biorrefinería H-M-Z-S. Se estableció que la mejor configuración de la biorrefinería correspondía a un proceso serie paralelo, donde con FORSU se producían H₂ y SF, y a partir de lo SF los demás productos. La biorrefinería tuvo excedentes en energía eléctrica pero déficit en la energía calórica requerida para su operación, y presentó beneficio ambiental en el ahorro de gases de efecto invernadero en comparación con la disposición de la FORSU en relleno sanitario.

ABSTRACT

A lab-scale biorefinery model was developed. It was comprised of four stages for the production of hydrogen, methane, holocellulolytic enzymes and saccharificates (H-M-Z-S).

The hydrogen-producing process (H-stage) was fed with the organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW). This process was assayed in semi-continuous and batch operation, both at solid substrate fermentation (20.9 %TS). The hydrogenogenesis in the semi-continuous process was promoted by the thermophilic regime operated at 21 d MRT, with a maximum productivity of 202 NmL H₂/kg_r/d. In the batch process, and opposite to expected, the activated sludge did not show positive effect on the H₂ production; being the highest value of 1 983 μmol H₂/g VS at thermophilic conditions without the addition of phosphate salts nor activated sludge.

The fermented solids (FS) were the purges from the H-stage semi-continuous process. The FS were fed to the methanogenic stage (M-stage) on semi-continuous operation at 28 d MRT. Both the operation temperature and the origin of the FS had a significant effect on CH₄ production. The best productivity was 2 023 NmL CH₄/kg_r/d obtained at thermophilic regime fed with FS from hydrogenogenesis at 14 d MRT. Comparing the CH₄ productivity from M-stage against control digesters fed with OFMSW at 28 d MRT at both thermal regimes, it was determined that the FS promoted a higher methanogenesis than the OFMSW. Therefore, the H-stage, besides of producing the clean fuel hydrogen, it also generated FS that allowed higher CH₄ productivities and yields.

The enzymes production (Z-stage) was performed using *Trichoderma reesei* MCG 80. The enzyme titers were higher when using the submerged fermentation than the solid substrate fermentation. The lignocellulosic substrates assayed were the purges from H-stage (FS), from M-stage (digested solids, DS) and the OFMSW. All the assayed substrates allowed the enzyme induction, yet the most outstanding were the FS. The fed-batch regime on Sixfors fermenters fed with FS gave 2.06 FPU/mL and 1.23 U_{CMC}/mL.

The saccharification process (S-stage) consisted of the comparison of the enzyme extract from Z-stage and the commercial enzyme Celluclast for the production of sugars from FS and OFMSW. Independently of the enzyme used, the FS gave higher sugars than the OFMSW. The enzyme extract had 13 – 16 % higher saccharification when compared to the commercial Celluclast. Thus, saccharification efficiencies were 50 %_{V_{Sb}} for OFMSW and up to 65 %_{V_{Sb}} for the FS. After 72 h saccharification, it would be possible to retrieve and recycle the enzyme extract.

From the experimental data it was possible to perform a system assessment for the resources, energy, products and wastes from the biorefinery model H-M-Z-S. It was established that the best configuration for the biorefinery model was a series-parallel process, where OFMSW is used for the production of H₂ and FS, and from this latter all the other products. In terms of power the biorefinery was self-sustainable, yet it had a deficit of the heat for operation. Environmentally, the biorefinery saved greenhouse gases from environment when compared to landfilling of the OFMSW.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La implementación de procesos para la obtención de bioproductos en procesos serie/paralelo a partir de biomasa, emulando los procesos de refinación del petróleo, ha demostrado ser posible y está retomando fuerza (Zeikus, 1980, Angenent *et al.*, 2004; Kamm & Kamm, 2004; Poggi-Varaldo *et al.*, 2014). A partir de procesos biotecnológicos se pueden producir biocombustibles como el biohidrógeno, metano o bioetanol. También ha sido posible obtener otros bioproductos con alto valor agregado como las enzimas (Escamilla-Alvarado, 2009; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013a).

El biohidrógeno como biocombustible es una de las alternativas al uso tradicional de los combustibles fósiles (Levin *et al.*, 2004; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005). Su obtención puede lograrse de una variedad de métodos biológicos como la fermentación oscura, fotofermentación, biofotólisis del agua, etc. (Robledo-Narvárez *et al.*, 2008). Entre éstas, la fermentación oscura hidrogenogénica tiene como ventaja su versatilidad por que se puede adaptar a procesos de fermentación en sustrato sólido (FSS) o en cultivo sumergido (FCS) a diferentes temperaturas. Además, es posible utilizar sustratos complejos como la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos o municipales (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b). Los procesos de FSS presentan algunas ventajas sobre la FCS, como el uso reducido de volúmenes de dilución, escasa agitación y mínimos mecanismos de control (Cannel & Moo-Young, 1980). En la fermentación oscura, los consorcios microbianos se prefieren sobre los cultivos axénicos, entre otras cosas porque no requieren esterilización y porque son capaces de adaptarse y actuar sintróficamente sobre los sustratos complejos (Kleerebezem & van Loosdrecht, 2007). Para establecer las relaciones sintróficas existentes en los procesos fermentativos es necesario conocer las especies involucradas. Para lograr esto, una variedad de técnicas de biología molecular se han utilizado, como la PCR, QPCR, DGGE, T-RFLP, clonación y secuenciación (Ueno *et al.*, 2007; Muñoz-Paez, 2008a; Rittman *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010).

Por otro lado las xilanasas y las celulasas son enzimas cuya producción por hongos o bacterias se induce en presencia de materiales celulósicos y

lignocelulósicos, como el bagazo de caña, cascarilla de arroz y fibra de trigo, entre otros (Senthilkumar *et al.*, 2005; Badhan *et al.*, 2007; Rojas-Rejón *et al.*, 2011). Estas enzimas tienen un alto interés industrial como en el tratamiento de la pasta de celulosa, en la industria textil, en la clarificación de jugos, etc. Se llegó a estimar que el crecimiento del mercado mundial de las enzimas industriales fue de mil millones a 1.5 mil millones de dólares de 1995 al 2000 (Schäfer *et al.*, 2005). Novozymes, una de las principales empresas biotecnológicas productora de enzimas, ha visto un crecimiento de sus ventas del 7 - 8 % anual desde 2008 (Novozymes, 2013). La principal industria consumidora de enzimas es la de detergentes, le siguen la panificadora, de bebidas y lácteos, así como la alimenticia y de la pulpa y papel. Se estima que en 2018 tan sólo el mercado mundial de enzimas para el ramo alimenticio crezca a 2.3 mil millones de dólares (Markets & Markets, 2014). Un campo en donde la aplicación de enzimas se encuentra en desarrollo es en el de obtención de biocombustibles por medio de la sacarificación de biomasa vegetal (Zhuang *et al.*, 2007). La distribución de enzimas para este tipo de actividad es del 16 % del total del mercado (Novozymes, 2013).

La sacarificación de la biomasa lignocelulósica es un proceso en el cual, por medio de la acción de celulasas y xilanasas, se obtienen azúcares fermentables con aplicación potencial para la producción de bioetanol, biobutanol, y otros solventes (Ballesteros *et al.*, 2004; Lin & Tanaka, 2006). Los cultivos y residuos agrícolas constituyen principalmente la biomasa lignocelulósica utilizada en los procesos de sacarificación (Mes-Hartree *et al.*, 1988; Holtzapple *et al.*, 1991; Mesa *et al.*, 2010). También se han sacarificado sustratos menos usuales como residuos orgánicos municipales (Clanet *et al.*, 1988; Ballesteros *et al.*, 2010), residuos de comida (Yan *et al.*, 2011; Vavouraki *et al.*, 2013).

Los residuos sólidos municipales (RSM) tienen un alto contenido de material orgánico (fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, FORSU), que varía entre 40 y 60 % dependiendo de la población dónde se originan (INEGI, 2009), y que pudiera ser aprovechado como sustrato para procesos biotecnológicos. Actualmente en nuestro país no existe, de forma generalizada, un correcto separamiento y disposición de la FORSU dónde se aproveche su alto contenido orgánico. Por el

contrario, se dispone junto con los demás componentes de los RSM en rellenos sanitarios y vertederos a cielo abierto, contribuyendo a la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) como el metano y el dióxido de carbono (Semarnat, 2009).

Mediante el modelo de biorrefinería se busca aprovechar la composición compleja de la biomasa vegetal en la FORSU, y su versatilidad como sustrato en los procesos biotecnológicos para obtener una variedad de bioproductos (Fig. 1).

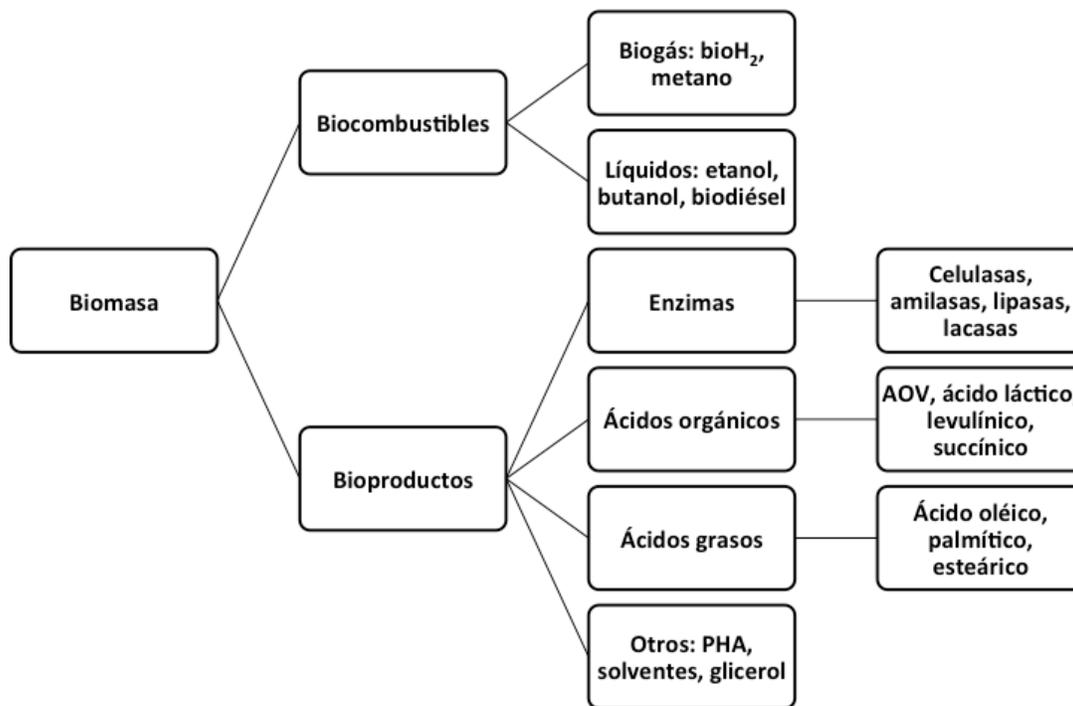


Fig. 1. Esquema de potenciales bioproductos a partir de biomasa. Basado en Zeikus *et al.* (1980,1999), Zhenying *et al.* (2009), Bozel *et al.* (2010).

Bajo este concepto, previamente se desarrolló un proceso de tres etapas para la obtención de biohidrógeno, metano, xilanasas y celulasas (Proceso H-M-Z, Escamilla-Alvarado, 2009) que demostró ser tecnológicamente factible. Sin embargo, para probar el potencial de las biorrefinerías, es necesario incrementar su alcance y versatilidad. Por esto, el objetivo de este trabajo fue integrar un proceso modelo de biorrefinería de cuatro etapas (H-M-Z-S), utilizando como sustrato inicial del proceso H-M-Z-S, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

1.1. Procesos hidrogenogénicos-metanogénicos

El hidrógeno es un combustible teóricamente limpio, que no produce gases de efecto invernadero y que posee el mayor poder calórico base masa entre todos los materiales combustibles (ca. 141 KJ/g). Como subproductos de la hidrogenogénesis por fermentación oscura se obtienen cantidades considerables de ácidos orgánicos (ácidos acético, butírico, propiónico, láctico, entre otros) y solventes que pueden utilizarse como materia prima para la síntesis de otros productos químicos (Lipinski, 1981), o como sustrato de otros procesos biológicos, como la metanogénesis, en celdas de combustible microbianas o para la fermentación heterotrófica (Ueno *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Escamilla-Alvarado, 2009; Vazquez-Larios *et al.*, 2011). La metanogénesis es un proceso donde el metano es el resultado del uso del CO₂ como aceptor final de electrones.

El metano es el hidrocarburo más sencillo y es considerado como la forma más reducida del carbono. En su forma purificada o como gas natural puede utilizarse como combustible en la producción de electricidad y calor, y como reactivo está involucrado en la petroquímica en la producción de cianuro de hidrógeno, disulfuro de carbono, metanoclorados y gas de síntesis, del cual se produce amonio, hidrógeno, metanol, etc. Estos a su vez son precursores muy importantes de una gran variedad de productos entre los que destacan explosivos, plásticos, medicinas, insecticidas, fertilizantes, dimetil éter, metil terbutil éter, etil terbutil éter, etc. (Lee, 1997; Matar & Hatch, 2000). En el año 2008, el 38.7% de la energía requerida en México se obtuvo del metano como gas natural, lo que representó una producción de más de 60 billones de metros cúbicos (Sener, 2008).

A diferencia del hidrógeno, cuya combustión sólo produce agua, la combustión del metano produce también un gas de combustión con un contenido mayoritario de dióxido de carbono. Al tratarse de un combustible con un sólo átomo de carbono, se evita la producción de gases como el CO, SO₃, SO₄, NO₃, NO₄, generados por otros combustibles fósiles y que causan más daño a la atmósfera (Demirbas, 2004).

Dentro de la gama de biocombustibles, el metano es el que presentaría el

mejor escenario de uso y distribución, ya que existe una infraestructura ampliamente extendida para la distribución de gas natural que se podría adaptar fácilmente a la del metano, por lo que no se necesitaría infraestructura compleja adicional. Así mismo, un uso práctico que se aplica al hidrógeno es como co-combustible del metano en una mezcla denominada *hythane*, donde alcanzando una presión parcial de hasta el 10% se incrementa el poder calórico de combustión y mejora el desempeño del motor (Porpatham *et al.*, 2007).

Con la producción acoplada de hidrógeno y metano (proceso H-M) se busca desarrollar procesos que aprovechen las condiciones de operación de cada etapa. La hidrogenogénesis (etapa H) necesita de condiciones particulares para su desarrollo, un ambiente reductor alrededor de pH 5.5, ausencia de microorganismos hidrogenotróficos (e.g. arqueas metanogénicas, microorganismos solventogénicos y bacterias del ácido láctico), altas cargas orgánicas y temperaturas mesofílicas, termofílicas o hipertermofílicas, entre otras (Chou *et al.*, 2008; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009). El H₂ producido escapa en fase gaseosa del medio de cultivo, y el sustrato hidrolizado, junto con los ácidos orgánicos y solventes producidos, pueden ser entonces alimentados al proceso metanogénico para continuar su conversión a CH₄ y CO₂ (Escamilla-Alvarado, 2009).

La metanogénesis (etapa M) por su parte es llevada a cabo por arqueas metanogénicas acetoclastas o hidrogenoclastas. Las arqueas acetoclastas convierten el ácido acético a metano y CO₂ siguiendo la ruta Ljungdahl-Wood (Madigan *et al.*, 2009), mientras que las hidrogenoclastas reducen CO₂ a CH₄ por medio de complejos metil reductasa (Fig. 2). Las arqueas metanogénicas se ven favorecidas en ambientes ligeramente oxidantes (pH 7.5 – 8), bajas cargas orgánicas y temperaturas mesofílicas o termofílicas. Si el biorreactor se trabaja en estas condiciones y además cuenta con un consorcio bien establecido que continúa hidrolizando la materia orgánica y reduciendo los metabolitos, entonces el acoplamiento H-M resulta exitoso. Además en un proceso H-M acoplado, es posible incrementar la producción de metano comparado con un proceso sólo metanogénico, como consecuencia de la pre-hidrólisis ocurrida en la etapa H (Liu *et al.*, 2006;

Yokoyama *et al.*, 2010). Una ventaja adicional de este acoplamiento es la posible reducción del tiempo de residencia másica en la etapa M (Escamilla-Alvarado, 2009).

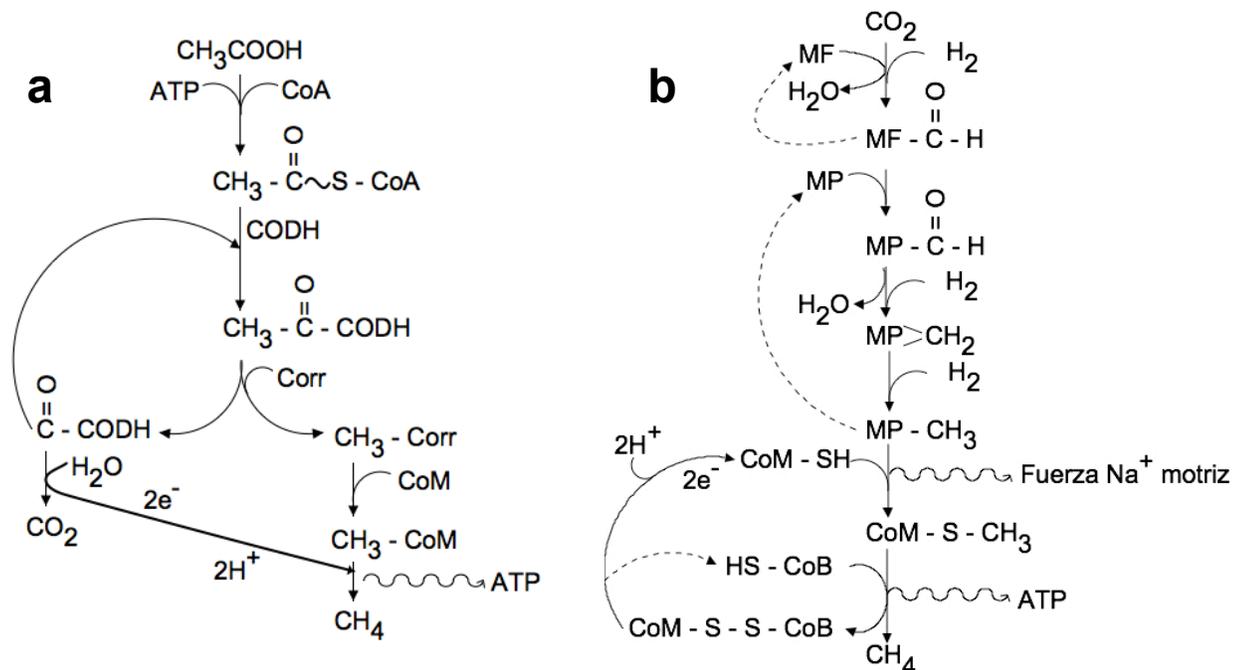


Fig. 2. Ruta metanogénica a) a partir de acetato, b) a partir de CO_2 y H_2 . Adaptado de Madigan *et al.* (2009). ATP, adenosín trifosfato; CoA, coenzima A; CODH, monóxido deshidrogenasa; Corr, proteína corrinóide; CoB, coenzima B; CoM, coenzima M; MF, metanofurano; MP, tetrahidrometanopterinina

En la Tabla 1 se muestran algunos procesos para la producción acoplada de hidrógeno y metano a escala laboratorio y piloto, que utilizan residuos orgánicos como sustrato. Algunos de estos procesos operaron en cultivo sumergido, por lo que diluyeron con agua los residuos orgánicos hasta concentraciones de 1 % ST. Al utilizar grandes volúmenes de agua para la dilución de los residuos orgánicos se está originando *a posteriori* un problema de lixiviados, pues el agua se ha contaminado con los ácidos orgánicos y solventes producidos durante la fermentación. Al trabajar en sustrato sólido se minimiza este problema pues los volúmenes de dilución son menores, e incluso pueden evitarse cuando se utilizan los residuos orgánicos tal como se generan. Con la producción acoplada de hidrógeno y metano a partir de los residuos orgánicos municipales se podría aliviar la saturación de rellenos sanitarios (Escamilla-Alvarado, 2009).

Tabla 1. Operación y rendimientos de procesos de fermentación oscura hidrogenogénica-metanogénica

Fuente de carbono	Tipo de reactor	Inóculo/Microorganismos	Operación	Productividades	Rendimientos	Observaciones	Ref
Residuos orgánicos y papel (68.3 g/L)	CSTR ^a (H ₂) + IRPR ^b (CH ₄)	Lodos activados termofílicos (para H ₂) y lodos anaerobios de reactor comercial para residuos (para CH ₄)	Top _H ^{i,g} = 60 °C Top _M ^h = 55 °C COT _H ⁱ = 97.0 g DQO ^j /L/d COT _M ⁱ = 15.7 g DQO/L/d Vop _H ^k = 110 L Vop _M = 340 L TRH _H ⁱ = 1.2 d TRH _M = 6.8 d	5.4 L H ₂ /L/d 6.1 L CH ₄ /L/d	388 mL CH ₄ /g DQO	DQO _R ^p = 79.3 % SSV _R ^q = 87.8 % SSV _{R,H} = 80 % SSV _{R,M} = 30 % H ₂ en bg ^r = 50-60 % CH ₄ en bg = 63 %	1
Residuos de comida (100 g/L)	CSTR	Lodos de plantas de biogás	Top = 37 °C COT _H = 37.5 g SV ^m /L/d COT _M = 4.1 g SV/L/d TRH _H = 2 d TRH _M = 15 d Vop _H = 0.4 L Vop _M = 3 L	1.61 L H ₂ /L/d 2.05 L CH ₄ /L/d	43 mL H ₂ /g SV 500 mL CH ₄ /g SV	SSVR = 86 % SSV _{R,H} = 18.7 % SSV _{R,M} = 82.8 % H ₂ en bg = 42 % CH ₄ en bg = 65 %	2
Residuos de comida (19.8% p/p)	4 LBR ^c (H ₂) + UASB ^d (CH ₄)	Lodos de digestor anaerobio de aguas residuales	Top = 37 °C COT _H = 11.9 g SV/L/d COT _M = 5.4 g DQO/L/d SRT _H = 6 d SRT _M = 2 d Vop _H = 3.9 L/reactor; Vop _M = 20.1 L	3.63 L H ₂ /L/d 1.75 L CH ₄ /L/d	310 mL H ₂ /g SV 210 mL CH ₄ /g SV	SSV _R : 72.5 % SSV _{R,H} = 28.2 % SSV _{R,M} = 69.9 % H ₂ en bg = 10-55 %	3
Residuos de comida y desechos de planta avícola (74 g/L)	CSTR	Lodos de reactor mesofílico anaerobio a escala laboratorio	Top = 34 °C TRH _H = 3,5 d TRH _M = 15 d Vop _H = 100 mL Vop _M = 600 L pH: H = 5-6, M = 7.9	0.7 L H ₂ /L/d 1.4 mL CH ₄ /L/d	71 NmLH ₂ /g SV 449-989 NmL bg/d	SSV _R = 68-73 % H ₂ en bg = 25-27 % CH ₄ en bg = 62.5 %	4
Residuos simulados de papa (10 g/L)	CSTR	Lodos digeridos de planta de tratamiento de aguas residuales	Top = 35 °C COT _H = 50.4 g DQO/L/d COT _M = 8.2 g DQO/L/d TRH _H = 6 h TRH _M = 30 h Vop _H = 1 L Vop _M = 5 L pH: H = 5.5, M = 7	1.28 L H ₂ /L/d 0.51 L CH ₄ /L/d	30 mL H ₂ /g ST ^o 183 mL CH ₄ /g ST	DQO _R = 64 % DQO _{R,H} = 18.6 % DQO _{R,M} = 56.3 % SSV _R : 70 % H ₂ en bg = 45 % CH ₄ en bg = 76 %	5

Residuos de comida de restaurante (170 g/L)	SemiCRD ^e (H ₂) + SemiCSTR (CH ₄)	Etapa H no usa inóculo. Lodos granulares anaerobios de UASB para metanogénesis	Top= 40 °C COT _H = 22.6 g SV/L/d COT _M = 4.6 g SV/L/d TRH _H = 160 h TRH _M = 26.7 d Vop _H = 200 L Vop _M = 800 L pH: H= 5.5, M = 7	1.47 L H ₂ /L/d 2.51 L CH ₄ /L/d	56 mL H ₂ /g SV 546 mL CH ₄ /g SV	H ₂ en bg= 30 % CH ₄ en bg= 45 %	6
FORSU (35 %ST)	Digestor Anaerobio en Sustrato Sólido (DASS)	Sólidos de DASS-M aclimatados al sustrato	Top _H = 35 °C Top _M = 55 °C TRM _H ⁿ = 21 d TRM _M = 28 d Vop _H = 500 g Vop _M = 500 g pH: H= 6.3, M = 8	166 Nml H ₂ /kg/d 250 Nml CH ₄ /kg/d	1.76 mL H ₂ /g SV 66.6 mL CH ₄ /g SV	H ₂ en bg= 6.9 % CH ₄ en bg= 61 %	7
Residuos de comida (11.7 %ST)	Semi-continuo	NE	Top _H = 55° C Top _M = 55 °C TRM _H = 21 d TRM _M = 28 d Vop _H = 10 L Vop _M = 40 L pH: H= 5.5, M = 7.8	5.6 L H ₂ /L/d 3.5 L CH ₄ /L/d	205 mL H ₂ /g SV 464 mL CH ₄ /g SV	H ₂ en bg= 54 % CH ₄ en bg= 75 %	8
FORSU (2.9 %ST)	Semi-continuo	Lodos de PTAR	Top _H = 55° C Top _M = 55 °C TRM _H = 3.3 d TRM _M = 12.7 d Vop _H = 200 L Vop _M = 380 L pH: H= 4, M = 8.09	0.054 L H ₂ /L/d 2.05 L CH ₄ /L/d	2.6 mL H ₂ /g SV 383 mL CH ₄ /g SV	H ₂ en bg= 20 % CH ₄ en bg= 60 %	9

Notas: ^aCSTR: Reactor continuo de tanque agitado; ^bIRPR: Reactor de lecho empacado con recirculación interna; ^cLBR: Reactor de lecho filtrante; ^dUASB: Reactor anaerobio con lecho de flujo ascendente; ^eCRD: Tambor rotatorio continuo; ^fTop: temperatura de operación; ^gH: etapa hidrogenogénica; ^hM: etapa metanogénica; ⁱCOT: carga orgánica total; ^jDQO: demanda química de oxígeno; ^kVop: volumen de operación; ^lTRH: tiempo de retención hidráulico; ^mSV: sólidos volátiles; ⁿMRT: tiempo de retención másico; ^oST: sólidos totales; ^pDQO_R: remoción total de DQO; ^qSSV_R: remoción de sólidos suspendidos volátiles totales; ^rbg: biogás.

Referencias: 1, Ueno *et al.* (2007); 2, Liu *et al.* (2006); 3, Han & Shin (2004); 4, Gomez *et al.* (2006); 5, Zhu *et al.* (2008); 6, Wang & Zhao (2010); 7, Escamilla-Alvarado (2009); 8, Chu *et al.* (2010); 9, Cavinato *et al.*, (2011).

1.1.1. Bioquímica y microbiología de la producción de H_2

El metabolismo del hidrógeno es básicamente una ionización, en la que en un sentido resulta el consumo de H_2 mientras que la reacción inversa lleva a su producción (Ec. 1).



Tomando como producto el H^+ , el cambio de energía libre de la reacción (ΔG^0), si se supone pH 7, es -79.66 kJ, mientras que al mismo pH el potencial de reducción (E'_0) del par redox $2H^+/H_2$ es -0.41 V (Madigan *et al.*, 2009). La ionización del hidrógeno es más común que la formación de hidrógeno molecular, y se puede encontrar en muchas rutas bioquímicas, donde el hidrógeno ionizado y los electrones son llevados a través de sistemas de transporte por la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y por varios citocromos, que eventualmente lo combinan con el O_2 para formar agua o en su defecto hidrógeno molecular (Kalia & Purohit, 2008). En el caso de los microorganismos aerobios, los H^+ son utilizados para producir adenosín trifosfatos (ATP). En sí, la evolución en H_2 no confiere ninguna ventaja a los microorganismos. Sin embargo, en la ausencia de un aceptor externo de electrones (O_2), donde el suministro de energía es limitado, los compuestos orgánicos sólo se pueden catabolizar por fermentación. Solamente determinados compuestos son fermentables y la mayor parte de las fermentaciones requieren que se forme un intermediario de alta energía que pueda originar ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Madigan *et al.*, 2009). Por otro lado, algunos microorganismos anaerobios han adaptado el uso de compuestos inorgánicos, como los sulfatos y nitratos, como sus aceptores terminales de electrones. Adicionalmente, como una estrategia para lograr la completa degradación de la materia orgánica en la célula, el H_2 sirve como aceptor terminal de electrones tanto para los sulfatorreductores como para los nitratorreductores y los metanógenos. De hecho, la producción de H_2 es necesaria para algunos miembros de la comunidad microbiana como una forma de eliminar el exceso de electrones y mantener el equilibrio redox (Kalia & Purohit, 2008).

La glucosa es un compuesto clave en el metabolismo microbiano. El metabolismo anaerobio de la glucosa genera energía en forma de ATP e intermediarios como el

piruvato. En general, las reacciones de fermentación pueden producir muchos productos diferentes como H₂, acetato, butirato, lactato, acetona, etanol, butanol y otros. La pareja acetato-H₂ produce más ATP por mol de sustrato que los alcoholes como el etanol y el butanol, y es un producto energéticamente preferido a partir de la glucosa (Logan *et al.*, 2002). En la Fig. 3 se presenta la producción de hidrógeno en forma simplificada a partir del intermediario piruvato que se convierte en acetyl-CoA. La conversión de piruvato a acetyl-CoA es una reacción de oxidación, por lo que el exceso de electrones generados debe usarse para hacer productos finales más reducidos o para producir H₂. La oxidación del piruvato se realiza con la ayuda de las hidrogenasas, mientras que en el caso de la oxidación del formiato, las enzimas involucradas son las fórmico-deshidrogenasas

Se conocen dos tipos de hidrogenasas. Las hidrogenasas níquel-hierro (NiFe) son las más usadas para el consumo de hidrógeno y por lo general se encuentran en microorganismos oxidantes del hidrógeno, mientras que las hidrogenasas sólo hierro (Fe) son usadas para la producción de hidrógeno (Chang *et al.*, 2006). Éstas contienen clústeres de hierro-azufre y dos átomos en el centro activo para catalizar la producción de hidrógeno de los protones y electrones (Cammack, 1999). Se ha observado que la cantidad de mRNA de la Fe-hidrogenasa es alta en fase acidogénica, y disminuye cuando el cultivo entra en fase solventogénica (Gorwa *et al.*, 1996; Jen *et al.*, 2007).

La diversidad microbiana productora de hidrógeno es vasta (Kalia & Purohit., 2008), comprendiendo algas unicelulares (e.g. *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* y *Chlorella*), y bacterias del phylum Firmicutes (*Clostridium* y *Bacillus*) así como γ -Proteobacteria (*Escherichia* y *Enterobacter*).

El phylum Firmicutes recibe su nombre debido a la membrana celular rígida que posee (Madigan *et al.*, 2009). El género *Clostridium* es capaz de producir endosporas, con lo cual la célula puede sobrevivir a condiciones adversas y reactivarse cuando se encuentre en condiciones más favorables. Las especies más importantes de éste género son *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. perfringens*, *C. thermocellum* y *C. saccharobutylicum* (Jen *et al.*, 2007). Las γ -Proteobacteria por el contrario no son formadoras de esporas y por lo tanto son sensibles al tratamiento térmico como método de selección de bacterias hidrogenogénicas.

Se puede hablar de dos rutas diferentes para la producción de H₂, la presente en

Clostridium y la de *Escherichia*. En *Clostridium*, los genes para la piruvato ferredoxina (Fd)/flavodoxina oxidorreductasa (EC 1.2.7.1) y la H₂ Fd/flavodoxina oxidorreductasa (EC 1.2.7.2) están involucradas en la producción de H₂. En *Escherichia*, la piruvato formato liasa (EC 2.3.1.54), la formato deshidrogenasa Fdh- α , Fdh- β y Fdh- γ (EC 1.2.1.2) y la hidrogenasa (subunidades grande y pequeña), son responsables de la evolución del hidrógeno. La piruvato Fd/flavodoxina oxidorreductasa esta altamente expresada en *C. acetobutylicum* y *C. perfringens* y falta en los genomas de *B. subtilis* y *B. halodurans* (Karlin *et al.*, 2004). Por esto, *Bacillus* aparentemente usa el complejo piruvato deshidrogenasa (*pdh* ABCD), el cual esta altamente expresado en *B. subtilis* y *B. halodurans*, y falta en *C. acetobutylicum* y *C. perfringens* (Karlin *et al.*, 2004). Lo anterior sugiere que los sistemas de producción de H₂ de *Bacillus* y *Clostridium* se encuentran bajo diferentes controles metabólicos (Kalia *et al.*, 2008).

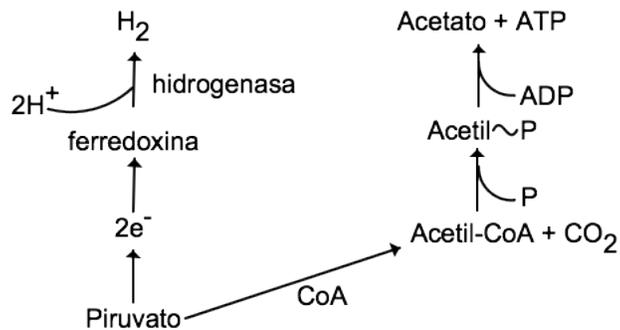


Fig. 3. Esquema simplificado de producción de hidrógeno. Adaptado de Madigan *et al.* (2009)

1.1.2. Bioquímica y microbiología de la producción de CH₄

De la biomasa vegetal que se forma anualmente por fotosíntesis fijando el carbono del CO₂, se estima que cerca del 1 % se retorna a la atmósfera vía metano; esto es más de 1x10⁹ toneladas de gas combustible. Otros cálculos sugieren que aproximadamente el 74 % de las emisiones mundiales de metano se deben a la actividad biológica de los metanógenos (Cicerone & Oremland, 1988). Aproximadamente dos tercios del metano se difunden en zonas aeróbicas, donde es oxidado por bacterias metanotróficas. Un pequeño porcentaje es enterrado, lo que lleva a la formación de depósitos de metano, pero la mayoría escapa a la atmósfera, donde es fotoquímicamente convertido a CO₂ (Thauer *et al.*, 1998).

La concentración del metano atmosférico se ha incrementado continuamente durante los últimos 300 años, desde 0.7 ppm hasta 1.7 ppm. De esto se culpa principalmente a la expansión de los cultivos de arroz y del ganado rumiante, ya que los ambientes acuáticos anóxicos donde se cultiva el arroz y el rumen del ganado son nichos microbiológicos donde prosperan los organismos metanogénicos (Thauer *et al.*, 1998; Patra & Saxena, 2009; Madigan *et al.*, 2009).

La conversión de glucosa a metano no se metaboliza exclusivamente por un sólo tipo de microorganismos, sino por asociaciones sintróficas. Primero la glucosa se fermenta a acetato, CO_2 y H_2 , o a acetato, formato y H_2 . Entonces estos productos pueden ser utilizados por los organismos metanogénicos como fuente de energía y liberar CO_2 y CH_4 como productos finales.

El metabolismo energético de los metanógenos puede ser visto en dos partes (Fig. 4): una parte oxidativa en la cual la coenzima M (H-S-CoM, 2-tioetanosulfonato) y la coenzima B (H-S-CoB, 7-tioheptanoiltreoninfosfato) son oxidadas en heterodisulfuro CoM-S-S-CoB; y una parte reductiva en la cual el heterodisulfuro de la coenzima M y la coenzima B es re-reducida (Thauer *et al.*, 1998).

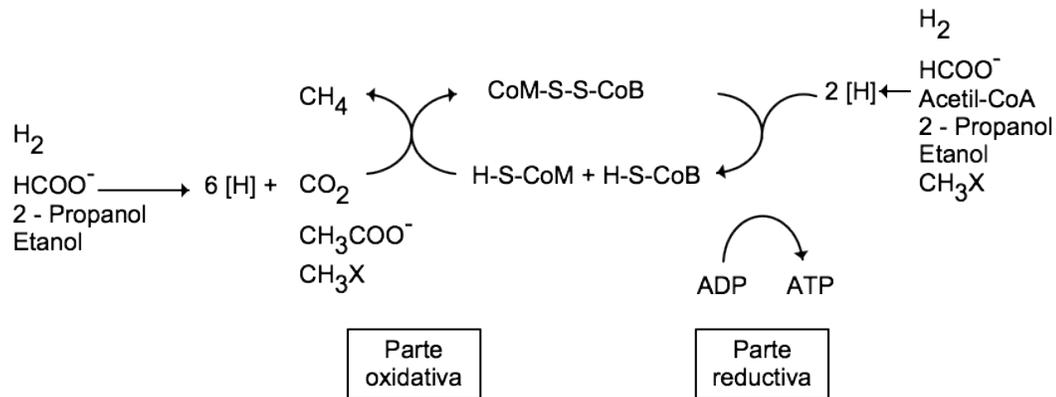


Fig. 4. Metabolismo energético en arqueas. Adaptado de Thauer *et al.* (1998).

Los metanógenos taxonómicamente pertenecen al phylum Euriarchaeota dentro del dominio Archaea (Tabla 2). De acuerdo a las clasificaciones más recientes existen cuatro órdenes (Demirel & Scherer, 2008) con distancias evolutivas muy significativas. Los cuatro órdenes son: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales y Methanosarcinales. De éstos, sólo los Methanosarcinales pueden fermentar el acetato a CO_2 y CH_4 (recibiendo por esto el nombre de acetoclastas), y además crecer en metanol,

metilitoles o metilaminas como única fuente de energía. En consorcios productores de metano se les considera menos abundantes en relación a los demás órdenes que se alimentan de H₂ y CO₂, llamados hidrogenoclastas (Ahring, 1995). Su mayor sensibilidad a la inhibición por amonio también limita su abundancia (Song *et al.*, 2010). También se le considera a este orden ser más sensible al oxígeno, aunque tienen la ventaja de formar gránulos gruesos que fungen como una barrera protectora (Sumiko-Hirasawa *et al.*, 2008). El orden Methanosarcinales comprende a su vez, dos familias, Methanosarcinaceas y Methanosaetaceas (Yu *et al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de arqueas metanogénicas (adaptado de Demirel & Scherer, 2008).

Dominio	Archaea			
Phylum	Euriarcheota			
Orden	Methanobacteriales	Methanococcales	Methanomicrobiales	Methanosarcinales
Familia	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>
Género	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanococcus</i>	<i>Methanomicrobium</i>	<i>Methanosarcina</i>
	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanoculleus</i>	<i>Methanococcooides</i>
	<i>Methanothermobacter</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanohalophilus</i>
	<i>Methanothermaceae</i>		<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanosaetaceae</i>
	<i>Methanothermus</i>			<i>Methanosaeta</i>

1.1.3. Identificación de microorganismos en ecosistemas complejos

Los consorcios microbianos presentes en los procesos de fermentación oscura son un campo de estudio interesante, principalmente por las interacciones sintróficas y competitivas que se pueden presentar. Conocer la composición de una comunidad microbiana, además de ayudar a describir las condiciones de operación y rendimientos en los sistemas biológicos, es fundamental para comprender de una forma más profunda los procesos biológicos.

Durante la década de los 90's se desarrollaron técnicas basadas en el RNA ribosomal (rRNA) que permiten estudiar la biodiversidad presente en cualquier ambiente sin necesidad de proceder a su aislamiento (Tabla 3). En este sentido, las subunidades ribosomales bacterianas 16S y 23S son de gran importancia debido a que son secuencias genéticas con un grado de polimorfismo suficiente para realizar estudios de taxonomía y

filogenia (Woese & Fox, 1977). Estas son moléculas muy conservadas a lo largo de la evolución para los organismos dentro de un mismo reino o dominio, pero con regiones altamente variables a nivel especie.

Tabla 3. Microorganismos presentes en consorcios anaerobios

Proceso	Sustrato	Herramienta	Microorganismos identificados	Ref
H Termofílico	Residuos de comida y papel	PCR, clonación	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> , <i>Lactobacillus keferi</i> , <i>Saccharomyces barnettii</i>	1
H Mesofílico	Sacarosa	T-RFLP	<i>Clostridium</i> spp., <i>C. beijerenckii</i> , <i>C. caliptrosporum</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium thermocellum</i>	2
M Mesofílico	Etanol	FISH, PCR, DGGE	<i>Methanosaeta</i> sp., <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Shewanella</i> sp, <i>Desulfotobacterium hafniense</i>	3
H Termofílico	Efluente de molino de aceite de palma	PCR, DGGE	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> , <i>Clostridium</i> sp y <i>Bacillus</i> sp	4
H Mesofílico	Sacarosa	PCR, DGGE	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Clostridium</i> sp, <i>Clostridium acetobutyricum</i>	5
M Mesofílico	Acetato de sodio	QPCR	<i>Methanococcoides methylutens</i> , <i>Methanobolus tindarius</i> , <i>Methanosalsum zhilinae</i> , <i>Methanosarcina acetivorans</i> , <i>M. barkeri</i> , <i>M. mazei</i> , <i>M. thermophila</i>	6
M Termofílico	Forraje y remolacha	T-RLFP	<i>Methanosaeta concilii</i> , <i>M. thermophila</i> , <i>Methanoculleus thermophilus</i> , <i>Methanobacteriales</i> , <i>Methanosarcinales</i>	7

Referencias: 1, Ueno *et al.* (2007); 2, Duangmanee *et al.* (2007); 3, Sumiko-Hirasawa *et al.* (2008); 4, O-thong *et al.*, (2009); 5, Maintinguer *et al.* (2008); 6, Yu *et al.* (2005); 7, Krakat *et al.* (2010).

Algunas técnicas se basan en la clonación y la secuenciación de genes que codifican al RNA ribosomal 16S (Fig. 5). Además existen otras técnicas basadas en huellas moleculares (molecular fingerprinting) que pueden ser utilizadas para comparar las comunidades microbianas de diferentes ambientes o para seguir el comportamiento de una comunidad a través del tiempo (Muyzer *et al.*, 1993). Entre ellas se encuentran la electroforesis en gel con gradiente químico desnaturizante (DGGE), la electroforesis en gel con gradiente térmico desnaturizante (TGGE), polimorfismo de longitud del fragmento de restricción terminal y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (Fischer & Lerman, 1979; Song *et al.*, 2010). Otra de las técnicas más usadas para identificar una especie, género, familia o dominio microbiano es la hibridación fluorescente *in situ* (Sanz & Kögling, 2007). Esta técnica se basa en el uso de sondas con un marcador

fluorescente que se unen o hibridan a los rRNA de los ribosomas de una célula, haciéndolos fluorescentes y por tanto visibles en un microscopio de fluorescencia (Madigan *et al.*, 2009).

Cabe señalar que estas técnicas son complementarias entre sí. Mientras algunas ofrecen información sobre cuáles o qué tipos de microorganismos se encuentran presentes, otras permiten conocer la abundancia de ciertas especies en particular. Hasta el momento no hay una técnica única para el análisis completo, cualitativo y cuantitativo, de comunidades bacterianas, sino más bien se elige una combinación de ellas para explicar de la mejor manera lo que está sucediendo en el sistema microbiano estudiado.

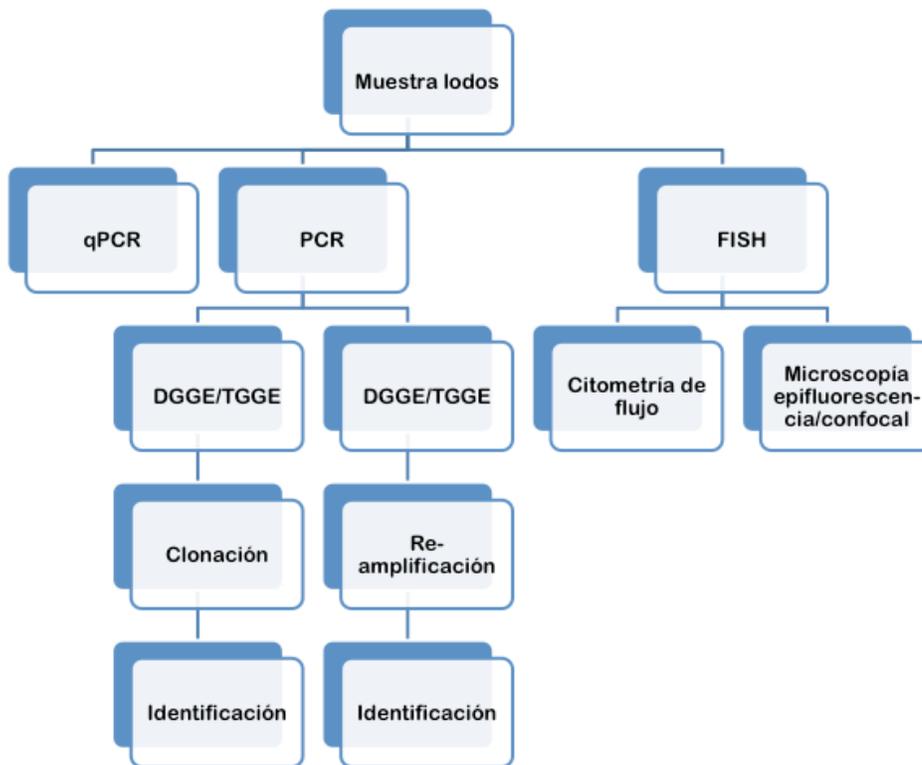


Fig. 5. Estrategias para la identificación o seguimientos de comunidades microbianas

1.1.4. Biomasa para la producción de biocombustibles

Los biocombustibles son productos de la conversión de la biomasa en compuestos con alto poder calórico que sirvan como carburantes en los motores y máquinas térmicas para realizar un trabajo.

Cada año cerca de 170 mil millones de toneladas de biomasa son producidas por la naturaleza, de los cuales sólo 6 mil millones de toneladas (el 3.5 % del total) son utilizados por la humanidad. De éstas, aproximadamente cerca de dos tercios se usan para alimentos, alrededor de un tercio es para la energía, papel, muebles y construcción, y sólo el 5% (300 millones de toneladas) son utilizados para otros fines no alimentarios, tales como productos químicos y prendas de vestir (Navia & Mohanty, 2012).

Los biocombustibles de primera generación se caracterizan por ser obtenidos a partir de cultivos agrícolas, como la caña de azúcar, soya y el maíz (Demirbas, 2008). La producción de estos biocombustibles es cuestionada sobre su rendimiento energético, ya que en su siembra, cultivo y cosecha se requieren cantidades extensivas de energía; además del problema ético que surge del desvío de recursos que pudieran transformarse en alimentos en un mundo con déficit de éstos (ETC, 2010; Melamu & Blottnitz, 2011). Debido a esto surgen como alternativa los biocombustibles de segunda generación que utilizan la biomasa celulósica proveniente de los residuos de las cosechas agrícolas (e.g. bagazo de caña, rastrojo de maíz, paja de trigo), de pastos perennes y de la fracción orgánica de los residuos sólidos orgánicos (Keshwani & Cheng, 2009).

Los residuos orgánicos tienen un potencial de uso muy importante para los procesos biotecnológicos. Aproximadamente cada habitante en México genera 1 kg al día de RSM, esto es 37.5 millones de toneladas al año. Por las características de consumo de la población mexicana (INEGI, 2009), el 50 – 60 % de los RSM los constituyen la fracción o residuos orgánicos, mejor conocidos como la FORSU, que incluyen desechos de vegetales, frutas, carne putrefacta, pasto, papel, cartón, etc. (Li *et al.*, 2007).

1.2. Producción enzimática a partir de residuos orgánicos

Las enzimas forman parte de un grupo de bioproductos de gran interés industrial. La importancia de las enzimas radica en su especificidad, ya que cada enzima sólo actúa sobre un determinado tipo de moléculas. Actualmente sólo es posible obtenerlas a partir de seres vivos, *i.e.* microorganismos, plantas y animales, por lo que los procesos de producción suelen ser complejos. Dos tipos de enzimas de interés son las celulasas y las xilanasas, las cuáles son utilizadas para convertir los materiales celulósicos en sus azúcares constituyentes para éstos posteriormente ser transformados en otros bioproductos (Zhang *et al.*, 2006).

1.2.1. Mecanismo de acción de las celulasas

Las celulasas son enzimas que tienen aplicación ya sea en la industria textil para el suavizado y "desgastado" del algodón, como quita pelusa en los detergentes, en la industria de pulpa de papel para el destintado y modificado de fibras, y en la industria alimentaria y de bebidas fermentadas como medio de obtención de azúcares (Kirk *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

Por celulasas entendemos a las β -1,4 exoglucanasas, β -1,4 endoglucanasas y β -glucosidasas, que actúan sinérgicamente como complejo en presencia del sustrato celulósico (Knowles *et al.*, 1987; Lynd *et al.*, 2002).

La hidrólisis de la celulosa comienza con una hidrólisis interna aleatoria por la endoglucanasa que rompe los enlaces y libera oligómeros con nuevos extremos accesibles a las exocelulasas. Esto también solubiliza el sustrato mediante la reducción de puentes de hidrógeno intracadenas. La celobiohidrolasa hidroliza el extremo no reductor de la celulosa y genera celobiosa junto con algunos oligosacáridos un poco más grandes. Finalmente la β -glucosidasa completa el proceso de ruptura al generar glucosa de la celobiosa.

Las celulasas no sólo son inducidas por la celulosa y sus hidrolizados, los celuloooligómeros, sino también por ciertos azúcares de bajo peso molecular que puedan penetrar la membrana celular como la lactosa y sofrosa (Lo *et al.*, 2008). Sin embargo, también la producción de las celulasas puede ser reprimida o su actividad inhibida por

productos de la hidrólisis. Las regulaciones de retroalimentación permiten a los organismos conservar la energía cuando la glucosa está presente (Chandel *et al.*, 2012). La represión por producto final de glucosa es especialmente difícil de controlar en procesos en lote convencionales. Esto se debe a que la concentración de glucosa depende del balance dinámico entre las velocidades de generación de glucosa (hidrólisis de celulosa) y el consumo microbiano. A bajas concentraciones de celulasa y/o celulosa, la generación de glucosa puede ser muy lenta para cumplir con las necesidades celulares de crecimiento y operación. Por otro lado, cuando el sustrato se produce más rápido que lo que se consume, entonces la síntesis de celulasa puede ser inhibida. La represión por producto puede ser disminuida por procesos en lote alimentado, los cuales han demostrado mejorar las productividades de celulasas (Tahezadeh *et al.*, 2000).

1.2.2. Mecanismo de acción de las xilanasas

Como xilanasas se incluyen β -1,4 endoxilanasas, β -xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas y acetil xilan esterases (Beg, 2001). Estas enzimas actúan conjuntamente para degradar la xilana en sus constituyentes principales. Su aplicación tiene lugar en el pre blanqueamiento de la pasta del papel, como aditivo para mejorar la digestibilidad del alimento de herbívoros, para mejorar las características del moldeo de la masa para pan, para la extracción de aceites vegetales y como clarificador de jugos (Kirk *et al.*, 2002).

1.2.3. Microorganismos productores de celulasas y xilanasas

En el mundo microbiano una gran variedad de microorganismos pueden producir celulasas y xilanasas (Reczey *et al.*, 1996; Lynd *et al.*, 2002), entre los que se encuentran bacterias aerobias (e.g. Actinomicetales) y anaerobias (e.g. Clostridiales), hongos de la podredumbre blanca, café y suave (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*), así como hongos anaerobios y hongos primitivos (e.g. *Chytridomycetes*).

En la Tabla 4 se enlistan algunos de los microorganismos más estudiados para la producción en laboratorio o industrial de celulasas y hemicelulasas, entre los que se encuentran la bacteria aerobia *Cellulomonas flavigena* (Stackebrandt *et al.*, 2006), la bacteria anaerobia *Clostridium thermocellum* (Johnson *et al.*, 1982; Lynd *et al.*, 2002) y el

hongo aerobio *Trichoderma reesei* (Esterbauer et al., 1991).

Tabla 4. Diversidad de microorganismos celulolíticos (adaptada de Lynd et al., 2006)

Ambiente	Género	Especies representativas	Temperatura de crecimiento
Aerobio	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilis</i>	Mesofílica
	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. flavigena</i> , <i>C. uda</i>	Mesofílica
	<i>Thermobifida</i>	<i>T. fusca</i>	Termofílica
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	Mesofílica
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. aculeatus</i> , <i>A. niger</i>	Mesofílica
	<i>Phanerochaete</i>	<i>P. chrysosporium</i>	Mesofílica
Anaerobio	<i>Acetivibrio</i>	<i>A. cellulolyticus</i>	Mesofílica
	<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i> , <i>C. cellulolyticum</i>	Termofílica, Mesofílica

Otro de los microorganismos de importancia es *Phanerochaete chrysosporium*, que ha sido usado como organismo modelo para la degradación de la lignocelulosa (Lynd et al., 2002). *P. chrysosporium* produce arreglos complejos de celulasas, hemicelulasas y ligninasas para los tres principales componentes de las paredes celulares: la celulosa, hemicelulosa y lignina.

1.2.3.1. *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei es un ascomiceto de la podredumbre café de la madera que ha sido estudiado por más de 50 años como productor de celulasas. *T. reesei* presenta morfología micelial y se considera un teleomorfo, o estadio reproductivo sexual, de *Hypocrea jecorina* (Whittaker, 1978). El potencial biotecnológico de algunas especies de *Trichoderma* no se limita sólo a la producción de celulasas, sino que también pueden ser utilizadas como control biológicos de plagas como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizotocnia solani*, *Fusarium graminearum* (Harman et al., 1989; Chet et al., 1993).

T. reesei es capaz de crecer en celulosa, hemicelulosa, glicerol, glucosa, soforosa, xilosa y lactosa (Dekker, 1983). Las pequeñas moléculas como glucosa y glicerol pueden atravesar fácilmente su membrana celular y ser directamente metabolizadas como fuente de carbono y energía. En cambio, otros disacáridos y polisacáridos no pueden ser tomados directamente por las células sin antes ser alterados o convertidos en moléculas

más pequeñas, como la glucosa o la galactosa (Lo, 2008).

El sistema celulolítico de *T. reesei* está compuesto por al menos dos exoglucanasas (CBH1, CBH2), cinco endoglucanasas (EGL1, EGL2, EGL3, EGL4 y EGL5) y dos β -glucosidasas (BGL1, BGL2) (Reczey *et al.*, 1996; Lynd, 2002). Las exoglucanasas, o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), de los tipos CBH1 y CBH2 atacan ambos extremos en las cadenas de polisacáridos. Típicamente conforman el 80 % del total de celulasas producidas por *T. reesei*. Estas exoglucanasas tienen dos dominios funcionales, un dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa que están conectados entre sí por un péptido de unión. La CBH1 ataca los extremos reductores de la celulosa, mientras CBH2 los no reductores (Lynd *et al.*, 2002).

Las β -glucosidasas se encargan de reducir los disacáridos y trisacáridos como la celobiosa o la celotriosa hasta glucosa. Se ha sugerido que la presencia de múltiples copias del gen *bgl1* en transformantes de *T. reesei* RUT C30 incrementa la velocidad de hidrólisis de celulosa, por lo que el paso limitante de hidrólisis de celulosa está limitado por la cantidad de la proteína BGL1 (Lo, 2008). El tipo BGL1 se ha encontrado extracelular, mientras que BGL2 de alrededor 50 kDa se ubica intracelularmente, pero no unida a membrana (Saloheimo *et al.*, 2002).

Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4, EGL1, EGL2, EGL3, EGL4 y EGL5) rompen los enlaces β -1,4-glicosídicos de manera aleatoria. Son enzimas de amplio espectro, que pueden hidrolizar un amplio rango de materiales celulósicos, tales como celulosa, hemicelulosa y carboximetilcelulosa. Aunque las endoglucanasas tienen estructura similar a las exoglucanasas, se diferencian en que poseen más de un sitio catalítico abierto, por lo que pueden actuar más fácilmente en diferentes lugares de la cadena de celulosa. En comparación, las CBHs presentan su sitio catalítico en forma de túnel, lo que restringe el tamaño de la molécula que pueden hidrolizar, siendo ésta principalmente de dos a tres unidades de glucosa, i.e. celobiosa y celotriosa (Lo, 2008).

Sólo las EGL3 y BGL1, de entre todas las celulasas, carecen de una estructura modular y de un sitio de unión a celulosa (Penttilä *et al.*, 1986). Sólo EGL3 y EGL5 tienen menores pesos moleculares, de 25 y 23 kDa respectivamente, e hidrolizan papel filtro, carboximetilcelulosa pero no Avicel. Además, EGL4, de 56 kDa, está regulado por CRE1, una proteína represora; y al igual que CBH1, EGL1 y EGL5, tiene dos sitios de unión a

celulosa en el C-terminal (Saloheimo *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2008).

La inducción de las celulasas se ha observado en presencia de celulosa, celobiosa, lactosa o soforosa. Por otro lado, ni la glucosa ni la galactosa pueden inducir las celulasas. Se ha sugerido que la inducción por la celulosa podría venir de la soforosa derivada de la transglicosilación de la celobiosa o la glucosa, realizada por la β -glucosidasa (Lo *et al.*, 2008). De hecho la soforosa tiene un poder de inducción muy alto pues propicia actividad de celulasas en concentraciones muy bajas de carbohidratos (Mandels *et al.* 1962; Sternberg & Mandels, 1979). Sin embargo, los niveles enzimáticos producidos en soforosa son menores que los niveles en celulosa purificada (Persson *et al.*, 1991). Además su alto costo limita su aplicación más extensiva, por lo que en muchos casos se prefiere a la lactosa como inductor, ya que aunque tiene menor poder inductivo, es mucho más económica.

La producción enzimática se puede realizar en cultivo por lote, lote alimentado e incluso semi-continuo. Debido a su alimentación progresiva, el cultivo por lote alimentado ha sido reportado como una alternativa cuando la generación del producto depende de un adecuado control de la concentración del sustrato. De cierta forma, evita los problemas de agitación y transferencia de oxígeno que sucederían en un cultivo en lote cargado con la misma cantidad total del sustrato que se alimentaría en un reactor por lote alimentado (Persson *et al.*, 1991).

1.2.3.2. Mutación de microorganismos

T. reesei han sido sometida a mutagénesis química con el objetivo de obtener cepas con mayor capacidad para producir y excretar enzimas, con mayor actividad específica y resistentes a altas concentraciones de inhibidores (Esterbauer *et al.*, 1991; Ponce-Noyola & de la Torre, 1995; Rojas-Rejón *et al.*, 2011).

T. reesei QM 6a fue aislado en los laboratorios militares de Natick en los E.E.U.U., y a partir de esta cepa se han obtenido una gran variedad de mutantes entre las que se encuentra MCG 80 (Giraud, 1987). A partir de la cepa madre QM 6a se obtuvo la cepa Rut M7, de ésta la Rut NG 14 y de ésta la Rut C30, a partir de la cual se obtuvo la MCG 80 (Esterbauer *et al.*, 1991). La cepa MCG 80 en cultivo sumergido en reactor con Solka floc BW 200 como sustrato a 80 g/L, presenta productividades de 148 FPU/L/h y una

concentración de 17.2 FPU/mL. Además, está reportado que *T. reesei* MCG 80 empieza a producir enzimas celulolíticas más temprano comparado con *T. reesei* Rut C30, lo que acorta por lo tanto los tiempos de operación en lote (Esterbauer *et al.*, 1991).

1.2.4. Fuentes de carbono

Las características como cristalinidad y área específica de superficie del material celulósico son importantes para la inducción de celulasas. El área específica de superficie se relaciona con la forma y tamaño del poro y partícula del material celulósico (Grethlein, 1985). La región cristalina es más difícil de ser hidrolizada que las regiones amorfas y la velocidad total de hidrólisis de celulosa depende de la cantidad de éstas en la celulosa (Coughlan, 1992).

Se ha estimado que la fuente de carbono constituye uno de los principales costos de producción de las celulasas (Reczey *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 2005). Por esto se ha propuesto el uso de residuos lignocelulósicos (Tabla 5) como el bagazo de caña (Kawamori *et al.*, 1986; Rojas-Rejón *et al.*, 2007), paja de trigo (Chahal, 1985), rastrojo de maíz (Juhász *et al.*, 2005), madera de sauce (Reczey *et al.*, 1996) y pasta de álamo (Chahal, 1985), entre otros, como una alternativa para reducir costos. También se han probado sustratos parcialmente degradados como madera de sauce enzimáticamente hidrolizada (Hogan & Mes-Hartree, 1990; Reczey *et al.*, 1996), FORSU digerida de un proceso H-M (Escamilla-Alvarado, 2009) y excreta de vaca (Wen *et al.*, 2005).

Tabla 5. Actividades xilanolíticas y celulolíticas de hongos y bacterias en residuos lignocelulósicos

Cepa y tipo de cultivo ^a	Sustrato	Proceso y biorreactor	Resultados ^b	Observaciones	Ref
<i>Cellulomonas flavigena</i> silvestre CDBB-531, FCS	1 %p/v bagazo de caña	Lote, fermentador 750 mL capacidad	X ^c : 2.3 UI/mL C ^d : 0.98 UI/mL	150 rpm, 37 °C, 0.5 vvm, 2 d	1
<i>Cellulomonas flavigena</i> PN120, FCS	1 %p/v bagazo de caña	Lote, fermentador 750 mL capacidad	X:10.25 UI/mL C: 0.87 UI/mL	150 rpm, 37 °C, 0.5 vvm, 2 d	1
<i>Thermomyces lanuginosus</i> FCS	3.12 %p/v olote de maíz	Lote, matraces 300 mL capacidad	X: 2,171 UI/mL	150 rpm, 50 °C, 7 d,	2
<i>Cellulomonas flavigena</i> PR22 FCS	1 %p/v bagazo de caña	Lote, fermentadores 400 mL capacidad	X:21.7 UI/mL C:1.63 UI/mL	400 rpm, 37 °C, 1 vvm, 2d	3
<i>Aspergillus fischeri</i> Fxn1 FSS	Fibra de trigo ca. 65 % humedad	Lote, matraces 500 mL capacidad	X: 1,024 UI/gss	30 °C, 3d pH = 9.0	4
<i>Myceliophthora</i> sp. FSS	Cáscara de arroz 80 % humedad	Lote, matraces 250 mL capacidad	X: 2,145 UI/gss C: 41.4 UI/g _{bs}	45 °C, 5d pH = 6.0	5
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> FSS	Fibra de trigo 55 % humedad		X: 716 UI/gss	5 d	6
<i>Bacillus pumilus</i> ASH FSS	Fibra de trigo 71 % humedad	Lote, matraces 250 mL capacidad	X: 6,378 U/gss	37 °C, 72 h	7
<i>Bacillus</i> sp.	Fibra de trigo 60 % humedad	Lote, matraces 250 mL capacidad	X: 621.3 U/gss C: 12.5 U/gss	37 °C, 72 h	8
<i>Cellulomonas flavigena</i> PR22 FCS	1 %p/p FORSU	Lote, Fermentador 500 mL capacidad	X:3,900 UI/ghol C:420 UI/ghol	37 °C, 48 h pH = 7.0, 1 vvm	9
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 FSS	Bagazo de caña 70 % humedad	Lote, matraces 3 g sustrato	F: 25.6 U/g _{bs}	33 °C, 67 h pH = 5	10

<i>Trichoderma reesei</i> QMY-1 FSS	Paja de trigo 80% humedad	Lote, matraces 5 g sustrato	F ^e : 17.2 UI/mL B ^f : 21.2 UI/mL X: 540 UI/mL	30 °C, 11-22 d pH = 5.8	11
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 FSS	Desecho de horticultura 80% humedad	Lote, matraces 5 g sustrato	F: 15.2 U/g _{bs} B: 61.6 U/mL C: 90.5 U/g _{bs} X: 52.1 U/g _{bs}	30 °C, 7 d pH = 5.0	12
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 FCS	Estiércol 10 g/L	Lote, matraz 175 rpm	F: 1.74 UI/mL C: 12.22 UI/mL B: 0.0978 UI/mL	25 °C, 5 – 8 d, pH = 5.7	13
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 FCS	Desecho sólido municipal 2-8 % TS	Fermentador 1.5L lote alimentado, 150 rpm	F: 1.5 UI/mL	30 °C, pH = 4.8	14
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 FCS	Sauce pretratado con vapor (10 – 30 g celulosa/L)	Fermentador 4 L lote, 350 rpm	F: 1 UI/mL @10 g/L, 2.8 UI/mL @30 g/L	30 °C, pH > 4.4, 0.5 vvm	15
<i>Trichoderma reesei</i> MCG77 FCS	Paja de trigo pretratada con vapor e hidrolizada	Fermentador 4 L lote, 300 rpm	F: 2.4 UI/ml B: 1.55 IU/ml	30 °C, pH = 6, 0.25 – 0.5 vvm	16

Notas: ^aCondiciones de cultivo están dadas como FCS: fermentación en cultivo sumergido; FSS: Fermentación en sustrato sólido. ^bResultados están proporcionados en UI/mL o nkatal/mL: actividad volumétrica; UI/g_{bs}: UI por gramo sustrato seco; ^c actividad xilanólítica; ^d actividad celulolítica; ^e actividad de papel filtro; ^f B-glucosidasa.

Referencias: 1. Ponce-Noyola & de la Torre (1995); 2. Purkarthofer *et al.* (1993); 3. Rojas-Rejón *et al.* (2007); 4. Senthilkumar *et al.* (2005); 5. Badhan *et al.* (2007); 6. Ridder *et al.* (1998); 7. Battan (2006); 8. Gessesse y Mamo (1999); 9. Escamilla-Alvarado (2009); 10. Kumar *et al.* (2008); 11. Chahal (1985); 12. Xin & Geng (2010); 13. Wen & Chen (2010); 14. Silva *et al.* (1995); 15. Reczey *et al.* (1996); 16. Doppelbauer *et al.* (1987).

Sin embargo, los sustratos complejos tienen como inconveniente la menor accesibilidad a la celulosa y la posible formación de compuestos inhibitorios; que por consiguiente pueden limitar la producción de enzimas. Por esto, para mejorar la producción enzimática se puede hacer uso de métodos químicos, físicos o incluso biológicos que incrementen el área específica de superficie del sustrato, reduzcan el nivel de cristalinidad de la celulosa o mejoren la accesibilidad a la holocelulosa (Lo, 2008).

1.3. Sacarificación de la biomasa

La sacarificación es la despolimerización de los carbohidratos de las paredes celulares vegetales en azúcares simples (Chandel *et al.*, 2012). Una de las aplicaciones más comunes de los sacarificados es como fuente de carbono para otros microorganismos para su fermentación en solventes y ácidos orgánicos como etanol, butanol, ácido láctico, etc. La sacarificación se puede aplicar a sustratos vegetales complejos como los materiales celulósicos, lignocelulósicos y almidones. La sacarificación de los almidones es común en la producción de alcoholes a partir de granos como la cebada y el arroz (Reddy *et al.*, 2008).

La sacarificación de la biomasa vegetal se realiza comúnmente por hidrólisis enzimática o de ácido diluido. La hidrólisis ácida ha sido ampliamente aplicada para convertir azúcares poliméricos en sus unidades monoméricas. Tiene un tiempo de proceso corto (en promedio menor a una 1 h), con un rendimiento alto (> 85 %), pero opera a temperaturas altas (180 a 200 °C). La hidrólisis ácida conlleva la formación de furanos entre otros compuestos que necesitan procesos de destoxificación previos a la fermentación de los azúcares. Estos procesos de destoxificación son por lo general costosos y complicados (Fatehi, 2013). En la hidrólisis enzimática es común utilizar extractos enzimáticos de especies como *T. reesei*, *Clostridium thermocellum* y *Cellulomonas flavigena*, para lograr la sacarificación de la biomasa (Adney *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2007; Rojas-Rejon *et al.*, 2011). Por lo general se requieren condiciones de operación menos severas que la hidrólisis ácida, pero tiempos de reacción más largos. El alto costo de las enzimas como las glucosil hidrolasas, que catalizan la hidrólisis de la celulosa, es una barrera para la comercialización de estos procesos de hidrólisis, ya que se consumen grandes cantidades de enzima debido a su inhibición (Nguyen *et al.*, 1999). Por ejemplo, se calcula que por cada galón de etanol celulósico se requieren de 100 a 200 g de celulasas (Fatehi, 2013). Por lo anterior, se han buscado pretratamientos que incrementen los rendimientos de sacarificación en base enzima utilizada.

1.3.1. Pretratamientos para la sacarificación de la biomasa

Los pretratamientos de sacarificación pueden reducir la cristalinidad de la celulosa, liberarla de la cubierta de lignina y hemicelulosa, o incrementar la porosidad del material para incrementar las eficiencias de sacarificación del sustrato. Un pretratamiento exitoso debe cumplir al menos con algunos de los siguientes requerimientos: (i) incrementar la formación de azúcares *in situ* o en una subsecuente hidrólisis enzimática, (ii) evitar la degradación y pérdida de carbohidratos, (iii) evitar la formación de subproductos inhibidores de la hidrólisis posterior y fermentación, y (iv) ser económico (Sun & Cheng, 2002). Los pretratamientos incluyen procesos físicos, físico-químicos y biológicos. Los aspectos más importantes de algunos de los pretratamientos más comunes se muestran en la Tabla 6. La aplicación de estos pretratamientos varía con el sustrato lignocelulósico que se desea sacarificar, que se puede clasificar como maderas duras (gimnoespermas, o árboles que tienen la semilla del árbol expuesta como el abeto, pino y cedro), maderas blandas (angiospermas, o árboles que tienen su semilla recubierta, como el roble, olmo y abedul), residuos agrícolas, residuos sólidos municipales o pastizales (Hendriks & Zeeman, 2009).

Tabla 6. Métodos de pretratamientos para sacarificación

Pretratamiento	Condiciones típicas	Ventajas (+) y desventajas (-)	Aplicación
Molido vibratorio con bolas		+ Disminuye cristalinidad de la celulosa - Gasto energético exorbitante	
Pirólisis	1N H ₂ SO ₄ , 97 °C, 2.5 h.	- Puede ser mejorado con la presencia de oxígeno	
Explosión de vapor	160-260 °C (0.69 – 4.83 MPa), 1-10 min. Adición opcional de H ₂ SO ₄ como catalizador.	+ Menor consumo de energía + Sin costos ambientales y de reciclado - Menos efectivo en maderas suaves - Destrucción de una porción de la xilana - Generación de productos inhibitorios - Pérdida de azúcares (xilosas) solubles por lavado	Maderas duras (álamo) y residuos agrícolas, residuos municipales.
Explosión con amoníaco	1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca, 90 °C, 30 min.	+ No solubiliza la hemicelulosa + No requiere pequeños tamaños de partícula + No produce sustancias inhibitorias + No son necesarios lavados con agua + No requiere tamaños de partícula pequeños - Reciclaje de amoníaco necesario	Alfalfa, paja, rastrojo, RSM, papel periódico de madera suave, bagazo.

		<ul style="list-style-type: none"> - No es efectivo con biomasa con alto contenido de lignina (e.g. papel periódico y astillas) - Proceso caro, principalmente por el amoniaco 	
Explosión con CO ₂		<ul style="list-style-type: none"> + Más económico que otros procesos + No origina compuestos inhibitorios - Bajos rendimientos comparados con otras técnicas, pero mejores que los experimentos sin tratamientos - No modifica la lignina 	Alfalfa, mezcla de papel reciclado, bagazo.
Ozonólisis	25-40 °C, 15 min.	<ul style="list-style-type: none"> + No produce residuos tóxicos + Disminuye grado de polimerización de celulosa + La reacción se realiza a temperatura y presión ambiente · Degrada efectivamente lignina y hemicelulosa - Caro 	Paja de trigo, bagazo, heno verde, cacahuete, fibra de algodón, aserrín de álamo.
Hidrólisis ácida diluida	HCl, H ₂ SO ₄ , HNO ₃ o H ₃ PO ₄ @ 0.2 – 2.5 % p/p T > 160 °C, flujo continuo, ST 5-10 %p/p T < 160 °C, lote, ST 10-40 %p/p.	<ul style="list-style-type: none"> + Efectivo para la hidrólisis de celulosa + Alcanza altas conversiones de xilana a xilosa (solubilización de hemicelulosa) · Requiere recuperación de ácidos - Convierte la xilosa a furfural - Costo más alto que explosión con vapor y AFEX - Requiere neutralización de pH para efluentes 	
Hidrólisis alcalina	NaOH, KOH, Ca(OH) ₂ , cal o NH ₄ OH @ 1.5 % T = ambiente, 144 h.	<ul style="list-style-type: none"> + Incrementa área superficial interna, disminuye en el grado de polimerización + Disminuye la cristalinidad + Separa uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos - Se forman sales irre recuperables 	Maderas duras con contenido de lignina 24-55%. Maderas suaves contenido de lignina menor a 26%. Pajas con contenido de lignina 10-18 %.
Delignificación oxidativa	2 % H ₂ O ₂ , 30 °C, 8 h. Adición de peroxidasa opcional.	<ul style="list-style-type: none"> + Mejora la producción de glucosa en postratamiento · Solubilización de hemicelulosa - Solubilización de lignina 	
Proceso organosolv	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etc.), H ₂ SO ₄ o HCl, ácidos orgánicos oxálico, acetilsalicílico y salicílico.	<ul style="list-style-type: none"> · Rompe enlaces internos de lignina y hemicelulosa · Solubiliza lignina · Reciclaje de solventes - Lavado necesario 	
Pretratamiento biológico	Lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, polifenol oxidasa, lacasas.	<ul style="list-style-type: none"> + Bajos requerimientos de energía + Condiciones ambientales medias - Velocidad de hidrólisis lenta 	
Líquidos iónicos	Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, 1,3-N-metilmorfolina-N-óxido.	<ul style="list-style-type: none"> + Solubiliza la celulosa + Altos rendimientos · Reciclaje por cromatografía de intercambio iónico - Costoso 	

Notas: Basado en Sun & Cheng (2002); Wright (1988); Menon & Rao (2012).

1.3.2. Procesos de sacarificación de residuos orgánicos

Los residuos agrícolas, como la paja de trigo o el bagazo de caña, han sido ampliamente utilizados para la producción de azúcares fermentables (Tabla 7). Su principal ventaja es su homogeneidad, pero presentan inconvenientes como los costos de su recolección, disponibilidad variable de acuerdo a las estaciones, alta cristalinidad y altos contenidos de lignina (Clanet *et al.*, 1988). Por el contrario, los residuos orgánicos municipales son abundantes a lo largo del año y una gran parte de la fracción de celulosa presente en éstos es susceptible de hidrólisis sin pretratamiento, sin embargo suelen ser heterogéneos en su composición (Vavouraki *et al.*, 2013).

Para los residuos orgánicos municipales, sin el uso de pretratamientos se pueden lograr eficiencias de sacarificación cercanas al 50 % (Clanet *et al.*, 1988), pero haciendo uso de pretratamientos ácido diluido y térmicos se han alcanzado eficiencias cercanas al 80 % (Nguyen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2007).

Tabla 7. Procesos de sacarificación de residuos orgánicos

Sustrato	Pretratamiento	Sistema enzimático	Rendimiento	Ref
FORSU 20 %ST	Térmico (160 °C, 30 min)	Celulasa (NS50013) y β -glucosidasa (NS50010)	$\eta_{s,SV}^b = 41.6 \%$ 35 g glucosa/L	1
Residuos de cocina 1 %ST	Termoquímico (1.5% HCl, 120 °C, 120 min)	NU	$\eta_{s,SV} = 57.3 \%$	2
FORSU 6 %ST	NU ^a	Extracto de <i>Trichoderma reesei</i> CL847 a 9 FPU/g sustrato	$\eta_{s,SV} = 48 \%$	3
Bagazo 5 % ST	Molino de bolas	<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	$\eta_{s,SV} = 50.4 \%$	4
RSM 1 % ST	Ácido (H ₂ SO ₄ 1% v/v, 3 h, 60 °C)+ térmico (120 °C, 15 min)	<i>Trichoderma viride</i> a 60 FPU/g	$\eta_{s,bcel}^c = 72.8 \%$	5
Desechos sólidos mixtos 2.7 %ST	Ácido (H ₂ SO ₄ 0.4% v/v, 3 h, 60 °C)+ explosión de vapor (210 °C, 3 min)	Celulasas a 66 FPU/g celulosa	$\eta_{s,bcel} = 80 \%$	6
Tallos molidos de algodón 10 %ST	Ozono (45 mg O ₃ /L burbujeado a 0.37 L/min, 150 min)	Celulasa a 20 FPU/g, β -glucosidasa a 45 IU/g y pectinasa a 15 IU/g	$\eta_{s,SV} = 43.1 \%$	7

Notas: ^a no utilizado, ^b eficiencia de sacarificación en base SV, ^c eficiencia de sacarificación en base celulosa

Referencias: 1, Ballesteros *et al.* (2010); 2, Vavouraki *et al.* (2013); 3, Clanet *et al.* (1988); 4, Mandels *et al.* (1974); 5, Li *et al.* (2007); 6, Nguyen *et al.* (1999); 7, Kaur *et al.* (2012).

1.4. Evaluación de sistemas: recursos-energía-productos-desechos (ES-Reprode)

Como parte de los acuerdos del Panel Intergubernamental del Cambio Climático de Copenhague (IPCC, 2009), México se comprometió a reducir anualmente 50 millones de toneladas de emisiones de dióxido de carbono equivalente para el 2012, y una reducción del 30 % de GEI para el 2020 (Semarnat, 2009). Para lograr esto es necesaria la implementación de nuevas tecnologías y el desarrollo de procesos más limpios. El uso de la biomasa en la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como reemplazo de los combustibles fósiles presenta una oportunidad para contribuir al logro de este objetivo.

La evaluación de ciclo de vida (LCA por sus siglas en inglés) es un conjunto de protocolos y metodologías para la evaluación de la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) basados, por ejemplo, en el Protocolo para la Cuantificación de Gases de Efecto Invernadero para las Actividades de Manejo de Residuos (EpE, 2007), las directrices del IPCC (2006) y las ISO 14040 y 14044 (ISO, 2006a y 2006b).

1.4.1. Evaluación de ciclo de vida (LCA)

La LCA es una metodología para la evaluación de impactos ambientales y consumo de recursos durante la prestación de servicios o generación de productos. Se incluyen por lo tanto la identificación de la energía y los materiales utilizados, así como los desechos y las emisiones liberadas al ambiente (Cherubini *et al.*, 2009).

La Organización Internacional de Estandarización (ISO, 2006a) ha fijado los criterios para la LCA, de tal forma que los productos y servicios pudieran ser evaluados adecuada y sistemáticamente en sus aspectos ambientales desde su extracción como materia prima hasta su disposición final, procedimiento también conocido como "de la cuna a la tumba".

La realización de una LCA se enfoca en al menos tres grupos principales, o áreas de protección: salud humana, medio ambiente y recursos naturales (Kirkeby, 2005). De acuerdo a los estándares ISO (2006a), una LCA tiene cuatro fases (Fig. 6):

1. Definición de un objetivo y alcance. Se establecen los objetivos, unidades funcionales, límites y requerimientos de información
2. Análisis de inventarios del ciclo de vida. Se identifican los procesos

involucrados, sus entradas y salidas, y se realiza la distribución de información.

3. Evaluación de impacto. Se realiza la asignación de los impactos ambientales y humanos de los procesos y recursos utilizados, así como de los desechos generados, de acuerdo al inventario realizado. Incluye a su vez cuatro etapas: clasificación, caracterización, normalización y valuación.
4. Interpretación. Se refiere a un proceso iterativo del proceso de revisión y modificación del objetivo, alcance, inventarios e impactos, hasta que se puedan elaborar conclusiones y recomendaciones con base en un análisis de sensibilidad e incertidumbre.

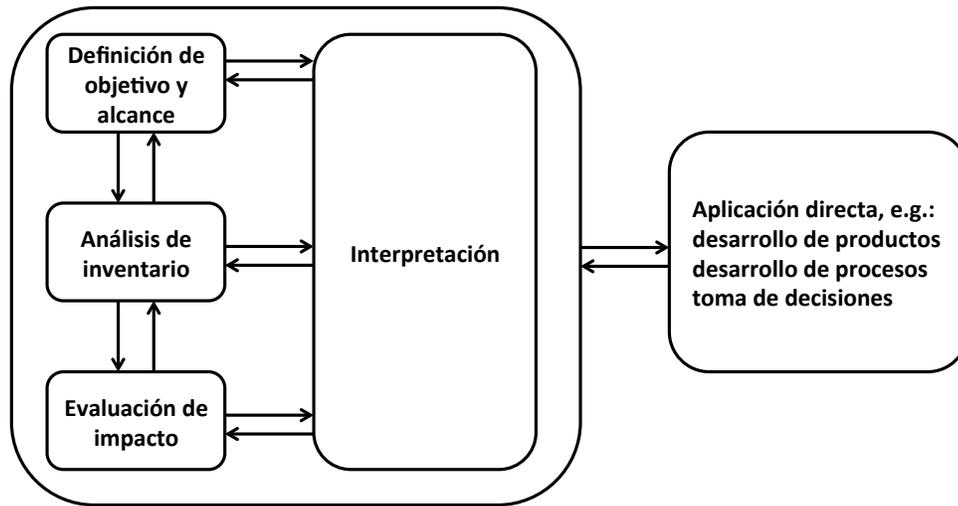


Fig. 6. Esquema de un LCA (ISO, 2006).

Con respecto a la fase 1, después de establecer el objetivo y el alcance, se debe especificar la unidad funcional, que permitirá hacer justas comparaciones al hacer uso siempre de la misma unidad (Damgaard, 2010). En el caso de la gestión de residuos, la unidad podría ser por ejemplo, el tratamiento de una tonelada de desecho, el tratamiento de todo el desecho en una área durante un año, etc. Cuando se especifica la unidad funcional, es importante declarar si existe cualquier importancia espacial para la región o área de estudio cuando se aplica el paso de impacto. De forma similar es importante establecer el horizonte de tiempo que abarca el estudio, por cuanto tiempo se estudiarán

las emisiones y que pasa con las sustancias remanentes después de dicho periodo. Adicionalmente, se necesita establecer qué fronteras se utilizaran y qué se ha incluido y qué se ha excluido. Dichas fronteras deben considerar el proceso técnico y ambiental del estudio, además otros sistemas, ya sea corriente abajo, arriba o incluso el sistema de energía.

El análisis de inventario es la segunda fase, donde todas las emisiones al ambiente, producción y uso de energía y de recursos, son detalladas (Damgaard, 2010). Posteriormente, este inventario es usado en el tercer paso, la evaluación de impacto.

En la fase tres, los impactos potenciales son evaluados en función de las propiedades de las sustancias emitidas, su cantidad y su disposición final (Pennington et al., 2004). Los resultados de la evaluación de impacto pueden ser proporcionados directamente en forma de la sustancia de referencia para cada impacto (e.g. equivalentes de CO₂ en kg, para el potencial de calentamiento climático), o normalizados en unidades de "equivalentes de persona", que es la cantidad del impacto dado para todas las actividades acumuladas para una persona promedio en un año (Damgaard, 2010). Específicamente, los impactos ambientales que evalúa un LCA son el potencial de calentamiento climático (equivalentes de CO₂), acidificación (equivalentes de SO₂), eutroficación (equivalentes de NO₃), agotamiento de ozono en la estratósfera (equivalentes de CFC₁₁), formación fotoquímica de ozono (C₂H₄ equivalentes), ecotoxicidad (en suelo, agua o aire), toxicidad para humanos (en suelo, agua o aire) y consumo de recursos (Al, Cu, Fe, carbón, petróleo, gas natural, agua, madera, etc.). En la Tabla 8 se muestra la descripción de estos impactos.

El fin último de la LCA es ayudar en la toma de decisiones desde un punto de vista de impacto ambiental del producto, proceso o servicio en cuestión. Existen otras metodologías similares a la LCA pero que tienen una finalidad diferente, como en los análisis costo-beneficio (ACB). El ACB ha sido utilizado para encontrar la estrategia más óptima respecto a los costos y consecuencias económicas y ambientales. Aunque existen similitudes entre ambas metodologías, como en el establecimiento de los límites y fronteras, en el ACB el propósito es optimizar los beneficios que generalmente se expresan en términos monetarios, mientras que la LCA busca minimizar el impacto potencial sobre el ambiente, salud humana y recursos (Kikerby, 2005). El LCA es una

herramienta que basada en datos experimentales arroja información importante para la toma de decisiones desde un punto de vista ambiental y bajo el esquema de evaluación "de la cuna a la tumba".

Un LCA puede tener diferentes aplicaciones, ya sea para describir un caso de estudio real, para comparar diferentes tecnologías, o para realizar estudios de planeación estratégica, desarrollo de tecnología o monitoreo (Damgaard, 2007).

Tabla 8. Descripción de indicadores de impacto

Impacto (unidad)	Descripción	Contaminantes/recursos
Agotamiento de recursos abióticos (MJ, kg Sb-eq.)	Agotamiento de recursos no-renovables debido a la extracción y consumo de minerales y combustibles fósiles	Gas natural, petróleo, uranio, carbón mineral, agua
Acidificación (kg SO ₂ -eq)	Degradación terrestre y acuática causada por la lluvia ácida	NH ₃ , HCl, NO _x , SO ₂
Eutroficación (kg PO ₄ -eq, kg NO ₃ -eq)	Falta de oxígeno que crea desarrollo de algas en agua o suelos, debido a las elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo	NH ₃ , NO _x , NH ₄ ⁺ , NO ₃ , PO ₄ ³⁻
Efecto invernadero (kg CO ₂ -eq)	Cambio climático y calentamiento global debido a gases que incrementan el efecto invernadero	CO ₂ , CO, CH ₄ , N ₂ O, COVs
Agotamiento del ozono (kg N ₂ O-eq, kg CFC ₁₁ -eq)	Sustancias que contribuyen a cambios en la capa de ozono estratosférico	N ₂ O
Smog de verano/ oxidación fotoquímica (kg C ₂ H ₂ -eq)	Potencial contribución a la creación de ozono fotoquímico	Benceno, hexano, CO, CH ₄ , COVs
Ecotoxicidad (-)	Sustancias tóxicas que afectan el ambiente	Benceno, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Zn, HAPs, DEHP
Toxicidad humana vía agua, suelo, aire y plantas (-)	Sustancias tóxicas que afectan la salud humana	NH ₃ , benceno, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Zn, HAPs, DEHP, BPC

Basado en Sablayrolles *et al.* (2010)

Notas: COVs, compuestos orgánicos volátiles; HAPs, hidrocarburos aromáticos policíclicos; DEHP, di(2-etilhexil) ftalato; BPC, bifenilos policlorados.

1.4.2. La LCA en procesos de producción de energéticos

El uso desmedido de los combustibles fósiles no renovables (i.e. petróleo, gas, carbón) tiene como consecuencias su agotamiento, contaminación ambiental y problemas económicos y sociales. Los biocombustibles como el biogás, biohidrógeno o el bioetanol, se derivan de fuentes biológicas y son considerados como energías renovables que pueden sustituir a los combustibles fósiles al mismo tiempo que reducen la emisión de gases de efecto invernadero (Islas *et al.*, 2007).

Existen muchas fuentes de biomasa que pueden usarse para producir bioenergía. Actualmente la biomasa para propósitos de bioenergía puede obtenerse de residuos y cultivos dedicados. Sin embargo, obtener bioenergía a partir de cultivos dedicados es controversial. Existe una justificada preocupación con respecto al uso de cultivos agrícolas para convertirlos en biocombustibles en lugar de servir como alimento (e.g. caña de azúcar y maíz). Han surgido alternativas que utilizan cultivos de plantas que no compitan con los alimentos, principalmente buscando que cumplan con ciertas condiciones, como bajos requerimientos de agroquímicos, bajos requerimientos de agua y bajos niveles de humedad en la cosecha. Los cultivos que cubren mejor estos requisitos son principalmente pastos perenes como *Miscanthus* y *Panicum virgatum* (Venturi & Venturi, 2003). Sin embargo, esto no resuelve el problema del uso de la tierra cultivable. Cuando se presentan situaciones como ésta, en las que no está claro si la solución propuesta es mejor que el problema, se puede emplear una LCA.

Por otro lado, la bioenergía a partir de residuos es una alternativa promisoría. Utilizar materia que no tiene, aparentemente, algún uso adicional es atractivo. Dentro de los residuos orgánicos podemos encontrar los generados en las ciudades, llamados residuos sólidos municipales (RSM), y los residuos agroindustriales. El uso de residuos agroindustriales tiene como ventaja los grandes volúmenes que se generan y su relativa homogeneidad pues permite establecer condiciones óptimas de operación. Sin embargo su aplicación podría conllevar algunos problemas inherentes a los rendimientos agrícolas, pues su remoción de los campos de cultivo podría alterar los balances de carbono, además de agotar los nutrientes del suelo. La posible apertura de un mercado de residuos de biomasa pudiera originar una actividad creciente del uso de la tierra, que también

tendría impactos ambientales negativos (Cherubini *et al.*, 2009). En cambio, la aplicación de los RSM para la obtención de bioenergía solucionaría parcialmente los problemas de transporte y disposición que se presentan en las grandes ciudades que los generan. Como ejemplo tenemos el caso del relleno sanitario del bordo Poniente, que de acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), el gas metano que se produce a diario equivale a la contaminación generada por un millón de vehículos en circulación (Méndez & Sánchez, 2012).

De acuerdo con estimaciones del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático, el costo para las naciones desarrolladas de cumplir 5.2% de reducción de emisiones de gases de invernadero para el 2012 con respecto a 1990 señalado por el Protocolo de Kioto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático, podría oscilar entre 0.2 y 2.0% de su producto interno bruto (PIB) y 0.1 y 1.0% del mismo si se estableciera un mercado de emisiones entre estos países (INEGI, 2001). Este costo podría disminuirse aún más si se tomaran en consideración otros medios para disminuir las emisiones de manera rentable.

En la Tabla 9 se muestran reportes que implementan la LCA con un enfoque en la producción o sustitución de energéticos.

Tabla 9. Evaluaciones de sistemas aplicadas a bioenergéticos y bioproductos

Sustrato	Productos	Procesos	Unidad funcional	Modelo/método	Impactos	Ref
Algas	Biodisel	Transesterificación	1000 MJ de energía	GREET	Energía, CO ₂ .	1
Rastrojo de maíz, paja de trigo	Bioetanol, electricidad, calor y fenoles	Fermentación	477 kton sustrato /año	SimaPro 7.1 CML 2 baseline 2000 V. 2.03	GEI, energía, AA, CG, Af, Ef, ACO, TH, TAF, TAM, TT, OF.	2
<i>Brassica carinata</i>	Biodisel, calor, glicerina, levulinato de etilo, ácido fórmico, ácido levulínico	Transesterificación	4.29 ton sustrato/ha/año	SUMMA	Energía, CG, Af, Ef.	3
Sebo, aceite vegetal usado	Biodisel, glicerol, K ₂ SO ₄	Transesterificación	1 MJ de energía	Sustainable Process Index	Huella ambiental.	4
Biomasa de madera	Hidrógeno	Gasificación, electrólisis	1 MJ de hidrógeno producido	EcoIndicator95	GEI, energía, Af, Ef, Cc, metales pesados, smog.	5
Bagazo de caña	Electricidad, pulpa	Relleno sanitario, digestión anaerobia, incineración	1 ton de bagazo de caña	EDIP/UMIP 97 V2	CG, Af, Ef, OF.	6

Notas: AA, agotamiento abiótico; ACO, agotamiento de capa de ozono; Af, acidificación; Cc, carcinogénesis; CG, calentamiento global; Ef, eutroficación; GEI, gases de efecto invernadero; OF, oxidación fotoquímica; TH, toxicidad a humanos; TAF, toxicidad en agua fresca; TAM, ecotoxicidad en agua marina; TT, ecotoxicidad terrestre.

Referencias: 1, Sander & Murthy (2010); 2, Cherubini & Ulgiati (2010); 3, Fahd *et al.* (2012); 4, Niederl-Schimidinger & Narodslawsky (2008); 5, Koroneos *et al.* (2008); 6, Kiatkittipong *et al.* (2009);

2. JUSTIFICACIÓN

Los procesos biotecnológicos han demostrado su factibilidad tecnológica y económica. Sin embargo éstos continúan evolucionando para encontrar solución a nuevos y viejos problemas. Tal es el caso de las biorrefinerías para la obtención de bioenergía, bioproductos o incluso ambos.

El biohidrógeno y metano son bioenergéticos que se obtienen por diferentes rutas fermentativas, y aunque pueden obtenerse independientemente, también ha sido posible obtenerlos a partir de procesos acoplados. Se ha demostrado la factibilidad de agregar una etapa adicional de producción de enzimas a este proceso, lo que abre la posibilidad de realizar nuevas combinaciones e incluso de añadir más etapas al proceso.

El sustrato para estos procesos es la biomasa, que puede ser en forma refinada (azúcares, almidón), cultivos (maíz, trigo, caña) o residual (agroindustrial, municipal, estiércol). Si se utiliza biomasa residual como la fracción orgánica de los residuos municipales se estaría contribuyendo a la resolución del problema de disposición de residuos sólidos, sin comprometer la seguridad alimentaria como ocurriría en el caso de los cultivos agrícolas.

Para poder comparar diferentes procesos y alternativas de biorrefinación, así como su comparación contra otros procesos de tratamiento y disposición de residuos sólidos urbanos, se hace necesaria una evaluación del ciclo de vida del proceso que incluya el balance energético global y la emisión de gases de efecto invernadero.

La obtención de toda esta información podría ser definitiva para impulsar procesos ecológicos y sustentables que ayuden en la resolución de problemas como la dependencia energética en combustibles fósiles y el cambio climático.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis general

La implementación de un sistema de biorrefinería de 4 etapas (H-M-Z-S) para el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos presentará mejoras ambientales y de productividad al compararse con procesos de una sola etapa.

Hipótesis particulares

1. La productividad de hidrógeno se verá influenciada positivamente por un menor tiempo de residencia másico y por el régimen mesofílico.
2. La productividad de metano se verá influenciada positivamente por una alimentación con un mayor contenido de ácidos orgánicos y por el régimen termofílico.
3. La etapa metanogénica aumentará el rendimiento energético del sistema H-M por unidad de masa holocelulósica comparado con un proceso sólo metanogénico.
4. Se podrán utilizar los sólidos residuales de las etapas H-M para la producción de celulasas utilizando *Trichoderma reesei* MCG 80.
5. Las enzimas de *Trichoderma reesei* MCG 80 tendrán mayor capacidad de sacarificación comparada con enzimas comerciales.
6. Haciendo una combinación de las mejores etapas del proceso H-M-Z-S se obtendrán ganancias energéticas y una reducción de gases de efecto invernadero comparados con procesos convencionales.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Integrar un proceso de 4 etapas a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU).

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tiempo de residencia másico y la temperatura de operación en la producción de hidrógeno a partir del FORSU.
2. Evaluar el efecto de la procedencia de sólidos fermentados y la temperatura de operación en la producción de metano en la segunda etapa de un proceso en serie.
3. Evaluar la producción de celulasas con *Trichoderma reesei* MCG 80.
4. Determinar los potenciales de sacarificación de los sólidos de las distintas corrientes del proceso H-M-Z utilizando extractos enzimáticos de *Trichoderma reesei* MCG 80 y comerciales.
5. Realizar Análisis de Sistemas Recursos-Desecho-Energía del proceso H-M-Z-S.

5. ALCANCE

Se realizó un proceso a escala laboratorio en cuatro etapas (H-M-Z-S) para la producción de hidrógeno, metano, enzimas y sacarificados, a partir de la FORSU.

- El proceso hidrogenogénico (Etapa H) se alimentó con FORSU. El proceso se evaluó en un diseño experimental 2², con tiempos de residencia másico de 21 y 14 d, a 55 y 35 °C.
- Los sólidos fermentados producidos en la Etapa H se alimentaron a la etapa metanogénica (Etapa M) que también se evaluó en un diseño 2², en función del origen de los sólidos fermentados y de la temperatura de operación, 55 y 35 °C.
- Los sólidos fermentados y digeridos de las etapas H y M, se utilizaron para la producción de celulasas y xilanasas en cultivos de *Trichoderma reesei* MCG 80 (Etapa Z).
- Se evaluó el potencial de sacarificación (Etapa S) del FORSU y de otros sustratos generados durante el proceso H-M-Z, con los extractos enzimáticos producidos en la Etapa Z y con enzimas comerciales.
- A partir de la información experimental del proceso H-M-Z-S, se realizó un análisis de sistema de recursos, desechos y energía, basado en los análisis de ciclos de vida de sistemas de manejo de residuos sólidos.

6. METODOLOGÍA

6.1. Plan de trabajo

Para llevar a cabo el proyecto de modelo de biorrefinería se siguió el orden experimental planteado en la Fig. 7.

La Actividad 1 (A1) se enfocó a la utilización de FORSU para la producción de hidrógeno en sustrato sólido, realizándose en proceso semi-continuo (Actividad 1a, Etapa H) o en lote (Actividad 1b).

En la Actividad 2 (A2) se utilizaron los sólidos fermentados de la A1a para la producción de metano en reactores semi-continuos (Etapa M).

En la Actividad 3 (A3) se evaluó el potencial de producción de celulasas y xilanasas del hongo *Trichoderma reesei* MCG 80 cuando fue crecido en FORSU, en los sólidos fermentados de A1a (Etapa Z) y en los sólidos digeridos de la A2.

En la Actividad 4 (A4) se utilizó el extracto enzimático de la A3 para la sacarificación de la FORSU y de sólidos fermentados de la A1a (Etapa S).

Por último, en la Actividad 5 (A5), se realizó la evaluación de sistemas para el modelo de biorrefinería de cuatro etapas H-M-Z-S con el objetivo de analizar el balance energético y ambiental del proceso.

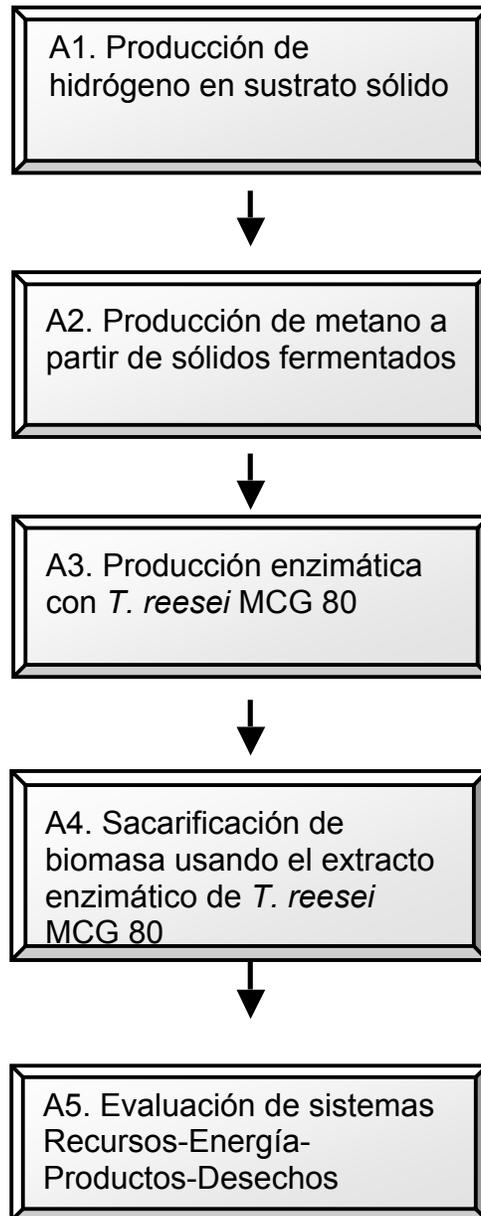


Fig. 7. Esquema del plan de trabajo

6.2. Actividad 1a. Producción de hidrógeno en sustrato sólido en régimen semi-continuo

6.2.1. Propósito

Producir hidrógeno y generar sólidos fermentados por medio de un proceso de digestión anaerobia en sustrato sólido acidogénico alimentado con la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (Etapa H).

6.2.2. Diseño experimental

Se utilizaron digestores anaerobios en sustrato sólido acidogénicos (DASS-A) para la producción de hidrógeno (Fig. 8). El tipo y configuración de los digestores se basó en lo reportado en trabajos previos (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005; Escamilla-Alvarado, 2009). La alimentación de los digestores consistió en una mezcla de residuos sólidos orgánicos y papel, denominada FORSU. El contenido de sólidos totales (ST) en la FORSU se ajustó con una solución amortiguadora de fosfatos a 20.9 %p/p. Se siguió un diseño experimental 2^2 para evaluar los efectos del tiempo de residencia másico (TRM) y la temperatura de operación sobre la producción de hidrógeno conforme a la Tabla 10. Cada corrida experimental se realizó por duplicado.

El análisis estadístico se realizó con el software Design-Expert v7.1.6 (Stat-Ease Inc., Mineapolis).

Tabla 10. Diseño experimental de la Etapa H

Experimento	Valores codificados		Valores reales	
	X1	X2	Temperatura (°C)	TRM ^a (d)
1	+	+	55	21
2	+	-	55	14
3	-	+	35	21
4	-	-	35	14

Notas: ^a Tiempo de retención másico.

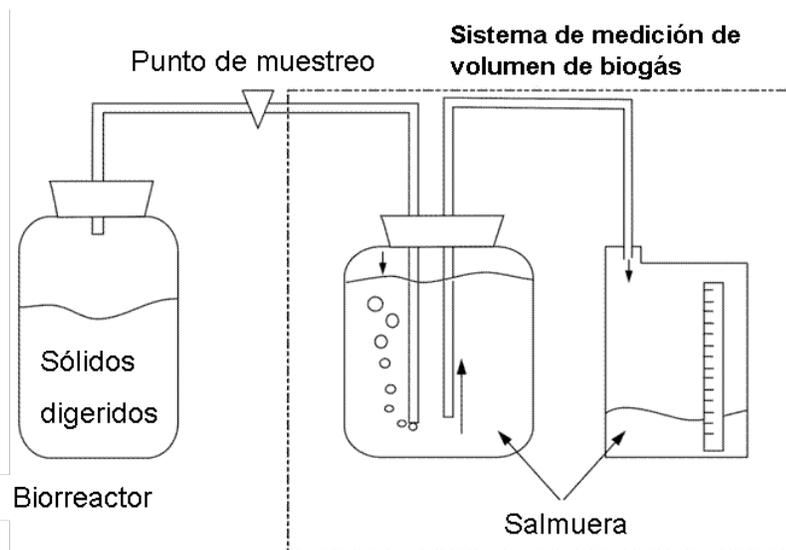


Fig. 8. Esquema y fotografía de un digestor anaerobio en sustrato sólido

6.2.3. Programa de seguimiento y análisis

Para esta actividad se utilizaron análisis convencionales de composición de sólidos, pH, alcalinidad, y análisis de cromatografía para cuantificar ácidos orgánicos, hidrógeno y metano (Tabla 11). Las principales variables de respuesta fueron las productividades y rendimientos de hidrógeno (Tabla 12).

Tabla 11. Análisis y seguimiento experimental de DASS-A

Parámetro	Alimentación	Purga	Biogás	Ref
Sólidos totales	1/lote	1/sem	NA	1
Sólidos volátiles	1/lote	1/sem	NA	1
pH	1/lote	2/sem	NA	1
Alcalinidad	1/lote	1/sem	NA	2
Ácidos orgánicos volátiles	1/sem	1/sem	NA	3
Nitrógeno Kjeldahl	1/lote	1/lote	NA	1
Fósforo total	1/lote	1/lote	NA	4
Celulosa	1/lote	1/lote	NA	5
Hemicelulosa	1/lote	1/lote	NA	5
Lignina	1/lote	1/lote	NA	5
Producción de biogás (m ³)	NA	NA	1/día	3
Hidrógeno	NA	NA	2/sem	6
Metano	NA	NA	2/sem	6
Dióxido de carbono	NA	NA	2/sem	6

Notas: NA, no aplica.

Referencia: 1, Poggi-Varaldo *et al.* (1999); 2, Poggi-Varaldo & Oleszkiewics (1992); 3, Valdez-Vazquez *et al.* (2005); 4, APHA-AWWA-WPCF (1985); 5, AOAC (1984); 6, Escamilla-Alvarado (2009).

Tabla 12. Variables de respuesta para evaluar desempeño de la Etapa H

Variables de respuesta	Unidades	Fórmula	Ecuación
Productividad de biogás	NL/kg react/d	$I_{bg} = \frac{Q_{bg}}{M_r}$	2
Productividad de hidrógeno	NL H ₂ /kg react/d	$I_{H_2} = \frac{Q_{H_2}}{M_r}$	3
Rendimiento de hidrógeno	NL H ₂ /g SVrem	$Y_{H_2} = \frac{Q_{H_2}}{SV_{rem}}$	4
Eficiencia de remoción de SV	%SVrem	$\eta_{remSV} = \frac{SV_{alim} - SV_{purga}}{SV_{alim}} \times 100$	5
Carga orgánica	g SV/kg react/d	$Bm = \frac{\dot{m}_{sv}}{M_r}$	6

Notas: I_{bg} , I_{H_2} : productividad de biogás o hidrógeno; Q_{bg} , Q_{H_2} : producción de biogás o de hidrógeno; M_r : masa del reactor; Y_{H_2} : rendimiento de hidrógeno; SV_{rem} : remoción de sólidos volátiles; η_{remSV} : eficiencia de remoción de SV; Bm : carga orgánica específica; \dot{m}_{sv} : flujo másico de sólidos volátiles.

6.2.4. Métodos y procedimientos

6.2.4.1. Preparación de la FORSU.

Con el objetivo de tener un lote de alimentación lo más homogéneo en su composición, la FORSU se formuló a partir de aproximadamente 3 kg de papel y residuos sólidos orgánicos (RSO) deshidratados, previamente obtenidos y almacenados por separado, y mezclados en las proporciones requeridas el mismo día de la alimentación. Los RSO fueron recolectados del comedor del Cinvestav (Zacatenco), se secaron en una primera etapa al aire libre hasta sentirse firmes y secos al tacto, y posteriormente en un horno a 60 °C por 24 h para eliminar cualquier humedad residual. El papel se recolectó del desecho de las áreas de oficina y se desmenuzó manualmente en tiras. Los residuos orgánicos y el papel se trituraron por separado en un molino de martillos con motor de 7.5 HP (Maquinaria y Mantenimiento S.A., México). A continuación los residuos orgánicos se tamizaron para seleccionar los sólidos con tamaño menor a 0.5 mm (malla No. 35). Ambos sustratos se almacenaron a 4 °C hasta su uso, cuando se mezclaron en una relación 60:40 base seca RSO:papel (Escamilla-Alvarado, 2009).

Al momento de realizar la alimentación, la humedad de la FORSU se ajustó a 20.9% p/p de sólidos totales (ST) con una solución amortiguadora conteniendo 25.31 g K_2HPO_4/L y 19.89 g KH_2PO_4/L ($pH_{te0} = 7.21$). Esta concentración corresponde a una relación de alcalinidad (γ) de 0.17 $g_{fosfato}/g_{sustrato\ seco}$ (54 % K_2HPO_4 y 44 % KH_2PO_4 ; Valdez-Vazquez *et al.*, 2009), de acuerdo a la ecuación 7:

$$\gamma = \frac{[K_2HPO_4] \frac{PM_{PO_4}}{PM_{K_2HPO_4}} + [KH_2PO_4] \frac{PM_{PO_4}}{PM_{KH_2PO_4}}}{[ST] - [K_2HPO_4] - [KH_2PO_4]} \quad [7]$$

que efectúa la relación de la concentración de los equivalentes de fosfato ($g\ PO_4\text{-eq}/L$) y la concentración de sólidos totales del sustrato ($g\ sustrato\ seco/L$), a partir de las concentraciones de fosfato dibásico y monobásico de potasio (g/L) divididas por sus respectivos pesos moleculares (g/mol).

6.2.4.2. Inoculación y arranque

Los digestores anaerobios consistieron de frascos de vidrio de 1 litro, cerrados con un tapón de hule con perforaciones para venteo y purga. El volumen másico de operación fue de 500 g.

Se siguió la estrategia de inoculación reportada por Poggi-Varaldo *et al.* (1997), mezclando 0.166 kg de lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en la zona norte del D.F. (Aguas de San Juan Ixhuatepec, México), 0.166 kg de tierra de jardín obtenida a 30 cm de profundidad cribada con malla No. 35 (diámetro de partícula igual a 0.5 mm) y 0.166 kg de excreta de vaca. Se barrió el espacio gaseoso de los biorreactores con N₂ grado industrial (Infra, México) durante 3 min para crear una atmósfera anóxica. Los biorreactores se sometieron a dos regímenes térmicos de acuerdo su diseño experimental. Para el régimen mesofílico se utilizó un cuarto con temperatura regulada a 35 °C (± 0.1). El régimen termofílico se llevó a cabo en una cabina de madera a 55 °C (± 0.1).

El arranque de los biorreactores se realizó siguiendo lo reportado por Escamilla-Alvarado (2009). El inóculo recién conformado se incubó al respectivo régimen térmico y se alimentó con 1 % de sacarosa cada tres a cuatro días manteniendo el pH por arriba de 7.5 hasta que el contenido de metano llegó al 60% v/v. Una vez alcanzado dicho nivel, se comenzó la alimentación periódica y progresiva con FORSU_{aj} desde 100 d TRM hasta llegar a 35 d TRM. La alimentación de los reactores se realizó en forma manual dos veces por semana bajo atmósfera de nitrógeno grado industrial. Cada biorreactor se agitó manualmente durante 1 minuto dos veces al día.

6.2.4.3. Operación hidrogenogénica (DASS-A)

Una vez alcanzada la operación estable a 35 d TRM, los digestores fueron sometidos a choque térmico a 92 °C, 90 min (Fig. 9). Posteriormente se alimentaron bajo los TRM planteados en el diseño experimental (21 y 14 d, Tabla 10).

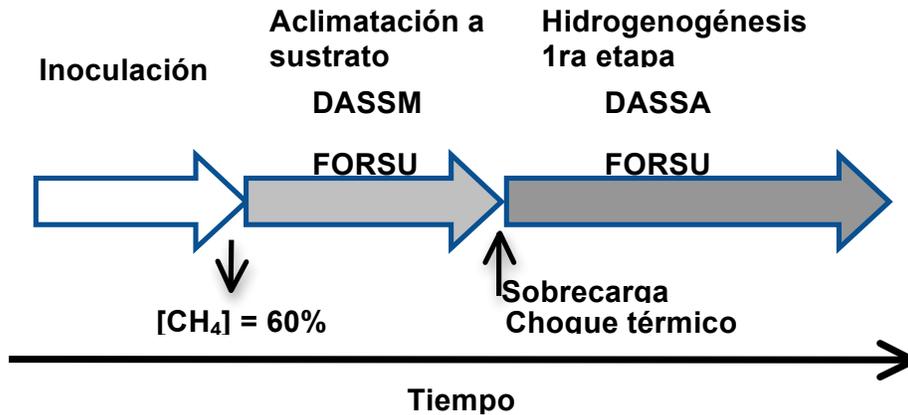


Fig. 9. Diagrama de arranque para un digestor anaerobio en sustrato sólido acidogénico

6.2.4.4. Análisis cromatográfico

El contenido de hidrógeno y metano en el biogás se analizó en un cromatógrafo de gases GOW-MAC modelo 350 equipado con detector de conductividad térmica. Las temperaturas del inyector, columna y detector fueron 37, 70 y 100 °C respectivamente, usando argón como gas acarreador. Se utilizó una columna empacada Molecular Sieve 5A.

La detección de CO_2 se realizó utilizando una columna empacada Porapak y con helio como gas acarreador.

6.2.4.5. Análisis de sólidos

Los análisis de humedad, sólidos totales y sólidos volátiles se realizaron siguiendo el método de Poggi-Varaldo *et al.* (1999) basado en el método estándar APHA-AWWA-WPFC (1985).

El pH se determinó en el sobrenadante después de hacer una extracción con agua destilada a 4 °C, de la muestra sólida húmeda en una relación 1:5 p/p. Una alícuota del extracto se utilizó para determinar la alcalinidad parcial y total a pH 5.75 y 4.3 por titulación potenciométrica con H_2SO_4 0.2 N. La relación α se determinó dividiendo la alcalinidad intermedia (obtenida de la diferencia de volúmenes de ácido gastados a pH 5.75 y 4.3) entre la alcalinidad parcial (volumen gastado de ácido a pH 5.75).

6.2.4.6. Análisis de celulosa, lignina, hemicelulosa y nitrógeno Kjeldahl total.

Una fracción de las muestras se llevó a peso seco y se utilizó para las determinaciones de celulosa, lignina, hemicelulosa y nitrógeno Kjeldahl total (NKT). La cantidad de muestra varió entre 0.1 y 0.2 g_{bs} para cada análisis.

El análisis de celulosa se realizó por el método colorimétrico modificado de Updegraff (1969), que se basa en un primer paso de remoción de lignina, hemicelulosa y xilana con un reactivo de ácido nítrico/ácido acético. Posteriormente se usa ácido sulfúrico al 67% para extraer los azúcares de la celulosa por hidrólisis. A continuación se realiza una comparación contra un estándar de glucosa a 490 nm.

El análisis de la lignina insoluble en ácido se realizó en base gravimétrica (Effland, 1977). Los carbohidratos se hidrolizan y solubilizan en 72% H₂SO₄ ácido sulfúrico (se requiere una remoción previa de complejos insolubles en ácido con etanol-benceno), y la materia insoluble es cuantificada como lignina.

El contenido de hemicelulosa se determinó a partir de la diferencia entre la masa de la holocelulosa y la celulosa. La holocelulosa se determinó por cloración de las muestras usando NaClO, que oxida la lignina y la materia orgánica, con excepción de la holocelulosa. La diferencia de peso de las muestras antes y después de la cloración da el contenido de holocelulosa. Cuando hubo presencia significativa de cenizas, se realizó una corrección del peso (AOAC, 1984).

Para determinar el contenido de NKT, la muestra se digirió hasta clarificar con catalizador de sulfato de potasio y óxido mercúrico, y con ácido sulfúrico en una parrilla de digestión. Posteriormente la digestión se reaccionó con NaOH al 20 % y se realizó el arrastre por vapor del amoniaco formado, en un equipo de destilación Kjeldahl modelo Büchi K-314 (Büchi Labortechnik AG, Suiza). El destilado se condensó y se recibió en ácido bórico al 5% con 3 gotas de indicador Kjeldahl. Por último se realizó la titulación colorimétrica con HCl 0.01 N, donde se observó un vire de color verde a lila.

6.2.4.7. Análisis de biología molecular

Se realizaron las siguientes técnicas de biología molecular a muestras selectas de los reactores en operación hidrogenogénica:

- Extracción de DNA de muestras.

- PCR con iniciadores específicos para eubacterias y arqueobacterias.
- DGGE y TGGE con los productos de la PCR.

6.2.4.7.1. Extracción de DNA

Se realizó un pretratamiento a las muestras sólidas con el fin de reducir los posibles inhibidores presentes que pudieran afectar las reacciones corriente abajo (Fig. 10).

Se realizó la extracción de muestras sólidas utilizando el procedimiento del kit de extracción de suelos UltraClean Soil DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad CA).

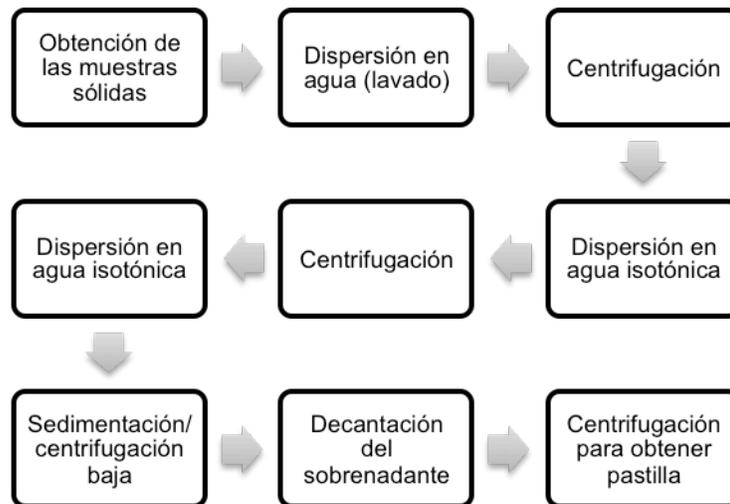


Fig. 10. Procedimiento de pretratamiento y extracción de DNA genómico

Se verificó la extracción del DNA corriendo una alícuota en gel de agarosa 0.8%. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se comparó el tamaño del DNA con un marcador de peso molecular 100 – 12 000 pb 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA). A las muestras cuyas bandas se mostraron poco definidas debido a la presencia de impurezas, como lípoteínas, se les realizó un segundo tratamiento de limpieza (Fig. 11).

Una vez obtenido el DNA genómico de aceptable pureza (relación A260/280 > 1.8, Sambrook *et al.*, 2001), se almacenó a -20 °C si se iba a trabajar con él a corto plazo, o a -80 °C si se iba a almacenar a largo plazo.

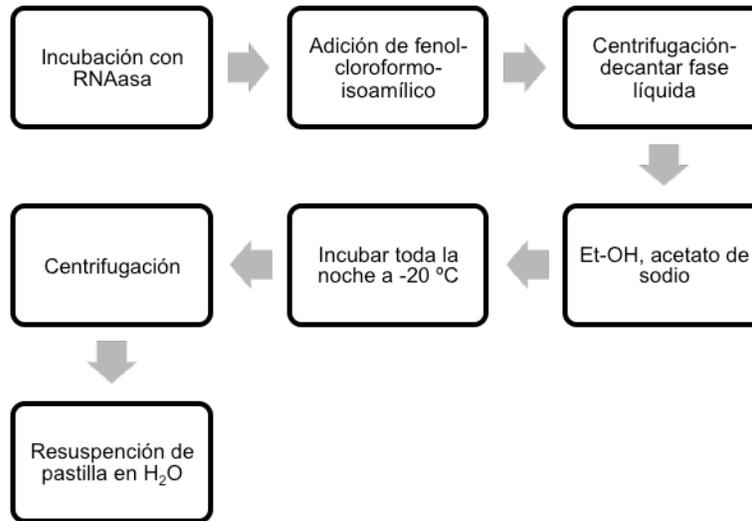


Fig. 11. Procedimiento de limpieza de muestras de DNA genómico

6.2.4.7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación se realizó midiendo la concentración de ácidos nucleicos totales (ng/ μ L) el método espectrofotométrico, diluyendo 1:50 de la muestra de extracción de ácidos nucleicos totales en agua desionizada, midiendo la absorbancia de esta dilución a 260 nm. Una unidad de densidad óptica a 260 nm es igual a 50 ng/ μ L (Frederick *et al.*, 2002).

6.2.4.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen 16S de la biota presente en los biorreactores se utilizaron los iniciadores específicos para eubacterias reportados por Garibay-Orijel (2006). El iniciador 465CGOF se sintetizó con una pinza de GC (5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGCGGGGCGGGGGCCCGGGGGG-3') en el extremo 5' (Muyzer *et al.*, 1993), denominándose 465FGC (Tabla 13).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf AG 22331 (Hamburgo, Alemania) a las condiciones mostradas en las Tablas 14 y 15.

Los productos de PCR fueron cuantificados por el método espectrofotométrico, y fueron observados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio.

Tabla 13. Iniciadores para PCR de eubacterias

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Microorganismos diana	Numeración en 16s rDNA	Tm	Tamaño de amplicón
CGO465F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	Eubacteria (universal)	312 – 330 ^a	64 ^c	465
CGO465R	CTACCAGGGTATCTAATCCTG	Eubacteria (universal)	756 – 776 ^a	62 ^c	465

Notas: ^a en *E. coli* (NBRC12713); ^b en *M. barkeri* (NBRC 100474); ^c calculada con la fórmula $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$.

Tabla 14. Composición de las PCR para eubacterias

Volumen de reacción	25 µL
Buffer	1X
MgSO ₄	2 mM
Iniciadores	0.12 µM
dNTP's	0.2 mM
Pfu polimerasa	0.025 U/µL
DNA molde	0.3 µg

Tabla 15. Programa de PCR para eubacterias

Desnaturalización inicial	94 °C	5'
Ciclos	30	
Desnaturalización	94 °C	1'
Alineación	58 °C	30''
Elongación	72 °C	1'
Elongación final	72 °C	7'

6.2.4.7.4. Electroforesis de gel por gradiente de temperatura

Posterior a la obtención de los productos de PCR con pinza de GC, se realizó el fraccionamiento por electroforesis de gel por gradiente de temperatura (TGGE). Para lo cual se ocuparon geles conteniendo poliacrilamida 8% (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1), urea 8M, TAE 0.5x y glicerol 2 %. Los geles de poliacrilamida se colocaron el equipo TGGE System (Biometra GmbH, Alemania) ocupando amortiguador TAE 0.5x. En cada pozo se cargaron 6 - 9 ng del producto de PCR con pinza de GC. Posteriormente se corrieron a las condiciones de la Tabla 16 para una adecuada y nítida separación de las bandas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio o SYBR Green.

Tabla 16. Condiciones para TGGE

Parámetro	Eubacterias (465 pb)
%poliacrilamida	8
Urea (M)	8
TAE (x)	0.5
Glicerol (%)	2
Gradiente de temperatura (°C)	41-51
Voltaje (V)	250
Tiempo de corrida (h)	1
Tiempo de tinción (min)	45

6.3. Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno

6.3.1. Propósito

Realizar experimentos presuntivos para determinar el efecto de la adición de fuente nitrógeno y la adición de alcalinidad sobre la producción de hidrógeno en lote.

6.3.2. Diseño experimental

Se eligió el sistema de minirreactores en lote o fermentadores anaerobios en sustrato sólido hidrogenogénico con venteo intermitente (FASSH-VI). Se llevó a cabo un diseño experimental 2^3 (Tabla 17) para evaluar el efecto de la temperatura (35 y 55 °C), la relación C/N (ajustada a 30 y nivel basal) y la alcalinidad (ajustada y nivel basal). Los niveles basales de C/N y alcalinidad fueron 44 y 0.0091 g CaCO₃/g sustrato seco respectivamente. Así mismo, se montaron controles para evaluar el potencial de producción basal de hidrógeno del inóculo sin sustrato y la producción abiótica de hidrógeno por descomposición química de la materia orgánica, en caso de existir.

El análisis estadístico se realizó con el software Design-Expert v7.1.6 (Stat-Ease Inc., Mineapolis).

Tabla 17. Diseño experimental 2^3 para experimentos de adición de fuente de nitrógeno

Factores	Niveles	
	+	-
A) Temperatura (°C)	55	35
B) C/N ajustada	30	Basal
C) Alcalinidad ajustada	Basal + 0.06 g CaCO ₃ /g sustrato seco	Basal

6.3.3. Programa de seguimiento y análisis

Se realizaron los análisis de la Tabla 18 y se interpretó el desempeño hidrogenogénico mediante las variables de respuesta descritas en la Tabla 19. La producción acumulada de hidrógeno (P_{H_2}) es igual a la suma del hidrógeno producido en por unidad de $SV_{reactor}$ o por unidad de reactor. La velocidad máxima de producción de hidrogeno (R_{i,H_2}) fue la velocidad de producción de hidrógeno a la cuál se registró la producción exponencial de

hidrógeno.

Tabla 18. Análisis y seguimiento experimental de FASSH-VI

Parámetro	Alimentación	Purga final	Biogás	Ref
Sólidos totales	1/lote	1/reactor	NA	1
Sólidos volátiles	1/lote	1/reactor	NA	1
pH	1/lote	1/reactor	NA	1
Alcalinidad	1/lote	1/reactor	NA	2
Ácidos orgánicos volátiles	1/sem	1/reactor	NA	3
Nitrógeno Kjeldahl	1/lote	1/reactor	NA	1
Fósforo total	1/lote	1/reactor	NA	4
Celulosa	1/lote	1/reactor	NA	5
Hemicelulosa	1/lote	1/reactor	NA	5
Lignina	1/lote	1/reactor	NA	5
Hidrógeno	NA	NA	3-7/sem	6
Metano	NA	NA	2/sem	6
Dióxido de carbono	NA	NA	2/sem	6

NA: no aplica.

Referencias: 1, Poggi-Varaldo *et al.* (1999); 2, Poggi-Varaldo & Oleszkiewics (1992); 3, Valdez-Vazquez *et al.* (2005); 4, APHA-AWWA-WPCF (1985); 5, AOAC (1984); 6, Escamilla-Alvarado (2009).

Tabla 19. Variables de respuesta para evaluar el desempeño de los FASSH-VI

Variables de respuesta	Unidades	Fórmula	Ecuación
Producción acumulada de hidrógeno	$\mu\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{gSV}$	$P_{\text{H}_2} = \frac{V_r}{V_{inj} * m_{SV}} \sum (n_{\text{H}_2} - n_{\text{H}_2}')$	8
Productividad inicial de hidrógeno	$\mu\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{gSV}/\text{h}$	$R_{\text{H}_2} = \frac{V_r}{V_{inj} * m_{SV}} \int (n_{\text{H}_2} - n_{\text{H}_2}') \frac{dn_{\text{H}_2}}{dt}$	9

Notas: V_r , volumen de reactor; V_{inj} , volumen de inyección; m_{SV} , masa de reactor en base sólidos volátiles; n_{H_2} , moles de hidrógeno en 1 mL de inyección previo al gaseo; n_{H_2}' , moles de hidrógeno en 1 mL de inyección después del gaseo.

6.3.4. Métodos y procedimientos

6.3.4.1. Montaje y manejo de unidades FASSH-VI

Las unidades experimentales o minirreactores FASSH-VI consistieron en frascos de vidrio (250 mL volumen nominal) cerrados herméticamente con un tapón de hule y arnés metálico. Todos los reactores se montaron con una relación 1:5 de inóculo y sustrato en

base peso. Como inóculo se utilizaron 12 g de purgas de biorreactores metanogénicos (mesofílicos o termofílicos) pretratados con choque térmico (93 °C/90 min) como estrategia de selección de microorganismos productores de hidrógeno. El inóculo pretratado se mezcló con 48 g de FORSU al 20.9% ST como sustrato (Tabla 20) y con lodos activados o sales de fosfato según fuera el caso (Tabla 21). Las unidades con adición de lodos y/o de adición de sales, fueron montadas con 9.6 g de lodos activados (11.5 %ST) y/o 1.2 g de sales de fosfato. La caracterización de los constituyentes bióticos de los reactores FASSH-VI se muestra en la Tabla 22.

Tabla 20. Constitución de reactores FASSH-VI

Parámetro	Masa (g)
Masa sustrato + inóculo	60
FORSU (20.9% ST)	48
Inóculo	12
Adición de lodos (C/N= 30)	9.6
Sales de fosfato ($\gamma=0.06$) g CaCO ₃ /g sustrato seco)	1.2

Tabla 21. Características de los ensayos FASSH-VI a tiempo inicial

Ensayos (condición)	Factor			pH inicial	m _T (g)	ST (%)	SV (%)	C/N
	A	B	C					
1 (MOO)	35	0.0	0.0	8.16	60.0	20.9	15.7	49.5
2 (MNO)	35	9.6	0.0	7.89	69.6	19.6	14.9	29.3
3 (MOA)	35	0.0	1.2	7.41	61.2	20.5	15.4	49.5
4 (MNA)	35	9.6	1.2	7.36	70.8	19.3	14.7	29.3
5 (TOO)	55	0.0	0.0	7.82	60	19.6	15.7	49.3
6 (TNO)	55	9.6	0.0	7.72	69.6	18.5	14.9	29.0
7 (TOA)	55	0.0	1.2	7.41	61.2	19.2	15.3	49.3
8 (TNA)	55	9.6	1.2	7.25	70.8	18.2	14.6	29.0
Control A	35	-	-	8.20	9.6	11.5	86	6.7
Control B	35	-	-	8.16	60.0	20.9	15.7	49.5
Control C	35	-	-	7.89	57.6	19.3	16.9	25.7
Control D	55	-	-	8.55	9.6	11.5	86	6.7
Control E	55	-	-	7.82	60.0	19.6	15.7	49.3
Control F	55	-	-	7.72	57.6	19.3	16.9	34.6

Notas: M, metanogénico; T, termofílico; N, adición de nitrógeno; A, adición de sales; O sin adición de nitrógeno/adición de sales.

El diseño experimental de esta actividad estuvo constituido por ocho ensayos y seis controles a tres condiciones distintas y a 35 o 55 °C (Tabla 17). Un par de controles contenía sólo lodos (Controles A y D), otro par contenía inóculo y FORSU tinalizados como controles abióticos (Controles B y E), y un par más contenía lodos y FORSU (Controles C y F). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla 22. Constitución de componentes del FASSH- VI

Parámetro	FORSU	Lodos	Inóculo mesofílico	Inóculo termofílico
Sólidos totales (%)	20.9 ± 0.2	11.5 ± 0.3	21.2 ± 0.2	14.4 ± 0.2
SV (% _{bs})	87.5 ± 0.5	86.0 ± 0.4	26.4 ± 0.3	35.6 ± 0.5
pH	6.66 ± 0.2	6.91 ± 0.1	8.20 ± 0.2	8.55 ± 0.1
g N/g SV _{bs}	0.012 ± 0.001	0.087 ± 0.001	0.027 ± 0.002	0.030 ± 0.001
C/N	55.3	6.7	21.5	19.3
cenizas (% _{bs})	12.4 ± 0.3	15.7 ± 0.2	64.1 ± 0.3	73.6 ± 0.3
Alcalinidad parcial (mg CaCO ₃ /kg _{bh})	625	625	9400	7550

6.3.4.2. Montaje de unidades FASSH-VI del experimento complementarios

Con objeto de determinar la influencia de lodos activados pretratados térmicamente (93 °C/90 min), se realizaron experimentos complementarios utilizando seis condiciones de operación de las ocho probadas originalmente en la Actividad 1b. Las combinaciones de las condiciones de operación fueron régimen mesofílico y termofílico, sin adición de lodos ni alcalinidad, con adición de lodos, y con adición de lodos y alcalinidad (Tabla 23 y 24). La numeración de los ensayos de esta actividad es una continuación de los ensayos anteriores (Tabla 21).

Tabla 23. Condiciones de operación para ensayos FASSH-VI complementarios

Ensayos (código)	Condiciones		
	Temperatura	C/N	Alcalinidad
9 (MOO)	35	Basal	Basal
10 (MNO)	35	Basal + LA	Basal
11 (MNA)	35	Basal + LA	Basal + SP
12 (TOO)	55	Basal	Basal
13 (TNO)	55	Basal + LA	Basal
14 (TNA)	55	Basal + LA	Basal + SP

Notas: M, metanogénico; T, termofílico; N, adición de nitrógeno; A, adición de sales; O sin adición de nitrógeno/adición de sales; LA, lodos activados; SP, sales de fosfato.

Tabla 24. Características de los ensayos FASSH-VI complementarios a tiempo inicial

Ensayos (código)	Factor			pH inicial	m _T (g)	ST (%)	SV _{bh} (%)	C/N	Alcalinidad parcial
	A (°C)	B (g)	C (g)						
9 (MOO)	35	0.0	0.0	6.93	60.0	21.4	15.6	35.1	277
10 (MNO)	35	7.5	0.0	7.35	67.5	19.2	14.2	28.0	370
11 (MNA)	35	7.5	1.2	6.98	68.7	21.0	14.1	27.2	831
12 (TOO)	55	0.0	0.0	7.02	60.0	21.1	15.4	36.0	277
13 (TNO)	55	7.5	0.0	7.01	67.5	19.7	14.5	27.6	300
14 (TNA)	55	7.5	1.2	7.05	68.7	20.2	13.8	26.8	831

Notas: M, metanogénico; T, termofílico; N, adición de nitrógeno; A, adición de sales; O sin adición de nitrógeno/adición de sales.

6.4. Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados

6.4.1. Propósito

Producir metano por medio de un proceso semi-continuo de digestión anaerobia en sustrato sólido (DASS-M) utilizando como sustrato los sólidos fermentados (SF) de la Etapa H.

6.4.2. Diseño experimental

Se evaluó la productividad de metano a partir de los SF de la Etapa H bajo un diseño experimental 2^2 (Tabla 25). Los factores evaluados fueron el régimen térmico (35 y 55 °C) y el origen de la alimentación (TRM de los SF de la Etapa H). Todos los biorreactores metanogénicos operaron a 28 d TRM. En la Fig. 12 se muestra un esquema de la alimentación en el proceso compuesto por las etapas H y M (H-M).

El análisis estadístico se realizó con el software Design-Expert v7.1.6 (Stat-Ease Inc., Mineapolis).

Tabla 25. Diseño experimental de la Etapa M

No. de Reactor	Valores codificados		Valores reales	
	X1	X2	Temperatura	Alimentación
1	+	+	55 °C	SF de Etapa H a 21 d TRM y 55 °C (21-H)
2	+	-	55 °C	SF de Etapa H a 14 d TRM y 55 °C (14-H)
3	-	+	35 °C	SF de Etapa H a 21 d TRM y 35 °C (21-H)
4	-	-	35 °C	SF de Etapa H a 14 d TRM y 35 °C (14-H)

Se montaron en paralelo biorreactores control alimentados con FORSU como sustrato a 4 TRM: 28, 32, 42 y 49 d.

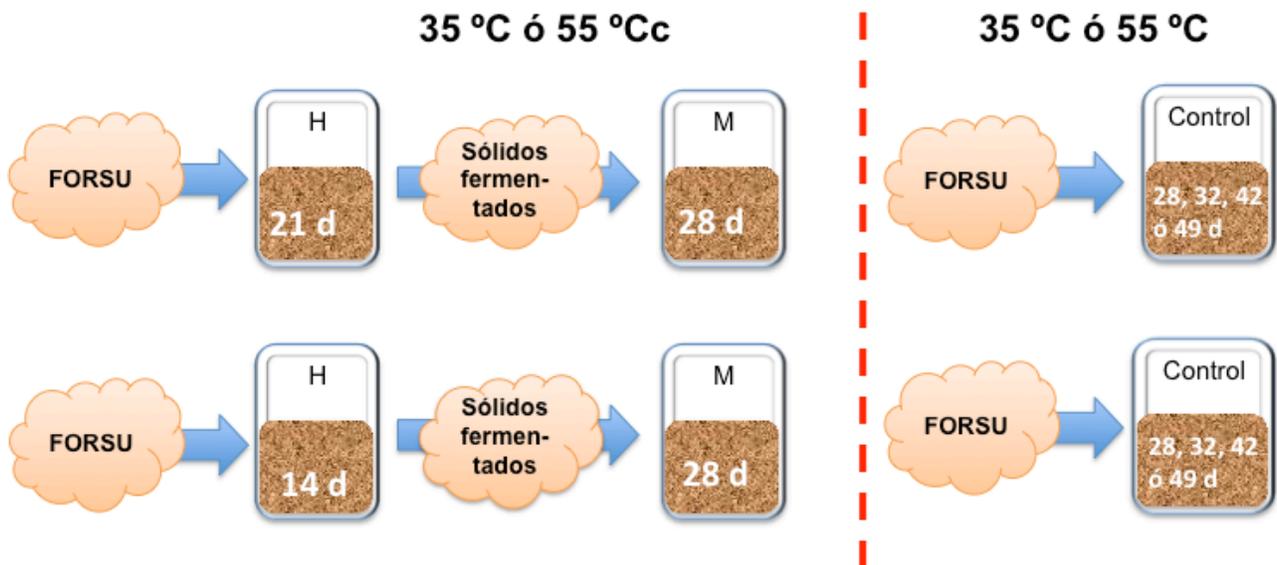


Fig. 12. Diseño de operación de los digestores H-M y de sus controles

6.4.3. Programa de seguimiento y análisis

Se realizaron análisis convencionales de composición de sólidos, pH, alcalinidad, y análisis de cromatografía para cuantificar ácidos orgánicos, hidrógeno y metano (Tabla 26). Las principales variables de respuesta fueron las productividades y rendimientos de metano, así como las eficiencias de remoción de SV (Tabla 27).

Tabla 26. Análisis y seguimiento experimental de digestores mesofílicos

Parámetro	Alimentación	Purga	Biogás	Ref
Sólidos totales	1/lote	1/sem	NA	1
Sólidos volátiles	1/lote	1/sem	NA	1
pH	1/lote	2/sem	NA	1
Alcalinidad	1/lote	1/sem	NA	2
Ácidos orgánicos volátiles	1/sem	1/sem	NA	3
Nitrógeno Kjeldahl	1/lote	1/lote	NA	1
Fósforo total	1/lote	1/lote	NA	4
Celulosa	1/lote	1/lote	NA	5
Hemicelulosa	1/lote	1/lote	NA	5
Lignina	1/lote	1/lote	NA	5
Producción de biogás (m ³)	NA	NA	1/día	3
[H ₂]	NA	NA	2/sem	6
[CH ₄]	NA	NA	2/sem	6
Dióxido de carbono	NA	NA	2/sem	6

NA: no aplica.

Referencias: 1, Poggi-Varaldo *et al.* (1999); 2, Poggi-Varaldo & Oleszkiewics (1992); 3, Valdez-Vazquez *et al.* (2005); 4, APHA-AWWA-WPCF (1985); 5, AOAC (1984); 6, Escamilla-Alvarado (2009).

Tabla 27. Variables de respuesta para evaluar el desempeño de la Etapa M

Variables de respuesta	Unidades	Fórmula	Ecuación
Productividad de biogás	NL/kg react/d	$I_{bg} = \frac{Q_{bg}}{M_r}$	10
Productividad de CH ₄	NL CH ₄ /kg react/d	$I_{CH_4} = \frac{Q_{CH_4}}{M_r}$	11
Rendimiento de metano	NL CH ₄ /g SVrem	$Y_{CH_4} = \frac{Q_{CH_4}}{SV_{rem}}$	12
Eficiencia de remoción de SV	%SVrem	$\eta_{remSV} = \frac{SV_{alim} - SV_{purga}}{SV_{alim}} \times 100$	13
Carga orgánica	g SV/kg react/d	$Bm = \frac{m_{sv}}{M_r}$	14

Notas: I_{bg} , I_{CH_4} : productividad de biogás o metano; Q_{bg} , Q_{CH_4} : producción de biogás o metano; M_r : masa del reactor; Y_{CH_4} : rendimiento de metano; SV_{rem} : remoción de sólidos volátiles; η_{remSV} : eficiencia de remoción de SV; Bm : carga orgánica específica; m_{sv} : flujo másico de sólidos volátiles.

6.4.4. Métodos y procedimientos

6.4.4.1. Inoculación y arranque

Se siguió el procedimiento de inoculación y arranque descrito en la sección 6.2.4.2.

6.4.4.2. Operación metanogénica (DASS-M)

Los digestores se operaron a 35 y 55 °C, y 28 d TRM de acuerdo a lo planteado en el diseño experimental (Tabla 25). Se alimentaron en forma semi-continua dos veces por semana con los sólidos fermentados de la Etapa H.

6.4.4.3. Producción de metano en DASS-M a partir de FORSU (control)

El proceso H-M se comparó contra biorreactores DASS-M operados a 28, 32, 42, 49 d TRM, alimentados con FORSU como sustrato. Se realizó el seguimiento de productividad de metano (I_{CH_4}), eficiencia de remoción de materia orgánica, sólidos volátiles y ácidos orgánicos.

6.4.4.4. Potencial y flujo energético del sistema H-M

El análisis energético del sistema H-M se efectuó sumando el potencial energético del proceso hidrogenogénico más el del metanogénico (Ec. 15 y 16) y comparándolo con la producción del proceso control (Ec. 17) con base en el flujo másico de sólidos totales del proceso. El potencial energético (Ec. 18) es directamente proporcional a la producción de hidrógeno (Q_{H_2}) o metano (Q_{CH_4}) durante un tiempo t de operación, por la entalpía de combustión (ΔH_c). Se contempló que todos los SF producidos en la Etapa H durante el tiempo t fueron alimentados a la Etapa M. Experimentalmente no fue posible realizar esto por la diferencia de TRM y en consecuencia las diferentes cargas orgánicas de alimentación entre ambas etapas, por lo que fue necesario un ajuste teórico del potencial energético de la Etapa M (E_{CH_4ajust}) con respecto al flujo másico total de SF de la Etapa H mediante la Ec. 19. También el potencial energético del control metanogénico se ajustó al flujo másico teórico de FORSU equivalente al flujo másico de FORSU alimentado a la Etapa H (Ec. 20).

$$E_{HM} = E_{H2} + E_{CH4ajust} \quad [15]$$

$$\hat{E}_{HM} = \frac{E_{HM}}{\int_0^t \dot{m}_{i,H} \left(\frac{ST_{i,H}}{100} \right) dt} \quad [16]$$

$$\hat{E}_{controlCH4} = \frac{E_{controlCH4}}{\int_0^t \dot{m}_{i,H} \left(\frac{ST_{i,H}}{100} \right) dt} \quad [17]$$

$$E_{H2} = \int_0^t Q_{H2} dt \cdot \frac{1 \text{ mol}}{22.4L} \cdot \Delta H_{c_{H2}} \quad [18]$$

$$E_{CH4ajust} = \int_0^t Q_{CH4} dt \cdot \frac{1 \text{ mol}}{22.4L} \cdot \Delta H_{c_{CH4}} \left(\frac{\int_0^t \dot{m}_{purga,H} dt}{\int_0^t \dot{m}_{i,M} dt} \right) \quad [19]$$

$$E_{controlCH4} = \int_0^t Q_{controlCH4} dt \cdot \frac{1 \text{ mol}}{22.4L} \cdot \Delta H_{c_{CH4}} \left(\frac{\int_0^t \dot{m}_{purga,H} dt}{\int_0^t \dot{m}_{i,control} dt} \right) \quad [20]$$

Donde:

E_{HM} = potencial energético del proceso H-M (J)

\hat{E}_{HM} = potencial energético del proceso H-M (J/g_{bs})

$\hat{E}_{controlCH4}$ = potencial energético del proceso metanogénico control (J/g_{bs})

E_{H2} = potencial energético del proceso H (J)

$E_{CH4ajust}$ = potencial energético ajustado del proceso M (J)

$E_{controlCH4}$ = potencial energético ajustado del proceso metanogénico control (J)

$\dot{m}_{i,H}$ = flujo másico de alimentación al DASS-A (g_{bh}/d)

$\dot{m}_{i,M}$ = flujo másico de alimentación al DASS-M (g_{bh}/d)

$\dot{m}_{purga,H}$ = flujo másico de salida de purgas del DASS-A (g_{bh}/d)

$\dot{m}_{i,control}$ = flujo másico de alimentación al DASS-M control (g_{bh}/d)

$ST_{i,H}$ = por ciento de sólidos totales en alimentación del proceso H (%)

Q_{H_2} = producción de hidrógeno (NL/d)

Q_{CH_4} = producción de metano (NL/d)

$Q_{controlCH_4}$ = producción de metano en proceso control (NL/d)

$\Delta H_{C_{H_2}}$ = entalpía de combustión del hidrógeno (J/mol)

$\Delta H_{C_{CH_4}}$ = entalpía de combustión del metano (J/mol)

En la Fig. 13 se muestra un diagrama de flujo con las líneas de entrada y salida para el proceso H-M y para el proceso control, en relación con los términos usados en las Ec. 15 – 20.

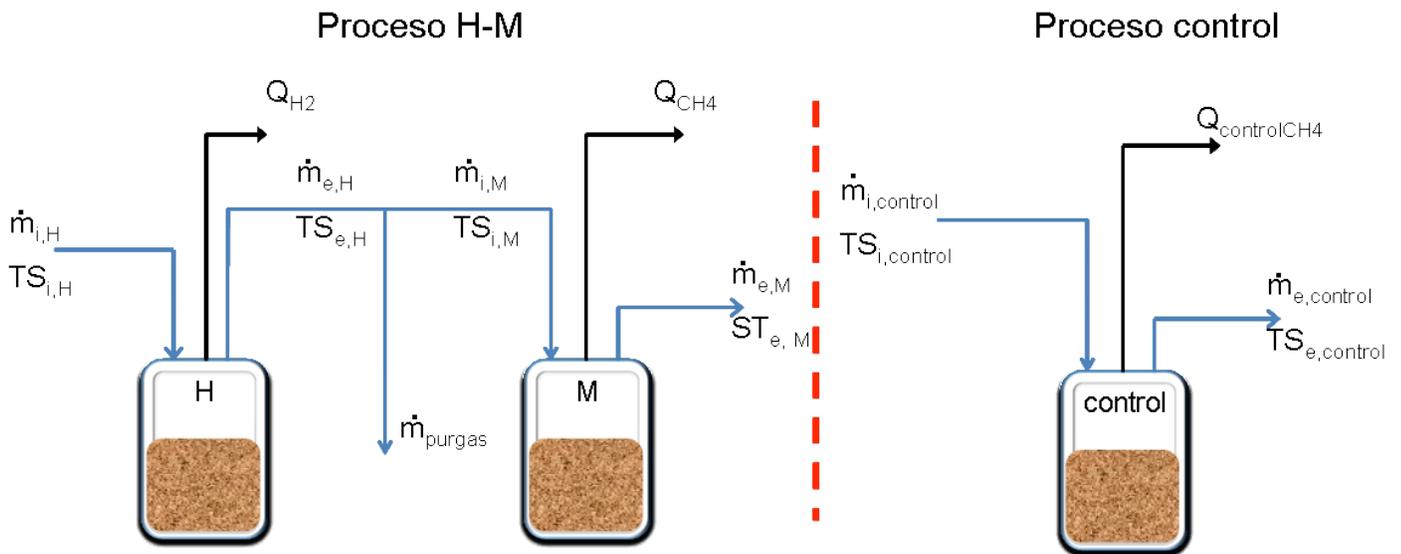


Fig. 13. Diagrama de flujo del proceso de alimentación del proceso H-M y control

Adicionalmente se introdujo el concepto de flujo energético E_F . El flujo energético representó la energía generada por unidad de masa del biorreactor por día, correspondiente a la energía térmica de la productividad del hidrógeno y del metano.

$$E_{F,H_2} = I_{H_2} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{22.4 \text{ L}} \cdot \Delta H_{C_{H_2}} \quad [21]$$

$$E_{F,CH_4} = I_{CH_4} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{22.4 \text{ L}} \cdot \Delta H_{C_{CH_4}} \quad [22]$$

Donde:

E_{F,H_2} = flujo energético de la Etapa H (kJ/kg_r/d)

E_{F,CH_4} = flujo energético de la Etapa M (kJ/kg_r/d)

I_{H_2} = productividad de hidrógeno (NL/kg_r/d)

I_{CH_4} = productividad de metano (NL/kg_r/d)

$\Delta H_{C_{H_2}}$ = entalpía de combustión del hidrógeno (kJ/mol)

$\Delta H_{C_{CH_4}}$ = entalpía de combustión del metano (kJ/mol)

Aunque el \hat{E} y el E_F se relacionan matemáticamente, éstos se asocian a diferentes conceptos. El \hat{E} representa la cantidad de energía que se puede obtener a partir de todo el sustrato seco alimentado al proceso durante un lapso de tiempo determinado, mientras que el E_F representa la intensidad de energía obtenida como biocombustible en cualquier momento de la operación.

6.4.4.5. Observación de la interacción microorganismos-sustrato por medio de microscopía de barrido electrónico (SEM).

Se tomaron muestras selectas de los digestores para analizar la interacción microorganismos-sustrato. Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Resuspensión de los sólidos en solución isotónica NaCl 0.85% p/v en una relación 1:5.
2. Centrifugación 10 000 rpm, 5 min. Decantar líquido.
3. Resuspender en solución amortiguadora de fosfatos 15 mM, pH 7.4 (8.2 g/L NaCl, 0.43 g/L NaH₂PO₄ 2H₂O, 1.74 g/L Na₂HPO₄).
4. Adicionar glutaraldehído 2.5% v/v como fijador y con el objetivo de preservar la estructura del tejido vivo sin alteraciones a su estado. El glutaraldehído reacciona con las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Dejar reposar 1 h.
5. Postfijación adicionando tetraóxido de osmio 1 %v/v con el objeto de aumentar la densidad y contraste del tejido biológico. El tetraóxido de osmio oxida los enlaces insaturados de los ácidos grasos. Además tiene un efecto mordiente. Las partículas correctamente fijadas con este compuesto tendrán una coloración negra. Dejar

- reposar 1 h.
6. Desechar líquido y lavar tres veces 5 min con la solución amortiguadora de fosfatos.
 7. Dejar reposar a 4 °C durante la noche.
 8. Realizar lavados con etanol (50, 60, 70 , 80, 90, 100% v/v) cada 15 min bajo agitación suave para deshidratar la muestra y a la vez remover las sales del amortiguador.
 9. Secar la muestra con CO₂ en el equipo de secado al punto crítico (Samdri-780A, Tousimis Research Corp., Rockville, Maryland, EUA). Este procedimiento se efectúa para remover cualquier partícula de líquido sin colapsar la estructura del material.
 10. La muestra se recubre con oro durante 2 min en el equipo sombreador Desk II SEM coating unit (Denton Vacuum, Cherry Hill, New Jersey, EUA) para dar conductividad a la muestra. Previo al sombreado se remueve la atmósfera por vacío (0.1 Pa) y se reemplaza con Argón (6-7 Pa).
 11. Analizar la muestra en el microscopio electrónico de barrido (JSM-6510LV, JEOL Ltd., Tokio, Japón).

6.5. Actividad 3. Producción enzimática con *T. reesei* MCG 80

6.5.1. Propósito

El propósito fue producir enzimas con los sólidos del proceso H-M y con FORSU (Etapa Z).

6.5.2. Diseño experimental

Se utilizaron los sólidos de la Etapa H (sólidos fermentados, SF) y de la Etapa M (sólidos digeridos, SD) y FORSU para la producción enzimática con *Trichoderma reesei* MCG 80. Los experimentos se realizaron en el siguiente orden: (i) fermentación en sustrato sólido (FSS) contra fermentación en cultivo sumergido (FCS), (ii) fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones de FORSU y controles, (iii) producción enzimática usando sólidos del proceso H-M, y (iv) producción enzimática a nivel fermentador.

Los experimentos (i) fueron de carácter exploratorio. Se siguió una estrategia experimental de un factor a la vez, siendo los factores el contenido de sustrato, tipo de mezclado, pH inicial y adición de nitrógeno (Tabla 28). El sustrato fue FORSU a 25, 20, 15, 2 y 1 %ST. Las primeras tres concentraciones corresponden a la FSS, mientras que las de 1 y 2 %SV corresponden a las concentraciones usadas para la FCS.

Tabla 28. Condiciones de operación para los experimentos (i)

Ensayo	[FORSU] ^a	C/N ^b	Control de humedad	Reactor	pH _i ^c	Agit / mezclado
1	20 %	40	Glicerol 10%	Petri	6.4	Volteo
2	20 %	40	No	Petri	6.4	Volteo
3	20 %	40	No	Matraz	5.0	Volteo
4	20 %	40	No	Matraz	5.0	No
5	25 %	40	No	Matraz	5.0	No
6	15 %	40	No	Matraz	5.0	No
7	20 %	40	No	Matraz	4.7	No
8	20 %	30	No	Matraz	4.7	No
9	20 %	20	No	Matraz	4.7	No
10	20 %	13	No	Matraz	4.7	No
11	1 %	8	NA	Matraz	4.8	300 rpm
12	2 %	14	NA	Matraz	4.8	300 rpm

Notas: ^a Concentración de sustrato FORSU en ST, ^b relación carbono/nitrógeno, ^c pH inicial

En los experimentos (ii) se compararon las producciones enzimáticas a partir de FORSU y de sustratos celulósicos refinados como Solka flocc y papel filtro (controles). Los experimentos (iii) utilizaron como sustrato los sólidos fermentados o sólidos digeridos provenientes de las etapas H y M respectivamente. Por último, los experimentos (iv) utilizaron sólidos fermentados para la producción enzimática a escala fermentador Sixfors (Infors HT, Suiza) de 500 mL.

Las condiciones de operación para los experimentos en FSS, en FCS y a nivel fermentador se muestran en la Tabla 29.

El análisis de significancia entre ensayos se realizó mediante la prueba *t* ocupando el software SigmaPlot v11.0 (Systat Software, Inc., Germany).

Tabla 29. Condiciones de ensayos de producción enzimática

Parámetro	FSS	FCS nivel matraz	FCS nivel fermentador
Temperatura (°C)	30	30	30
pH del cultivo	6.4 – 4.7	4.8	4.8
N (rpm)	Volteo - ninguna	250	300
Aireación	Convección	Convección	> 20
[O ₂]	-	-	> 20
Tiempo de incubación (d)	6 – 9	6 – 8	6 – 8
Sustratos y concentración	FORSU: 75 – 85 %ST	FORSU 1, 2, 3 %SV SD 1 %SV SF 1 %SV Solka flocc 2 %SV Papel filtro 1 %SV	SF 1.5 %SV
C/N	14 – 40	8 - 13.7	8 - 13.7

6.5.3. Programa de seguimiento y análisis

Los análisis para los experimentos con *T. reesei* MCG 80 se enlistan en la Tabla 30.

Tabla 30. Análisis y seguimiento de la producción enzimática

Parámetro	<i>T. reesei</i> MCG 80
Proteína soluble ¹	Por muestra
Xilanasas ²	Por muestra
CMCx ²	Por muestra
FPx ³	Por muestra
β-glucosidasa ⁴	Muestras selectas
SV, ceniza	Al final del experimento
Lignina ⁵	Al final del experimento
Hemicelulosa ⁵	Al final del experimento
Celulosa ⁵	Al final del experimento

Notas: ¹ Lowry *et al.* (1951); ² Método Miller (1959); ³ Mandels *et al.* (1974); Wang *et al.* (2010) ⁵ AOAC, 1984; N/A, no aplica

6.5.4. Métodos y procedimientos

6.5.4.1. Sustratos

A los sustratos provenientes del proceso H-M se les realizó un lavado para eliminar ácidos orgánicos y otros productos de la fermentación/digestión anaerobia. El lavado se realizó en matraz Erlenmeyer, primero utilizando etanol grado industrial en una relación 10% $p_{\text{sólidos secos}}/V_{\text{etanol}}$ con agitación a 120 rpm durante 10 min. Se filtraron los sólidos y se realizó otro lavado con agua destilada en ebullición en una relación 10% $p_{\text{sólidos secos}}/V_{\text{ag ebul}}$ con agitación a 120 rpm durante 10 min. Posteriormente se filtraron los sólidos y se secaron a 60 °C, 24 h para eliminar toda humedad. En la Tabla 31 se enlistan las características de los sustratos.

El FORSU fresco también usado como sustrato en los experimentos no recibió pretratamiento. Tanto los sólidos lavados como el FORSU se esterilizaron a 121 °C, 15 min en el medio mineral, adicionando el extracto de levadura en la última esterilización. Se realizaron pruebas de esterilidad en cajas Petri con medio BHI y agar al 1.5 %p/v.

Tabla 31. Características fisicoquímicas de los sustratos

Parámetro	FORSU	SF ^a	SD ^b
Sólidos volátiles _{bs} (%)	85.8 ± 0.24	81.6 ± 0.33	30.3 ± 0.20
Ceniza _{bs} (%)	14.2 ± 0.24	18.4 ± 0.24	69.7 ± 0.24
Celulosa _{bs} (%)	46.6 ± 0.96	66.2 ± 0.24	14.8 ± 0.81
Celulosa _{bsV} (%)	54.3 ± 0.96	81.1 ± 0.24	48.8 ± 0.81
Holocelulosa _{bs} (%)	77.7 ± 0.24	71.6 ± 0.24	16.9 ± 0.24
Lignina _{bs} (%)	8.1 ± 0.98	9.9 ± 0.24	13.5 ± 0.51
pH	6.41 ± 0.05	7.43 ± 0.04	10.48 ± 0.05
Nitrógeno Kjeldahl (%)	0.69 ± 0.1	0.84 ± 0.11	1.10 ± 0.09
Fósforo (mg/kg bh)	1848 ± 203	43 ± 3.8	132 ± 18
Alcalinidad (mgCaCO ₃ /kg bh)	2956 ± 750	2309 ± 45	3595 ± 323

Notas: ^a sólidos fermentados lavados, ^b sólidos digeridos lavados

6.5.4.2. Reactivación y propagación la cepa *T. reesei* MCG 80

Para reactivar la cepa de *T. reesei* MCG 80, se tomó 1 mL de una suspensión de esporas almacenada a -80 °C y se inoculó en un matraz Erlenmeyer conteniendo 50 mL de medio Mandels y metales traza (Tabla 32) al 1 % p/v de dextrosa. La incubación se realizó a 30 °C y 100 rpm por 6 d. Tras los 6 d de incubación, se tomaron alícuotas de 0.1 mL del cultivo y fueron plaqueadas en cajas Petri con agar papa-dextrosa (Bioxon, Becton Dickinson, México). Tras 9 días de incubación a 30 °C se recolectaron las esporas, o en su defecto las placas se mantuvieron en refrigeración a 4 °C no más de tres meses, tiempo después del cuál fueron reactivadas y reinoculadas en caja Petri.

Para la recuperación de las esporas de las cajas Petri, se adicionaron 4 mL de solución salina estéril de NaCl 0.85 % y Tween 80 al 0.1 %v/v sobre la superficie de la caja, frotándola con una varilla estéril de vidrio. Después se filtró la solución de esporas a través de un tubo Falcon de 15 mL adaptado con fibra de vidrio, con el fin de remover micelio que pudo haber sido desprendido por el frote con la varilla de vidrio. Se enjuagó la fibra de vidrio con 1 mL de la misma solución salina estéril para desprender las esporas que se hayan quedado adheridas, y se remueve la fibra del tubo Falcon. El filtrado se centrifugó a 10 000 rpm, 10 min, 4 °C y se decantó el líquido. Se agregaron 5 mL de la misma solución salina para lavar las esporas repitiéndose la centrifugación y decantación. Finalmente se resuspendieron las esporas en 5 mL de la solución salina con 0.1% Tween

80. La suspensión con esporas se almacenó a 4 °C para la inoculación de unidades experimentales o cultivos madre, según fuera requerido.

Tabla 32. Composición del medio mineral para el crecimiento de *T. reesei* en medio líquido y en sustrato sólido

Compuesto	Medio líquido (g/L)	Sustrato sólido (g/L)
Urea	0.3	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4	1.4
KH ₂ PO ₄	2	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3	0.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	0.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005	0.005
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.001	0.00156
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	0.00167
CoCl ₂	0.002	0.002
Peptona	1	5, 25, 65
Tween-80	1	1

El conteo de esporas se realizó tomando una alícuota de la suspensión lavada de esporas, que a continuación se diluyó 1:100 con solución de glicerol al 1 %p/v. Con 10 µL de esta dilución se llenó la cámara de Neubauer. Se contaron cuatro cuadrículas (25 cuadros por cuadrícula) observando al microscopio con objetivo 10X. El promedio de esporas se multiplicó por 10 000 y por la dilución, obteniendo así el número de esporas por mililitro. Con base en este número se determinó la dilución necesaria para obtener un inóculo de $1 \times 10^{6-7}$ esporas/mL.

6.5.4.3. Producción enzimática con *T. reesei* MCG 80

Para la FSS, las unidades experimentales se inocularon con $1 \times 10^6 - 10^7$ esporas/mL de *T. reesei* MCG 80 por cada 5 g de sustrato base seca (Kumar *et al.*, 2008, Xin & Geng, 2010) y se ajustó la humedad con medio Mandels descrito en la Tabla 28. De acuerdo al diseño experimental de un factor a la vez, en este tipo de fermentación se evaluó el control de humedad, mezclado, tipo de biorreactor, contenido de ST, pH inicial y contenido de nitrógeno. Los ensayos de control de humedad se realizaron utilizando un

arreglo de cajas Petri concéntricas, una de 10 cm de diámetro dentro de la otra de 15 cm de diámetro (ensayos 1 y 2, Tabla 28). El control de humedad se realizó adicionando una solución de glicerol al 10% en el espacio entre la caja Petri interior y la exterior (ensayo 2).

Para la FCS de *T. reesei* MCG 80, la propagación de la cepa se inició en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Mandels (Tabla 32) y 1 % p/v Solka flocc, que se inocularon con 1 mL de una suspensión $2 - 4 \times 10^6$ esporas/mL de *T. reesei* MCG 80 (Kumar *et al.*, 2008, Xin & Geng, 2010). Posteriormente la propagación se continuó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con volumen de operación de 50 mL con la misma composición del medio Mandels (Tabla 32), que fueron inoculados en una relación 1:10 v/v con suspensión micelial de 6 d de crecimiento, equivalente a 45 mg SSV y a 2 mg NKT (Tabla 33). Aunque en los matraces problema se variara la fuente de carbono, la composición de medio mineral e inoculación era la misma que para los matraces de propagación.

El crecimiento en fermentadores se realizó utilizando como sustrato los SF a 1.5 %SV, inoculados a una relación 1:10 v/v con suspensión micelial de 6 d de crecimiento (Tabla 29). Los reactores tipo Sixfors (Infors HT, Suiza) tuvieron un volumen de trabajo de 450 mL, con agitación proporcionada por dos propelas Rushton de 6 paletas cada una. El pH se midió con electrodo Fermprobe (Broadly-James Corp., EUA).

A todas las fermentaciones se les realizó prueba de pureza en PDA y/o BHI en los tiempos iniciales y finales. Se les realizó seguimiento por visualización en microscopio, vertiendo 20 μ L de micelio en suspensión en un portaobjetos, dejándolo secar a temperatura ambiente, fijando con ácido acético 40%, secando nuevamente y tiñendo con una gota de azul de lactofenol.

Tabla 33. Caracterización típica del inóculo madre

Parámetro	
Sustrato	Solka flocc
Tiempo de incubación	6 d
SST (mg/mL)	9.73 ± 0.85
SSV (mg/mL)	9.35 ± 0.63
Nitrógeno (mgN/gbs)	42.5 ± 5.7

6.5.4.4. Análisis

En las muestras sólidas provenientes de la FSS, se recuperaron las enzimas por extracción diluyendo el sustrato fermentado en una relación 1:20 con una solución amortiguadora 0.05 M de citratos (pH 4.8), agitando a 250 rpm, 1 h 30 min, 30 °C. Se centrifugó a 10 000 rpm, 10 min, para separar extracto enzimático de la biomasa (Kumar *et al.*, 2008; Xin & Geng, 2010).

Las muestras líquidas provenientes de la FCS se centrifugaron a 10 000 rpm y 10 min para recuperar el sobrenadante que se utilizó para las determinaciones enzimáticas y de proteína extracelular.

Las determinaciones enzimáticas de xilanasas (Xx), endocelulasas (CMCx) y celulasas (FPx) se realizaron midiendo los azúcares reductores liberados por el método del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959), de acuerdo a Mandels *et al.* (1974). Las actividades se expresaron en Unidades Internacionales (UI), definidas como micromoles de D-xilosa o glucosa (determinados como azúcares reductores) liberados por minuto bajo condiciones estándar de ensayo (Tabla 34). La cuantificación de azúcares reductores se realizó midiendo la absorbancia a 550 nm, y comparándolo contra curvas estándar del correspondiente azúcar.

La Xx se determinó por medio de la reacción de la solución enzimática diluida en amortiguador citratos-fosfatos 0.05 M (Na_2HPO_4 dodecahidratado: 25.43 g /L; ácido cítrico monohidratado: 3.04 g/L, pH 6.5) sobre 1 % de xilana de abedul incubada a 40 °C por 10 min (Ghose & Bisaria, 1987).

La actividad enzimática de las endoglucanasas (CMCx) se midió por la reacción de la solución enzimática diluida en amortiguador citratos 0.05 M (ácido cítrico monohidratado: 4.388 g/L; citrato de sodio dihidratado: 8.562 g/L, pH 4.8) sobre 1 % de carboximetilcelulosa a 50 °C, 30 min (Ghose, 1987).

La actividad en papel filtro (FPx) cuantificó la hidrólisis del sustrato por la acción sinérgica de las celulasas en amortiguador citratos 0.05 M pH 4.8, y se expresa como los micromoles de glucosa liberada por minuto de la hidrólisis de 50 mg de papel filtro Whatman No. 1 por 0.5 mL del extracto enzimático diluido, durante 1 h a 50 °C (Duff & Murray, 1960; Mandels *et al.*, 1976; Eveleigh *et al.*, 2009).

La actividad de β -glucosidasa se determinó con la liberación de nitrofenol a partir de la hidrólisis de 0.95 mL de solución 1mM de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p*-NPG) como sustrato. La reacción se llevó a cabo a 50 °C, 30 min en amortiguador de citratos pH 4.8. La reacción se detuvo por la adición de 1 mL de solución 1 M de Na₂CO₃, la absorbancia se leyó a 405 nm y se comparó contra una curva estándar de nitrofenol. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de nitrofenol por min (Wang *et al.*, 2010).

Todas las actividades enzimáticas volumétricas se determinaron ocupando la siguiente ecuación general:

$$Az = \frac{m_{\text{sustrato}} * 1000}{PM_{\text{sustrato}} * V_{\text{alícuota}} * t_{\text{reacción}}} \quad [23]$$

donde Az es la actividad enzimática ensayada (U/mL), m_{sustrato} es la cantidad de sustrato liberado (μ g) calculado a partir de la comparación de la absorbancia del ensayo contra su respectiva curva estándar, PM_{sustrato} es el peso molecular del sustrato (180 μ g/ μ mol para glucosa, 150.14 μ g/ μ mol para xilosa, 138 μ g/ μ mol para nitrofenol), $V_{\text{alícuota}}$ es el volumen de alícuota del extracto enzimático (μ L), y $t_{\text{reacción}}$ es el tiempo durante el cual se llevó a cabo la reacción enzimática (min).

Tabla 34. Condiciones de ensayo para las determinaciones enzimáticas

Actividad enzimática	Sustrato	Tr ^a (°C)	Vr ^b (mL)	tr ^c (min)	Amortiguador	Ref
FPx	Papel filtro	50	1.5	60	0.05 M citratos pH 4.8	1
CMCx	CMC	50	0.5	30	0.05 M citratos pH 4.8	2
Xx	Xilana de abedul	40	1	10	0.05 M citratos-fosfatos pH 6.5	3
β -glucosidasa	<i>p</i> -NPG	50	0.5	15	0.05 M citratos pH 4.8	4

Notas: ^a temperatura de reacción, ^b volumen de reacción, ^c tiempo de reacción.

Referencias: 1, Mandels *et al.* (1974); 2, Ghose (1987); 3, Ghose & Bisaria (1987); 4, Wang *et al.* (2010).

La proteína extracelular se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951). Una alícuota de la muestra enzimática se mezcló con 0.5 mL de NaOH 1N y se sometió a baño María por 5 min. Tras su enfriamiento a temperatura ambiente, se adicionaron 2.5 mL del reactivo C (preparado con 50 mL Na₂CO₃ al 5 %, 1 mL de CuSO₄ al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2 %), dejando reposar 10 min y agregando finalmente 0.5 mL de

reactivo de Folin 1N (Sigma-Aldrich, EUA) agitando vigorosamente. Se dejó reposar por 30 min para desarrollar el color y leer absorbancia a 750 nm. La absorbancia registrada se comparó contra una curva estándar realizada con albúmina de suero bovino en el intervalo de 0 a 500 µg (Sigma-Aldrich, E.U.A).

Los análisis de composición de ST, SV, celulosa, hemicelulosa, lignina y NKT, se realizaron de acuerdo a lo descrito en las secciones 6.2.4.5 y 6.2.4.6.

6.5.4.5. Recuperación y concentración del extracto enzimático

Después de los 6 d de incubación para *T. reesei* MCG 80 crecida en SF en reactores tipo Sixfors (Infors HT, Suiza) se realizó la separación y concentración del extracto enzimático de holocelulasas. Primero se separó la biomasa del extracto enzimático por centrifugación a 8 000 rpm, 25 min y 4 °C (Beckman J2-21, Beckman Coulter, EUA). A continuación se recuperó el extracto enzimático por decantación y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. Nuevamente se recuperó el extracto enzimático por decantación y se concentró a un volumen final aproximadamente diez veces menor del inicial, con una celda de ultrafiltración Amicon 8400 (Amicon Inc, EUA) y una membrana PM-10 (10 kDa). Este concentrado enzimático (Extracto Tr) se almacenó a 4 °C hasta su uso en la Actividad 4 o Etapa S.

6.6. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80

6.6.1. Propósito

Evaluar el potencial de sacarificación de los materiales lignocelulósicos involucrados en las Etapas H y M del modelo de biorrefinería usando los extractos enzimáticos de la Etapa Z y enzima comercial.

6.6.2. Diseño experimental

Esta actividad comprendió dos sub-actividades de sacarificación. La primera sub-actividad (SS-1) siguió un diseño experimental 3x2, que tuvo como propósito evaluar dos factores: tipo de sustrato y tipo de enzimas holocelulolíticas (Tabla 35). Los sustratos utilizados fueron FORSU, SF y papel filtro Whatman No. 1. Como enzimas holocelulósicas se utilizaron el extracto enzimático de la Etapa Z (Extracto Tr, ver sección 6.5.4.5.) y celulasa comercial Celluclast (Sigma-Aldrich, EUA). No se utilizaron los SD de la Etapa M por su bajo contenido de holocelulosa y por el mal desempeño demostrado como sustrato de la Etapa Z.

Como segunda sub-actividad (SS-2), el material lignocelulósico con mayor potencial de sacarificación se sometió a ensayos a diferentes relaciones enzima:sustrato (40, 60, 80, 100 y 120 FPU/gSV). Después de la sacarificación, se midió actividad enzimática residual en el medio líquido de cada ensayo.

Tabla 35. Diseño experimental de la sub-actividad de sacarificación de diferentes sustratos (SS-1)

Ensayo	Sustrato	Enzima
1	FORSU	Extracto Tr
2		Celluclast
3	Sólidos fermentados de la etapa H	Extracto Tr
4		Celluclast
5	Papel filtro (Control)	Extracto Tr
6		Celluclast

Notas: Extracto Tr, es el extracto enzimático concentrado proveniente de la Etapa Z; Celluclast, enzima comercial (Sigma-Aldrich, EUA).

El análisis estadístico se realizó con el software Design-Expert v7.1.6 (Stat-Ease Inc., Mineapolis). El análisis de significancia entre ensayos se realizó mediante la prueba t ocupando el software SigmaPlot v11.0 (Systat Software, Inc., Germany).

6.6.3. Programa de seguimiento y análisis

Se realizaron los análisis mostrados en la Tabla 36 a los sustratos pretratados y a muestras de las cinéticas de sacarificación. Los resultados se transformaron en las variables de respuesta mostradas en la Tabla 37.

Tabla 36. Análisis y seguimiento de pretratamiento y sacarificación

Parámetro	Pretratamiento	Sacarificación
FPx residual	NA	Tiempo final
Azúcares reductores	1 vez al lote	Tiempo inicial y final
pH	1 vez al lote	Tiempo inicial y final
Glucosa	1 vez al lote	4, 16, 24, 48 y 72 h
Xilosa	1 vez al lote	4, 16, 24, 48 y 72 h
Lignina	1 vez al lote	Al final del experimento
Hemicelulosa	1 vez al lote	Al final del experimento
Celulosa	1 vez al lote	Al final del experimento

Tabla 37. Variables de respuesta para evaluar el desempeño de la Etapa S

Variables de respuesta	Unidades	Fórmula	Ecuación
Concentración de glucosa más xilosa	g/L	$[GX] = [glucosa] + [xilosa]$	24
Relación xilosa/glucosa	-	$X/G = \frac{[xilosa]}{[glucosa]}$	25
Eficiencia de sacarificación en base SV	% _{bSV}	$\eta_{s,SV} = \frac{[GX]}{[SV]_{sustrato} [sustrato]} * 100$	26
Eficiencia de sacarificación en base holocelulosa	% _{bholocel}	$\eta_{s,h} = \frac{[GX]}{[Holocelulosa]_{sustrato} [sustrato]} * 100$	27
Rendimiento de sacarificación	g azúcares/FPU	$Y_s = \frac{[GX] * Vr}{EL * m_{SV}} * 100$	28

Notas: [glucosa], concentración de glucosa (g/L); [xilosa], concentración de xilosa (g/L); [SV]_{sustrato}, concentración de sólidos volátiles en el sustrato (%); [sustrato], concentración de sustrato (g/L); [Holocelulosa]_{sustrato}, concentración de holocelulosa en el sustrato (%); Vr, volumen de reacción (L); EL, carga enzimática (FPU/g SV); m_{SV}, cantidad de SV (g SV).

6.6.4. Métodos y procedimientos

6.6.4.1. Sacarificación

En la SS-1, se sacarificaron SF, FORSU y papel filtro de acuerdo a la metodología de la NREL (Selig *et al.*, 2008) como se describe a continuación. Las reacciones de sacarificación se realizaron a 50 °C, 150 rpm por 72 h. La concentración de los sustratos fue 2 %SV. Para este fin se utilizaron matraces de 125 mL a un volumen de reacción de 25 mL con amortiguador citratos 0.05 M (ácido cítrico monohidratado: 4.388 g/L; citrato de sodio dihidratado: 8.562 g/L, pH 5.0). La carga del extracto enzimático y de la celulasa comercial Celluclast (Sigma-Aldrich, EUA) se realizó en una relación de 60 FPU/g SV de sustrato.

Para la SS-2, los experimentos se realizaron en tubos de ensaye con 10 mL de volumen de operación a 50 °C, 150 rpm por 72 h. Como sustrato se utilizó SF a 2 %SV. Se evaluaron las relaciones enzima:sustrato de 40, 60, 80, 100 y 120 FPU/g SV, teniendo como sustrato los SF y como enzima el Extracto Tr. Como control se utilizó celulasa comercial Celluclast en una relación de 60 FPU por gramo de SV. Al finalizar la sacarificación se tomó una alícuota de los sacarificados centrifugados y se les registró actividad de FPx, la cuál se consideró como la actividad enzimática residual.

6.6.4.2. Análisis

Los análisis de celulosa, hemicelulosa y lignina se realizaron de acuerdo a lo reportado en la sección 6.2.4. Los azúcares reductores y las determinaciones de actividad enzimática y actividad enzimática residual se efectuaron de acuerdo a la sección 6.5.4.4. Se determinó el porcentaje de recuperación enzimática (FPx,r) dividiendo la actividad enzimática residual en los sacarificados (FPx,f) sobre la actividad enzimática inicial (FPx,i):

$$FPx,r [\%] = \frac{FPx,f [FPU/mL]}{FPx,i [FPU/mL]} * 100 \quad [29]$$

Los análisis de los productos de sacarificación medidos como glucosa y xilosa se realizaron usando un analizador bioquímico YSI 2700 Select (YSI Inc., OH, EUA).

6.7. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos

6.7.1. Propósito

Realizar una evaluación de sistemas sobre el modelo de biorrefinería H-M-Z-S, bajo un enfoque de los recursos utilizados, energía generada, productos obtenidos y desechos producidos.

6.7.2. Diseño experimental

Basado en la metodología LCA (ISO 14044, 2007), en los programas especializados SimaPro v7.1.8 (PRé Consultants, Países Bajos) y EASEWASTE (DTU, Dinamarca), y el método CML 2001 (Center of Environmental Science of Leiden University, Países Bajos), se realizó la evaluación de sistemas Recursos-Energía-Productos-Desechos (ES-Reprode). El ES-Reprode cumplió los siguientes pasos:

1. Definición de objetivo y alcance
 - 1.1. Objetivo
 - 1.2. Selección de unidad funcional
 - 1.3. Límites del sistema
2. Inventarios del ciclo de vida (LCI)
 - 2.1. Selección de datos experimentales de la biorrefinería H-M-Z-S
 - 2.2. Balances de masa
 - 2.3. Balances de energía
3. Evaluación de impactos de ciclo de vida
4. Análisis de resultados

6.7.3. Definición de objetivo y alcance

6.7.3.1. Objetivo

El objetivo fue realizar una evaluación de sistemas para el modelo de biorrefinería H-M-Z-S, que permita determinar la factibilidad ambiental y energética del proceso, e identificar áreas de oportunidad. La evaluación se abordó desde un punto de vista de producción y consumo de energía, y generación o ahorro de gases de efecto invernadero (GEI), a partir

de tres etapas iterativas: balance de masa, balance de energía y evaluación de impactos de ciclo de vida.

6.7.3.2. Unidad funcional

La unidad funcional fue 1 ton de FORSU con 20 % de sólidos totales preparada conforme a lo descrito en la sección 6.2.4.1.

6.7.3.3 Límites del sistema

A continuación se describen los límites para cada sección del ES-Reprode.

6.7.3.3.1. Recursos

El recurso principal del sistema fue la FORSU al 20 % ST. Al ser la FORSU un residuo de las actividades humanas, no se consideraron emisiones directas ni indirectas de GEI ni consumo de energía debido a su generación. Como se supone que la biorrefinería se encontrará lo más cerca del punto de generación de la FORSU, el transporte se considerará al mínimo (100 m). Se tomarán en cuenta estas emisiones de GEI, así como el acondicionamiento y tratamiento del FORSU.

Como recursos secundarios se consideraron agua (para el acondicionamiento del FORSU, para absorción de CO₂, para el lavado de los SF, para amortiguadores y para el medio de cultivo de *T. reesei*), sales y compuestos (para amortiguadores y medio de cultivo de *T. reesei*).

6.7.3.3.2. Energía

Se calculó la generación de energía a partir de celdas de combustible para el hidrógeno producido en la Etapa H ($\eta_{\text{eléctrica}} = 80 \%$), y de una planta de ciclo combinado para el metano producido en la Etapa M ($\eta_{\text{eléctrica}} = 55 \%$, $\eta_{\text{calórica}} = 20 \%$). Los consumos de electricidad y energía por transporte y operación de los procesos, se obtuvieron de las librerías de SimaPro, cálculos a partir de los datos experimentales de la biorrefinería H-M-Z-S, y de los reportes en literatura.

6.7.3.3.3. *Productos*

Como productos se consideraron:

- Etapa M: SD como mejorador de suelos en tierras de cultivo.
- Lavado de SF: lixiviados como insumos industriales.
- Etapa Z: sólidos re-fermentados (SRF) y biomasa como alimento para ganado, concentrado enzimático como insumo para procesos de sacarificación y los filtrados como suplemento en medios de cultivo.
- Etapa S: sólidos hidrolizados (SH) como suplemento de sustrato para procesos biológicos, sacarificados como sustrato para la obtención de etanol.

6.7.3.3.4. *Desecho*

Se consideraron las emisiones directas e indirectas de GEI de origen fósil por abasto adicional de energía, cuando la energía (calórica y/o eléctrica) proporcionada por las etapas H y M no fue suficiente para abastecer los requerimientos de la biorrefinería. Además se tomaron en cuenta las emisiones fugitivas de metano y generación de NOx y SOx por efecto de los procesos de combustión.

6.7.4. *Análisis de inventarios de ciclo de vida*

Como parte del análisis de inventarios de ciclo de vida, se seleccionaron los resultados más significativos de las actividades experimentales del proceso H-M-Z-S (Tabla 38). Con base en estos datos se realizaron los correspondientes balances de masa (Tabla 39) y energía (Tabla 40).

El inventario de emisiones se realizó a partir de los datos de procesos seleccionados de las librerías del programa SimaPro v7.1.8 (PRé Consultants, 2008), elegidos de acuerdo a su similitud con los procesos propuestos para el modelo biorrefinería H-M-Z-S a escala industrial.

Tabla 38. Condiciones experimentales y resultados seleccionados de la biorrefinería H-M-Z-S

FORSU	H – semi-continuo	M – semi-continuo
Papel 40 %p/p y RSO 60 %p/p 20 %ST	Alimentación: FORSU 20 %ST T = 55 °C TRM = 21 d I = 250 NmL H ₂ /kg _r /d [H ₂] = 30 % Êp = 256 kJ/kg _{bs}	Alimentación: SF 18.4 %ST T = 55 °C TRM = 28 d I = 2 200 NmL CH ₄ /kg _r /d [CH ₄] = 65 % Êp = 11 800 kJ/kg _{bs}
FS lavados	Z - fermentador	S - lote
T = 60 °C N = 120 rpm t = 10 min 80 %ST	Alimentación: SF 1.5 %SV N = 450 rpm T = 30 °C t _{op} = 4 d FPx: 1 611 FPU/L CMCx: 1 067 IU/L Xilanasas: 3 113 IU/L	Alimentación: SF 8.6 ^a %SV Carga enzimática: Ext Tr N = 150 rpm T = 50 °C t _{op} = 48 h η _{s,h} ^b = 74.6 %

Notas: RSO, residuos sólidos orgánicos; ^a valor extrapolado; ^b eficiencia de sacarificación en base holocelulosa.

Tabla 39. Descripción de entradas y salidas del balance de masa

Etapa	Entradas	Salidas
H	FORSU 20 %ST, amortiguador de acondicionamiento (fosfatos), solución de monoetanolamina.	SF, pérdidas por evaporación, H ₂ , CO ₂ , solución de monoetanolamina.
M	SF, solución de monoetanolamina.	SD, pérdidas por evaporación, CH ₄ , CO ₂ , solución de monoetanolamina.
Z	SF, agua de lavado, inóculo, medio Mandels.	Lixiviados, sólidos re-fermentados, concentrado enzimático, filtrados.
S	SF, agua de lavado, concentrado enzimático, amortiguador de citratos.	Lixiviados, sólidos hidrolizados, concentrado enzimático reciclado, sacarificados.

Tabla 40. Descripción de consumos y producción de energía

Etapa	Consumo	Producción/recuperación
Recolección/ acondicionamiento	Transporte de FORSU, molienda, mezclado, bombeo del FORSU al almacenamiento.	NA
H	Transporte de FORSU al reactor, intercambiador de calor, calentamiento del reactor, purificación y compresión del hidrógeno.	Conversión del H ₂ a electricidad en celda de combustible.
Lavado de sólidos	Transporte de SF, 2 filtro prensa, 2 mezclador, filtro rotatorio, calentamiento del agua de lavado, transporte de SF _L al almacenamiento.	Recuperación de calor de lixiviados.
M	Transporte de SF al reactor, intercambiador de calor, calentamiento del reactor, compresión y purificación del metano, bombeo de SD	Combustión del CH ₄ en planta de ciclo combinado para producción de electricidad y vapor. Recuperación de calor de SD.
Z	Transporte de SF _L al reactor, bombeo del inóculo, bombeo del medio, calentamiento del reactor, bombeo a centrífuga, operación de centrífuga, bombeo del extracto enzimático, ultrafiltración, bombeo de sólidos refermentados	NA
S	Transporte de SF _L al reactor, bombeo de extracto enzimático, bombeo del amortiguador, intercambiadores de calor, calentamiento del reactor, bombeo a centrífuga, operación de centrífuga, bombeo del hidrolizado, ultrafiltración, bombeo de sólidos hidrolizados	Recuperación de calor de hidrolizados

Notas: SD, sólidos digeridos; SF, sólidos fermentados; SF_L, sólidos fermentados lavados

6.7.5. Evaluación de impactos de ciclo de vida

La evaluación de impactos de ciclo de vida se desarrolló conforme a los requerimientos para un estudio corto (ISO 14044, 2007). Debido a que las librerías de este programa están realizadas en su mayor parte a partir de datos europeos y por el alcance de este proyecto, no se contempló la recopilación de tecnologías nacionales, los resultados obtenidos en esta evaluación de sistemas son considerados una aproximación y un punto de partida para futuros estudios.

La categorización de impactos se realizó utilizando el método CML 2001 (PRé Consultants, 1998). Se evaluaron seis categorías:

- Agotamiento abiótico de recursos (kg Sb-eq.). Se determinó la extracción de recursos no renovables, como combustibles fósiles y minerales, medidos en equivalentes de antimonio.
- Acidificación (kg SO₂-eq.). Determinó los impactos en suelo, mantos freáticos, cuerpos acuíferos, organismos, ecosistemas y materiales (edificios). Los compuestos involucrados son ácido nítrico, ácido sulfúrico, trióxido de azufre, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfhídrico, óxidos nitrosos y amoníaco.
- Eutroficación (kg PO₄-eq.). Relacionado con niveles excesivos de macronutrientes por emisiones en aire, aguas y suelos.
- Calentamiento global (kg CO₂-eq.). Basado en el modelo desarrollado por el Panel Intergubernamental en Cambio Climático (IPCC). Se seleccionó el potencial de calentamiento global para un horizonte de 100 años.
- Agotamiento de la capa de ozono (kg CFC₁₁-eq.). Se consideró el potencial de diferentes gases, principalmente hidrocarburos con Br, F y Cl (clorofluorocarbonos, ó CFC), en el agotamiento de la capa de ozono, que tiene como consecuencias efectos dañinos en la salud humana y animal, así como daños a ecosistemas terrestres y acuáticos.
- Oxidación fotoquímica (kg C₂H₄-eq.). Es la capacidad sustancias orgánicas volátiles para la formación de sustancias reactivas, principalmente ozono, que son dañinas para la salud humana, ecosistemas e incluso a cultivos agrícolas. Se consideraron alcoholes, cetonas, aldehídos y varios grupos de hidrocarburos.

6.7.5.1. Escenario de comparación

Se realizó la comparación a nivel de impactos ambientales de la biorrefinería contra un modelo de relleno sanitario utilizando la misma unidad funcional de 1 ton FORSU 20 %ST. Las consideraciones iniciales del relleno sanitario fueron:

- Tecnología ubicada en Suiza en el año 2000.
- Considerando materiales orgánicos e inorgánicos, la degradabilidad a lo largo de 100 años es del 18.73 %.

- Se incluyó sistema de recolección de lixiviados, y su respectivo tratamiento en planta tratadora de aguas residuales con recolección de gas.
- Se consideraron emisiones a la atmósfera a corto plazo por la quema del biogás y por los lixiviados. También se consideraron las cargas del tratamiento de los lixiviados a corto plazo (0 – 100 años) en la planta tratadora de aguas (incluyendo la disposición de sus lodos en incinerador municipal). Se incluyeron las emisiones a mantos freáticos a largo plazo debido al rompimiento de la geomembrana.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Actividad 1a. Producción de hidrógeno en sustrato sólido en régimen semi-continuo

7.1.1. Caracterización del sustrato y arranque

La producción de hidrógeno se realizó por digestión anaerobia en sustrato sólido acidogénico (DASS-A), utilizando FORSU como sustrato. El FORSU es un sustrato con un alto contenido de material biodegradable (Tabla 41). La celulosa y la hemicelulosa constituyen aproximadamente el 60 - 70 % del peso en base seca de este material, y el contenido de sólidos volátiles en base seca también es alto, cercano al 90 %.

La FORSU presenta valores adecuados de contenido de nitrógeno y de fósforo para permitir el crecimiento de los microorganismos. Aunque el contenido de nitrógeno en las células anaerobias microbianas es del 11 %_{bs} (considerando que la fórmula empírica de estas células es C₅H₇O₃N), el requerimiento de nitrógeno con base en la demanda química de oxígeno (DQO) es de sólo 6 kg N/1000 kg O₂. A su vez, el requerimiento de fósforo es únicamente el 14 % del nitrógeno requerido (Speece, 1987). Si consideramos que la DQO de una célula anaerobia es 200 g O₂/mol célula, y el peso molecular de dicha célula es 129 g/mol, entonces la relación carbono/nitrógeno (C/N) en un sustrato que cumpliría el requerimiento mínimo de nitrógeno sería de 50 en base celular, o de 67 en base hexosa (peso molecular de la hexosa 180 g/mol, DQO 192 g O₂/mol).

Tabla 41. Caracterización del sustrato

Parámetro	FORSU
Sólidos totales (%)	93.4 ± 0.2
SV (% _{bs})	87.5 ± 0.5
pH	6.87 ± 0.2
Celulosa (% _{bs})	41.2 ± 7.0
Lignina (% _{bs})	9.2 ± 4.6
Hemicelulosa (%)	21.7 ± 3.6
NKT (% _{bs})	0.98 ± 0.1
C/N	50.0 ± 1.5
Fósforo (mg/kg _{bs})	1 848 ± 203
cenizas (% _{bs})	11.9 ± 0.3

De acuerdo al procedimiento de arranque (sección 6.2.4.2), los biorreactores recién inoculados fueron alimentados progresivamente con FORSU desde 100 hasta 35 d de tiempo de residencia másico (TRM). Los biorreactores se mantuvieron bajo estas condiciones de operación hasta el momento en que se realizó el cambio de régimen de operación metanogénica a operación hidrogenogénica. En la Tabla 42 se muestra la caracterización operativa de los biorreactores de arranque.

Tabla 42. Caracterización de los biorreactores de arranque

Parámetro	Mesofílico		Termofílico	
	Biorreactor A	Biorreactor B	Biorreactor C	Biorreactor D
TRM ^a (d)	32	32	32	32
I _{CH₄} ^b (NmL CH ₄ /kgr/d)	875 ± 87	860 ± 153	1 200 ± 24	1 300 ± 449
% _{CH₄} en biogás	56.2 ± 5.1	64 ± 13.6	58 ± 3.3	60.5 ± 2.8
Sólidos totales (%)	23.5 ± 4.6	20.8 ± 2.7	21.4 ± 3.5	21.7 ± 0.4
SV (% _{bh})	6.6 ± 1.2	6.0 ± 0.1	8.0 ± 0.2	7.9 ± 0.0
pH	8.40 ± 0.02	8.35 ± 0.12	7.50 ± 0.01	7.70 ± 0.02
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /kg _{bh})	5 950 ± 306	6 050 ± 259	3 600 ± 636	4 450 ± 1567

Notas: ^a tiempo de residencia másico, ^b productividad de metano.

7.1.2. Operación de la Etapa H

Se evaluaron los efectos del TRM y la temperatura de operación sobre la producción de hidrógeno bajo un diseño experimental 2² (sección 6.2.2). En la Fig. 14 se observa que se presentaron efectos estadísticamente significativos entre los diferentes niveles de los factores TRM y temperatura ($p < 0.06$, Anexo Tabla A1). Los niveles que presentaron la mayor I_{H₂} fueron 21 d TRM y el régimen termofílico.

Las dinámicas de operación en el régimen mesofílico (Fig. 15) mostraron oscilaciones en la productividad de hidrógeno. Este comportamiento se pudo deber a ciclos de acumulación y consumo de ácidos orgánicos, e incluso al régimen de alimentación semi-continua. En el caso de los primeros días de operación hidrogenogénica (< 15 d) estas variaciones se pudieron deber por efecto de aclimatación

al TRM. Las variaciones en la productividad de hidrógeno posteriores al arranque del régimen hidrogenogénico se pudieron asociar principalmente a variaciones en la producción de AOVs, las cuáles influyeron a su vez en la variabilidad del pH, y a la producción de ácido láctico. Hacia los días finales de la operación (> 60 d), en ambos TRM se observaron incrementos y decrementos súbitos en la productividad de hidrógeno, que pudieron estar asociados a un desbalance metabólico.

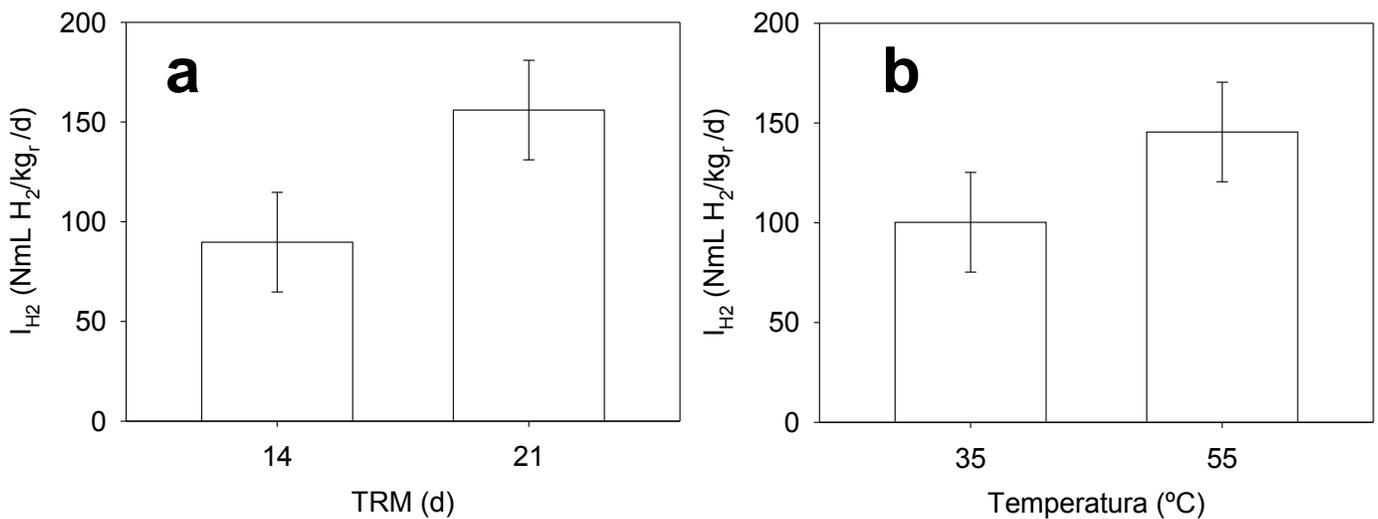


Fig. 14. Efecto del (a) TRM y de la (b) temperatura sobre la productividad de hidrógeno

En el caso de la operación a régimen termofílico (Fig. 16) también se observaron variaciones en la productividad de hidrógeno. A 21 d TRM en termofilia (Fig. 16a), la producción de hidrógeno fue incrementándose con el tiempo de operación y presentó una alta variabilidad en los días finales (20 – 40). A 14 d TRM en termofilia la hidrogenogénesis se mantuvo con escasa variación en los primeros días de operación, pero se observó la inhibición de la producción de hidrógeno a partir del día 23 (Fig. 16b).

Debido a las variaciones de productividad exhibidas en todos los experimentos, se seleccionaron sólo los periodos de operación pseudo-estable para obtener los resultados promedio de operación (Tabla 43). En el caso del régimen mesofílico se discriminaron los primeros 9 días de operación para ambos TRM. Para el régimen termofílico a 21 d TRM se discriminaron los primeros 9 días, mientras que a 14 d TRM el periodo pseudo-estable se consideró del día 4 al 23. En general, el régimen

mesofílico tuvo un mayor periodo de operación pseudo-estable (69 d) que el régimen termofílico (20-31 d).

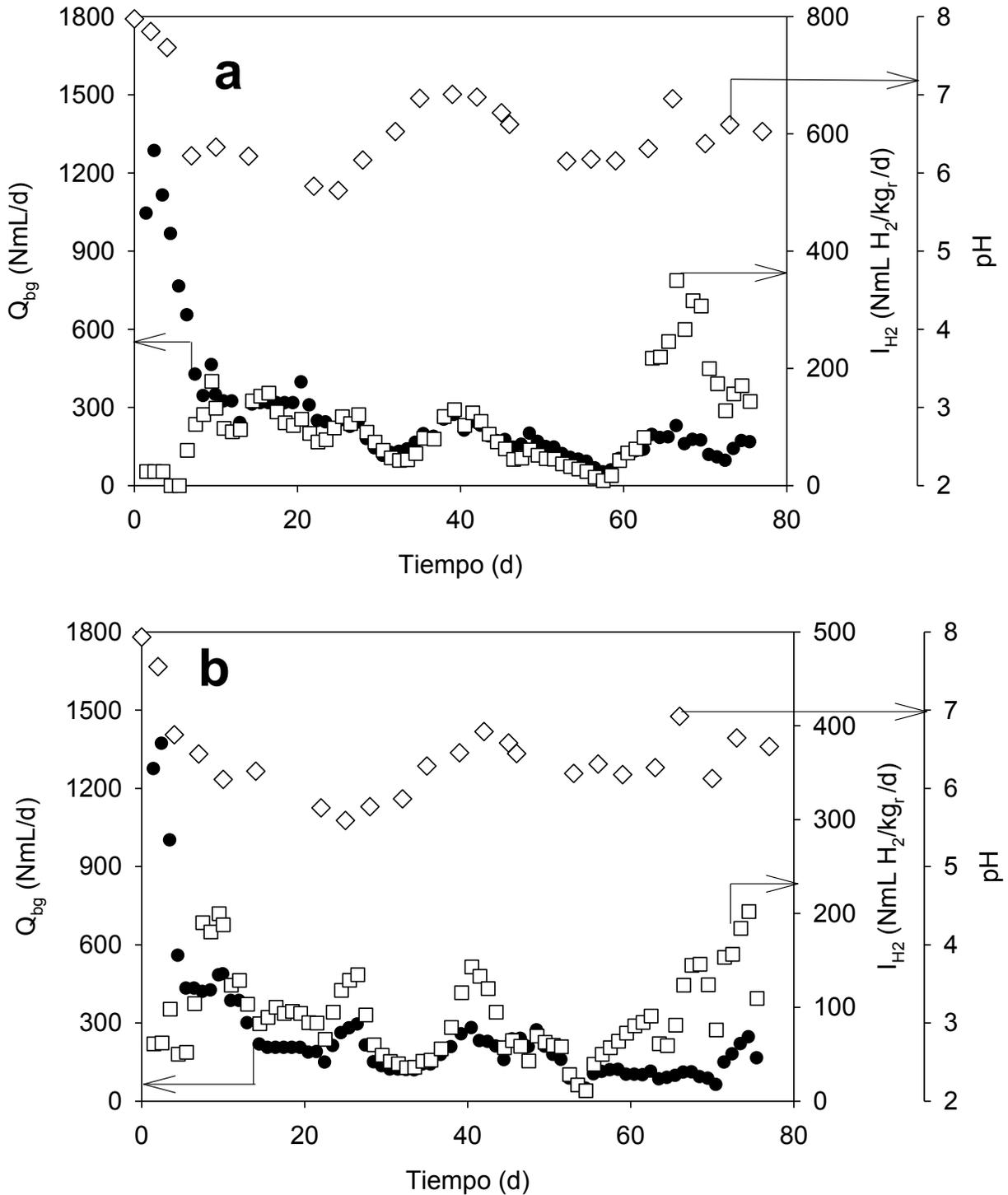


Fig. 15. Dinámicas de producción de biogás, productividad de hidrógeno y pH en régimen mesofílico para (a) 21 d TRM y (b) 14 d TRM; • Producción de biogás, □ productividad de hidrógeno, ◇ pH.

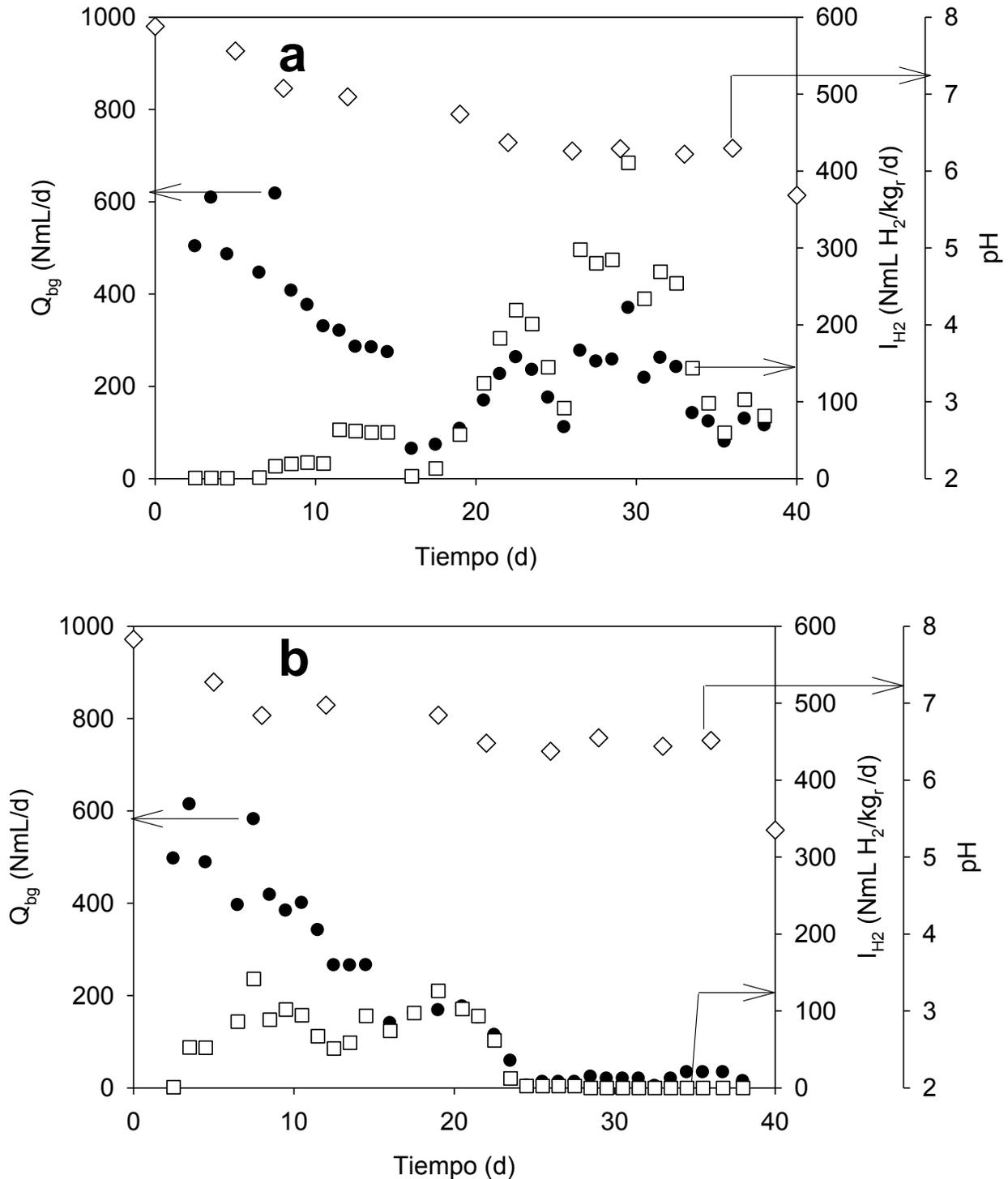


Fig. 16. Dinámicas de producción de biogás, productividad de hidrógeno y pH en régimen termofílico para (a) 21 d TRM y (b) 14 d TRM; • Producción de biogás, □ productividad de hidrógeno, ◇ pH.

En el régimen mesofílico, a 14 y 21 d TRM se obtuvieron bajas variaciones en los valores de la productividad de hidrógeno, así como en las demás variables de respuesta (Tabla 43). En contraste, en el régimen termofílico sí existieron diferencias importantes en la productividad de hidrógeno entre ambos TRM, pues a 21 d la I_{H_2} fue el doble de la obtenida a 14 d TRM. También el contenido de hidrógeno en el biogás fue el doble a 21 d TRM, siendo además el mayor promedio para todas las operaciones (42 % H_2).

Tabla 43. Resultados promedio de la operación hidrogenogénica mesofílica y termofílica

Parámetro	Unidades	Tiempo de residencia másico			
		21		14	
		Mesofílico	Termofílico	Mesofílico	Termofílico
Días en operación pseudoestable	d	69	31	69	20
Hidrógeno en biogás	%	27.2 ± 0.1	42.2 ± 5.4	23.9 ± 8.3	20.0 ± 4.1
Producción de biogás diaria (Q_{bg})	NmL/d	198 ± 27	212 ± 69	187 ± 10	286 ± 4
Productividad de hidrógeno (I_{H_2})	NmL H_2 /kg _r /d	109 ± 12	202 ± 69	91 ± 29	89 ± 24
pH promedio	-	6.43 ± 0.02	6.29 ± 0.12	6.27 ± 0.23	6.74 ± 0.15
DQO debida a ácidos orgánicos ^a	mg DQO/kg _{bh}	16 372 ± 374	7 647 ± 515	15 713 ± 2 546	9 013 ± 1 713
DQO debida a solventes	mg DQO/kg _{bh}	1 403 ± 157	371 ± 18	1 324 ± 280	453 ± 114
Relación AOV/solventes	-	11.7	20.6	11.9	19.9
Alcalinidad ^b	mg $CaCO_3$ /kg _{bh}	2 063 ± 209	1 070 ± 14.1	1 634 ± 686	1 638 ± 371
Relación acético/butírico (A/B)	-	0.75 ± 0.18	0.89 ± 0.06	0.75 ± 0.04	0.85 ± 0.01
Láctico	mg DQO/kg _{bh}	4 972 ± 181	2 924 ± 987	8 443 ± 3 655	5 390 ± 669

Notas: ^a no se incluye en el cálculo la DQO debida a ácido láctico; ^b Total de alcalinidad adicionada en alimentación e intervenciones de pH sobre total de masa alimentada. Los resultados corresponden al promedio de la media de los duplicados en el tiempo de operación. La desviación corresponde a la variación del promedio con los valores de los duplicados.

La mejor productividad promedio de hidrógeno que se logró fue 202 NmL H_2 /kg_r/d a 21 d TRM y 55 °C. La operación a régimen termofílico además de proporcionar una mayor productividad de hidrógeno, puede presentar otras ventajas como una fermentación más

fácilmente establecida y una protección a la contaminación involuntaria por microorganismos que inhiban o alteren la producción de hidrógeno (Ueno *et al.*, 2007; O-Thong *et al.*, 2009). Además se ha sugerido que a temperaturas termofílicas, los microorganismos hidrogenotróficos, que son perjudiciales para el sistema, tienen crecimiento limitado; mientras que en los microorganismos productores de hidrógeno el metabolismo se acelera, pero reducen su formación de biomasa (Karadag, 2011).

La distribución de metabolitos para ambos regímenes se muestra en la Fig. 17. Se observó que el principal metabolito producido fue el ácido láctico para todas las condiciones de operación.

En el régimen mesofílico se obtuvieron mayores concentraciones de metabolitos, principalmente AOVs, que en el régimen termofílico. Se observó que estas concentraciones fueron muy variables durante la operación mesofílica, probablemente reflejo de la mayor pseudo-estabilidad del proceso a esta temperatura.

En el caso del régimen termofílico y con excepción del ácido láctico, la concentración de los metabolitos no excedió los 5 000 mg/kg_{bh}. El ácido láctico presentó unos despuntes en su producción alrededor de los 40 d de operación, sin reflejar alguna relación con el desempeño de productividad. La producción de solventes en ambos regímenes térmicos fue considerablemente baja en comparación con la producción de AOVs. En contraste, otros experimentos de producción de hidrógeno reportan que otro de los metabolitos producidos más abundantes es el etanol, aunque su presencia está relacionada con una pérdida de la hidrogenogénesis (Wu *et al.*, 2005; Karadag *et al.*, 2009).

En trabajos previos utilizando un contenido de ST mayor (35 %ST) a 35 °C y 21 d TRM (Escamilla-Alvarado, 2009), se obtuvo una muy baja productividad promedio de hidrógeno (i.e. 12 NmL H₂/kg_r/d). En dicho caso se observó una fuerte correspondencia entre altas concentraciones de ácido láctico (< 37 000 mg DQO/kg_{mrh}) y bajas productividades de hidrógeno (< 70 NmL H₂/kg_{mrh}/d). Resultados previos del grupo de trabajo de trabajo indican que se pueden alcanzar productividades promedio de 580 NmL H₂/kg_r/d (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005) en fermentación semi-continua de FORSU (35 %ST) a régimen termofílico. En dicho trabajo no se reportó presencia de ácido láctico. Por otro lado, Muñoz-Páez (2008) reportó altas concentraciones de ácido láctico (>100 mg

DQO/g SV) e inhibición de la producción de hidrógeno en diferentes ensayos de fermentaciones de FORSU en lote con venteo intermitente (FASSH-VI) a pH constantes 5.5, 6.0 y 6.5. En dichos experimentos, se obtuvieron producciones acumuladas de hidrógeno de hasta 950 $\mu\text{mol H}_2/\text{g SV}$. Chu *et al.* (2008) realizaron la operación continua de un proceso de dos etapas para la producción de hidrógeno y metano a partir de FORSU (11.7 %ST), reportando que la presencia de las bacterias productoras de ácido láctico dependía del pH y la temperatura. En sus experimentos a pH 5.0, las temperaturas por arriba de 50 °C previnieron la inhibición de ácido láctico. Este reporte es contrario a lo que sucedió para la Etapa H, pues tanto los reactores a temperaturas mesofílicas y termofílicas y pH promedio 6.2 – 6.7 presentaron ácido láctico.

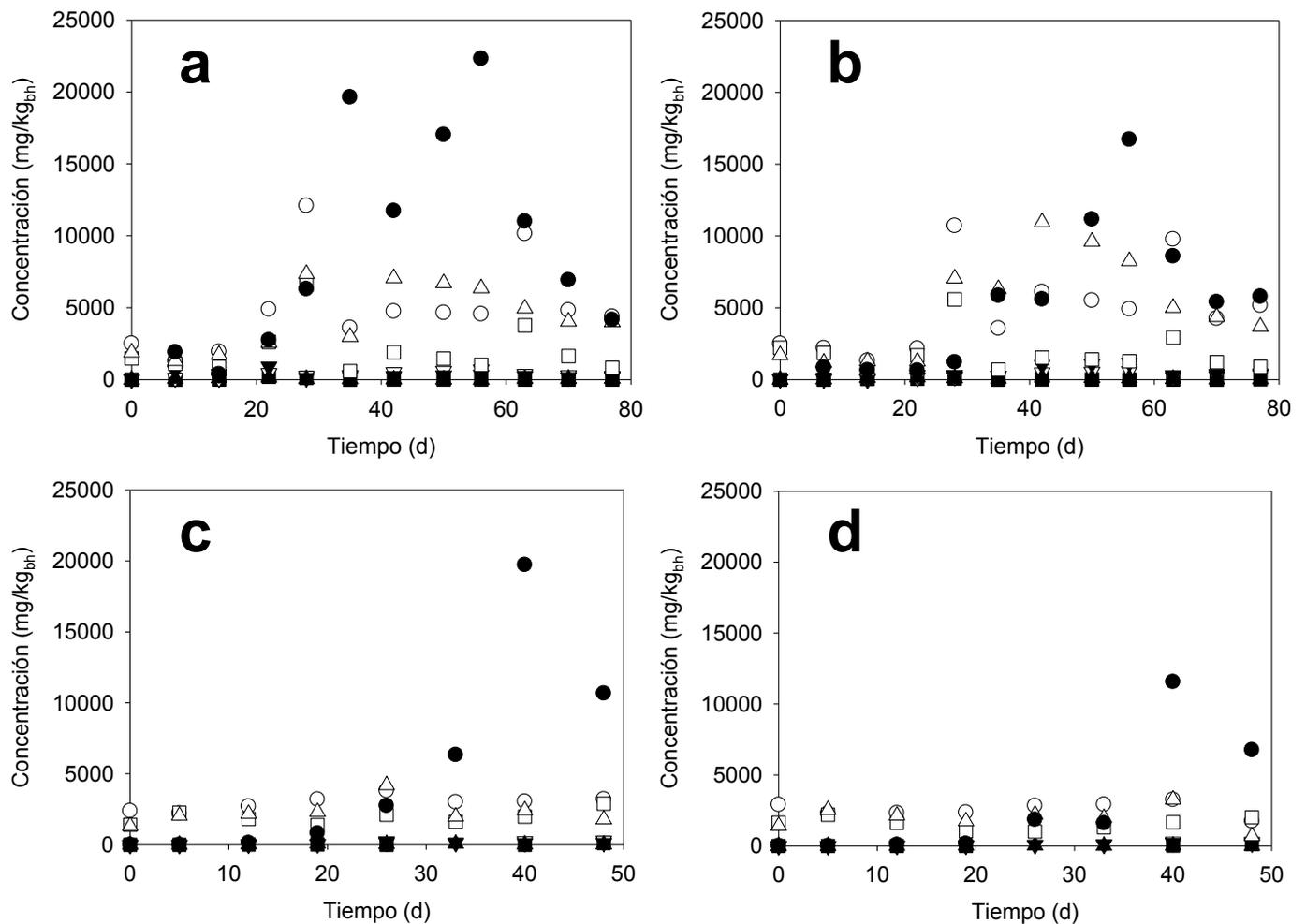


Fig. 17. Distribución de metabolitos en Etapa H. a) mesofilia a 14 d TRM, b) mesofilia a 21 d TRM, c) termofilia a 14 d TRM, d) termofilia a 21 d TRM. Símbolos: ■, acetona; ▽, metanol; ▼, etanol; ▲, butanol; ○, ácido acético; □, ácido propiónico; △, ácido butírico; ●, ácido láctico.

Las causas de las diferentes productividades de hidrógeno que presentaron las condiciones de operación ensayadas de la Etapa H siguen sin estar completamente claras. Escamilla-Alvarado *et al.* (2012) abundaron sobre la fuerte influencia de la producción de ácido láctico con la baja producción de hidrógeno. Esto se observa parcialmente en nuestro caso, pues para 21 d TRM a régimen termofílico, donde la I_{H_2} fue dos veces mayor que la obtenida a régimen mesofílico, hubo una mucho menor concentración de ácido láctico que en régimen mesofílico. Sin embargo, a 14 d TRM donde no hubo diferencia significativa en la I_{H_2} entre ambos regímenes térmicos, el régimen termofílico presentó mayor contenido de ácido láctico. Se observó que un aumento en la concentración de ácido láctico correspondió a menores productividades de hidrógeno (Tabla 43). De esta forma, el biorreactor termofílico a 21 d TRM que presentó la mayor I_{H_2} también presentó la menor concentración de ácido láctico, mientras que el biorreactor mesofílico a 14 d TRM con la menor I_{H_2} presentó el mayor contenido de ácido láctico. A 14 d TRM la carga orgánica fue mayor que a 21 d TRM, lo que pudo haber ocasionado un desbalance en la producción de AOV y solventes. De hecho, la concentración de ácido láctico en estos biorreactores fue muy alta comparada con la reportada en trabajos utilizando FCS. Wang & Zhao (2009) encontraron que el incremento de carga orgánica de alimentación a sus reactores era congruente con la disminución de producción de hidrógeno y de altos contenidos de ácido láctico (2 345 – 4 425 mg/L).

La presencia del ácido láctico en los biorreactores hidrogenogénicos sugiere la presencia de bacterias del ácido láctico (tales como *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus sp.* y *Lactobacillus sp.*), que por un lado ocasionan una desviación láctica por el consumo de iones H^+ para lograr la reducción del piruvato a ácido láctico, así como compiten por el sustrato que las bacterias hidrogenogénicas ocupan para la hidrogenogénesis. Aunado a esto, se debe considerar que las bacterias del ácido láctico pueden producir bacteriocinas, como la nisina y la pediocina, que son proteínas con actividad bactericida dirigida hacia varias bacterias Gram (+), incluidas las del género *Clostridium*.

Al utilizar residuos orgánicos como sustrato, especialmente los residuos agroindustriales, se debe cuidar la relación C/N y el contenido de fósforo en el sustrato para evitar una posible limitación por sustrato. El nitrógeno es necesario para generar biomasa bacteriana, pero un exceso puede ocasionar la formación de amoníaco e

incrementar el pH del medio (Hartmann & Ahring, 2006). En cuanto a los desechos vegetales, éstos contienen altas relaciones carbono/nitrógeno en el intervalo 60 – 90. Para el caso de los residuos sólidos municipales la relación C/N usual es de 76 (Speece, 1987). Sin embargo se ha sugerido que la relación adecuada para la digestión anaerobia es de 25 a 35 (Hills & Roberts, 1981). Por esto, para mejorar la digestión anaerobia de los residuos agrícolas puede ser necesario adicionar nitrógeno en forma de amonio o en forma orgánica, como excreta, urea, desechos de comida, o incluso utilizando microorganismos fijadores de nitrógeno (Lin & Lay, 2004; Hafner 2007). En nuestro caso la relación C/N para el FORSU fue 50 y el contenido de fósforo fue 1 848 (mg/kg_{bs}). Speece (1987) reporta que los biorreactores que promuevan TRM más cortos tienen mayor síntesis celular y por lo tanto mayores requerimientos nutricionales y energéticos. La evaluación del efecto de la adición de nitrógeno para reducir la relación C/N sobre la producción de hidrógeno se evaluó en la siguiente actividad.

Adicionalmente, en la Tabla 44 se muestra la caracterización del acopio de los sólidos fermentados (SF) producidos en la Etapa H, de acuerdo al TRM y temperatura a los cuales se generaron. Las principales diferencias entre los sólidos provenientes de los biorreactores de 21 d TRM comparados con los de 14 d TRM, fueron una mayor alcalinidad y un menor contenido de metabolitos medidos como DQO, concretamente menor contenido de DQO debido a ácidos orgánicos y menor concentración de ácido láctico. Debido a estas diferencias, muy probablemente se presenten distintos comportamientos en la producción de metano para los biorreactores de la Etapa M alimentados con estos SF.

Tabla 44. Caracterización de los sólidos fermentados de la Etapa H

Parámetro	Mesofílico		Termofílico	
	21 d TRM (21-H,M)	14 d TRM (14-H,M)	21 d TRM (21-H,T)	14 d TRM (14-H,T)
Sólidos totales (%)	16.9 ± 0.6	18.3 ± 0.1	18.9 ± 0.2	19.8 ± 0.9
SV (% _{bh})	10.6 ± 0.3	13.0 ± 0.5	11.9 ± 0.9	14.0 ± 0.5
pH	7.32 ± 0.02	6.61 ± 0.12	6.91 ± 0.23	6.65 ± 0.15
NKT (% _{bh})	0.33 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.28 ± 0.02
C/N	18.6 ± 0.55	27.9 ± 0.98	23.0 ± 0.88	29.0 ± 1.10
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /kg _{bh})	2 300 ± 150	1 100 ± 97	2 400 ± 114	1 300 ± 84
DQO debida a ácidos orgánicos ^a	19 999 ± 580	23 201 ± 675	9 862 ± 345	13 230 ± 421
DQO debida a solventes ^a	5 974 ± 253	3 354 ± 187	1 646 ± 95	5 046 ± 174
Ácido láctico ^a	961 ± 55	3 300 ± 120	2 534 ± 81	9 004 ± 292
Σmetabolitos ^a	26 934	29 855	14 042	27 280

Notas: ^a mg DQO/kg_{bh}

7.1.3. Biología molecular

El análisis de la comunidad microbiana se efectuó sólo hasta la visualización de bandas por TGGE ó DGGE. Con estas técnicas se asume que cada banda pertenece a un microorganismo diferente, pero para poder asegurarlo se necesita hacer secuenciación de cada una de éstas y su posterior comparación en una búsqueda BLAST.

En la Fig. 18 se muestran geles de agarosa de la marcha de obtención de producto de PCR purificado que amplifica un fragmento de la región conservada del 16S rDNA. Como molde se ocupó el DNA genómico recién extraído de lodos provenientes de reactores DASS. El producto de la extracción por lo general puede contener impurezas como los fosfolípidos (Fig. 18a) que afecten la consecuente PCR. Por esto, se realizó un procedimiento de limpieza a los extractos de DNA con la técnica de fenol:cloroformo (Fig. 18b). Posterior a la obtención de un DNA genómico de aceptable pureza (A260/280 > 1.3), se procedió a realizar la PCR bajo las condiciones descritas en la Tabla 14. Una vez confirmada la amplificación de un tamaño aproximado de 465 pb (Fig. 18c, carriles 1 – 3), se purificó este fragmento por corte y extracción del gel de agarosa. Tras recuperar y

limpiar el fragmento, este se corrió de nueva cuenta en gel de agarosa para visualizar su presencia (Fig. 18c, carril 4).

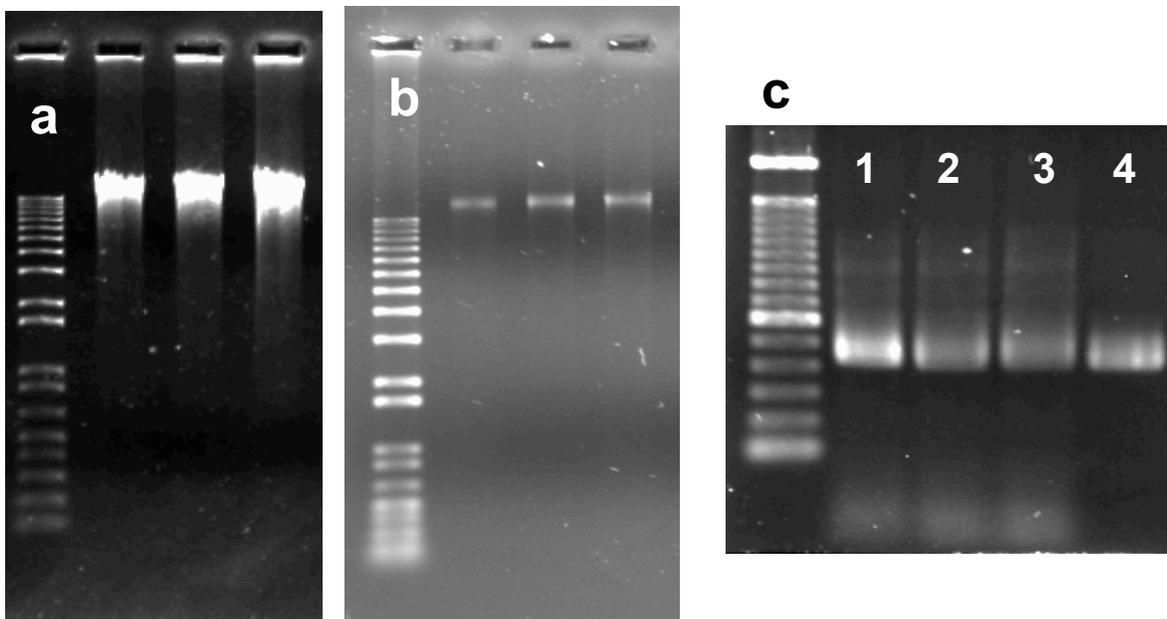


Fig. 18. Geles de agarosa al 1.3 %. Cada gel muestra en el primer carril un marcador de peso molecular y el triplicado del ensayo realizado, con excepción del carril 4 de la figura c. a) DNA genómico recién extraído, b) DNA genómico purificado, c), comparativo del producto de PCR de 465 pb (carriles 1 – 3) y producto de PCR purificado de 465 pb (carril 4).

En la Fig. 19 se muestran geles de poliacrilamida de la marcha de estandarización de la técnica de TGGE. En la Fig. 19a se corrió un producto de PCR sin purificar. El resultado es que las muestras más concentradas presentaron un barrido que se pudo deber a impurezas en el producto de PCR. Además en el gel no se observaron bandas completamente definidas. En la Fig. 19b se observaron productos de PCR purificados, donde se observaron al menos dos bandas definidas pero sin la separación adecuada. La Fig. 19c es un gel de TGGE perpendicular que tuvo por objetivo determinar el intervalo de temperatura óptimo para mejorar la separación de las bandas. En este gel, que se cargó con producto de PCR en un sólo carril de todo el ancho del peine recorriendo un intervalo de temperatura de 30 – 60 °C, se observó que la banda visible se separó en dos partes con una apariencia de 'S'. Es justamente donde se separó la banda que se encuentra el intervalo óptimo de separación para esa muestra o tipo de muestras. El intervalo óptimo

determinado fue 41 – 52 °C, al cual se corrieron más productos de PCR, mostrados en la Fig. 19d. En éste gel se observaron las bandas con una separación adecuada. Se intentó mejorar la definición de éstas bandas con una variación de la composición del gel, donde se redujo el contenido de poliacrilamida al 6 % y se adicionó formamida al 20%. Los resultados no fueron los esperados pues, aunque se aprecia una separación de las bandas, el corrimiento fue bajo y la definición de las bandas fue pobre.

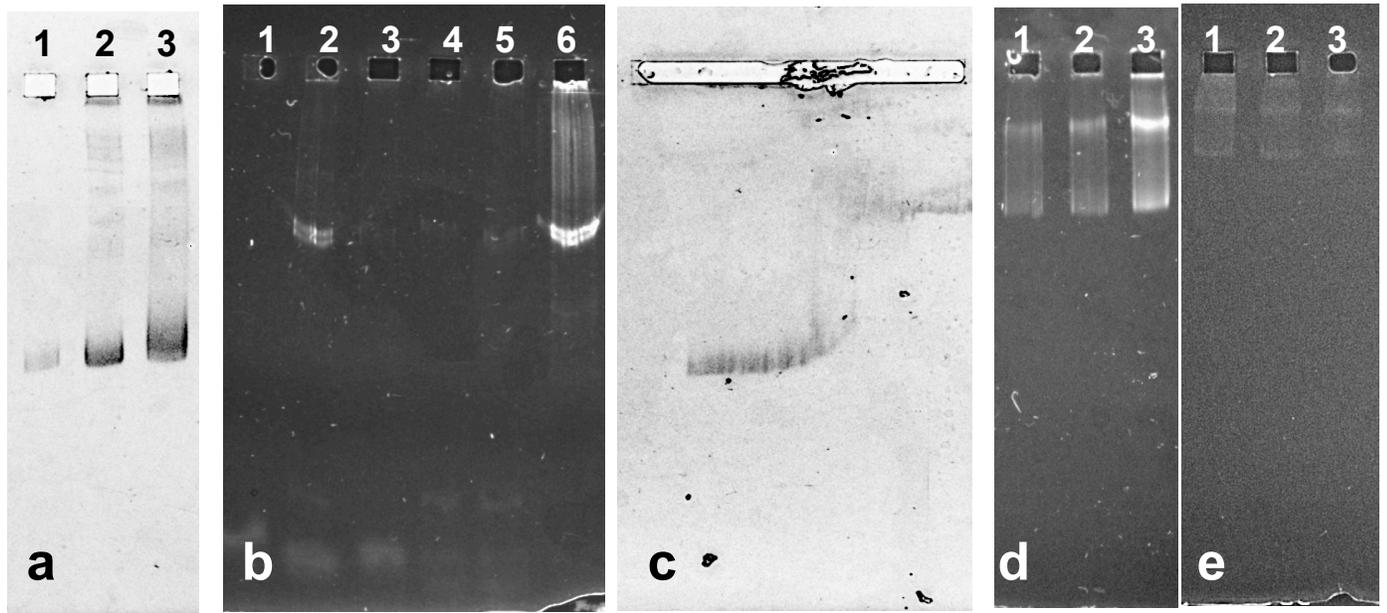


Fig. 19. Geles de poliacrilamida. A) productos de PCR sin purificar, B) productos de PCR purificados, C) TGGE para encontrar el intervalo de temperatura óptimo, D) productos de PCR purificados a gradiente de temperatura óptimo, E) productos de PCR purificados en gel con variante de contenido de poliacrilamida y formamida.

En la Fig. 20 se muestra un gel de poliacrilamida al 8 % con gradiente de desnaturizante (DGGE) donde fue visible la migración de productos de PCR de eubacterias. En este gel se observó una migración homogénea de las bandas en la región media del gel, pero no en la región baja que pudo deberse a un tiempo de corrida insuficiente o al gradiente desnaturizante más cerrado (58 %). Aunque se trató de amplificadas de diferentes muestras (excreta de vaca, lodos activados e inóculo metanogénico) y no obstante que la resolución no fue la mejor, se pudieron observar algunas bandas comunes a todos los carriles.

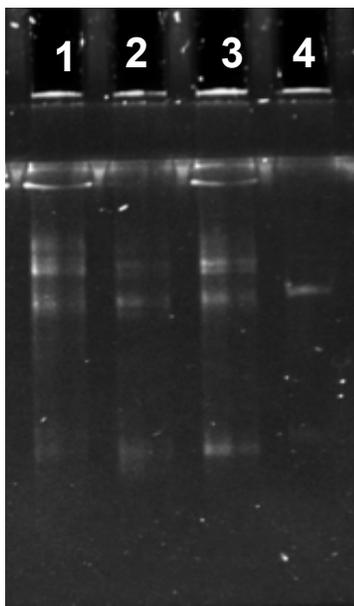


Fig. 20. Gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante 48-58% para amplificadores del 16S rDNA de eubacterias. Carriles: 1, excreta de vaca; 2, lodos activados; 3, inóculo metanogénico de arranque; 4, control *E. coli*.

En el gel de la Fig. 21 se cargaron las mismas muestras que en el gel de la Fig. 20, pero se expandió el gradiente desnaturalizante a 35 – 58 %. Se observó una buena definición de las bandas y un patrón diferente entre cada muestra. Nuevamente se observaron algunas bandas comunes a los carriles con los amplificadores de la excreta de vaca, lodos activados y el inóculo metanogénico de arranque. El carril 1 con amplificador de excreta de vaca mostró aparentemente la mayor cantidad de bandas tenues en las zonas alta y baja del gel; mientras que el carril 2 con el amplificador de lodos activados mostró menos bandas, pero sí más definidas que el carril 1. La muestra que se amplificó del inóculo metanogénico se tomó al tiempo cero, justo cuando fue constituido por los lodos activados, la excreta de vaca y la tierra de jardín (Sección 6.2.4.4.). Extrañamente en el carril 3 con el amplificador del inóculo metanogénico de arranque recién formulado ($t = 0$) no se presentaron bandas tan definidas como las del carril 2, ni tantas bandas tenues como en el carril 1. Esto se pudo deber a una “dilución” del material genómico presente en el inóculo metanogénico, ya que al ser biomasa tan compleja en su composición microbiana algunas bandas pudieran ser tan tenues que dejan de ser visibles. El hecho de que algunas bandas no se observen, no significa necesariamente que el

microorganismo haya desaparecido o sea inexistente; puede indicar solamente una relativamente baja abundancia en comparación con los otros microorganismos cuyos amplificadores sí hayan sido visibles.

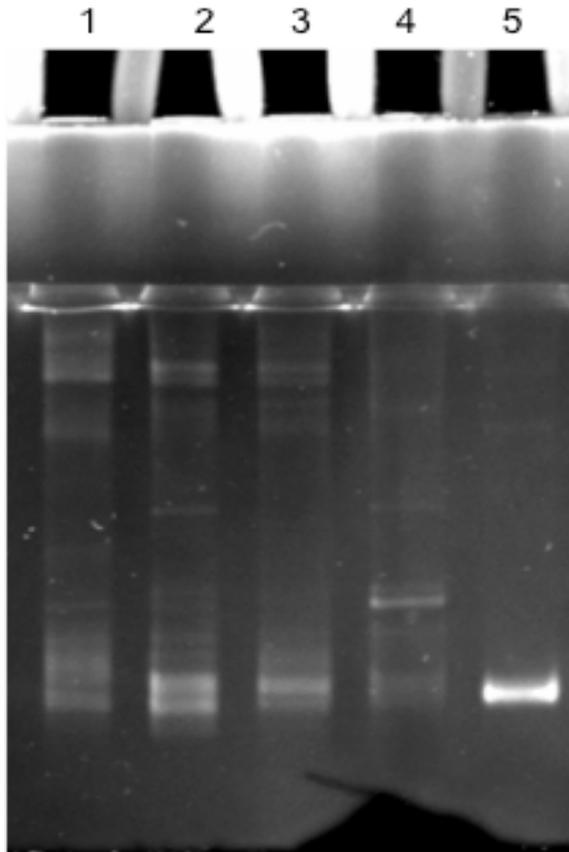


Fig. 21. Gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante 35 - 58% para amplificadores del 16S rDNA de eubacterias. Carriles: 1, excreta de vaca; 2, lodos activados; 3, inóculo metanogénico de arranque; 4, muestra de reactor metanogénico en operación; 5, control *E. coli*.

Valdez-Vazquez (2007) reportó una diferencia notable en la cantidad de bandas encontradas entre arqueas y bacterias en reactores semi-continuos productores de hidrógeno alimentados con FORSU. Con los iniciadores para arqueas sólo pudo detectar a *Methanoculleus thermophilus*, mientras que con los iniciadores de bacterias observó gran variedad de bandas en los geles de DGGE. Los géneros de bacterias con los que encontró afiliación en determinadas bandas fueron *Acinetobacter sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Bacillus sp.*, y las especies *Lactobacillus casei* y *L. fermentum*. Si bien de entre las

bandas analizadas no encontró ninguna con similitud con el género *Clostridium*, dentro del género *Bacillus* sí se conocen especies productoras de hidrógeno.

Muñoz-Paez (2008) analizó la comunidad microbiana en reactores productores de hidrógeno en lote alimentados con FORSU. Las especies con las que encontró afiliación fueron *Enterococcus faecalis*, *Tetragenococcus doogicus*, *Actinomyces lignae* y *Enterococcus munditti*.

El conocer lo mejor posible quienes son los microorganismos integrantes de las comunidades microbianas de los procesos biotecnológicos como la digestión anaerobia, puede ser importante para lograr su mejora o al menos para alcanzar una comprensión más profunda de los procesos metabólicos e interacciones que se llevan a cabo. Sin embargo, existe la posibilidad de que no todos los microorganismos presentes en esas comunidades sean de importancia para el proceso en general (Sanz & Köchling, 2007).

La posibilidad de encontrar microorganismos no cultivables con interacciones significativas en el proceso, evita la implementación de técnicas como la bioaugmentación, aunque si se relacionan los cambios en las condiciones de operación con el perfil de las comunidades microbianas se podrían lograr mejoras o evitar problemas en la operación (Sanz & Köchling, 2007; Nettmann *et al.*, 2010).

A menudo los análisis de las comunidades microbianas arrojan resultados con una amplia variedad de microorganismos identificados. Fang *et al.* (2002) usaron iniciadores universales en extracciones de ADN genómico provenientes de reactores productores de hidrógeno alimentados con glucosa. Encontraron que el 64.6 % de las clonas se afiliaron a las Clostridiaceae, 18.8 % a las Enterobacteriaceae, y sólo 3.1 % a *Streptococcus bovis*; el 13.5 % restante perteneció a ocho unidades taxonómicas operaciones (OTU, por sus siglas en inglés) cuyas afiliaciones no fueron identificadas.

En otros casos, en lugar de discernir a todos los microorganismos de la comunidad, se buscan sólo determinadas especies de las cuáles se tiene ya conocimiento de sus efectos. Hung *et al.* (2008) diseñaron iniciadores específicos para *Clostridium* con los cuáles fue posible distinguir especies que no eran detectadas usando iniciadores universales en lodos productores de hidrógeno de reactores alimentados con xilosa. Sin embargo cuando se usan iniciadores específicos se pueden ignorar otras especies con relevancia para el proceso.

También es posible hacer seguimiento no de los microorganismos, sino de enzimas o compuestos metabólicos involucrados en el proceso (Sanz & Köchling, 2007). Nettman *et al.* (2008) utilizaron iniciadores dirigidos al gen de la metil coenzima M reductasa (*mcr*) para identificar especies metanogénicas en un reactor alimentado con excreta líquida de ganado y ensilado de maíz, encontrando que el 70 % de todas las OTUs de arqueas pertenecieron al orden los Methanomicrobiales.

7.2 Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno

La operación de los minirreactores FASSH-VI se realizó por hasta 1 320 h. Para efectos comparativos, en la Fig. 22 se muestra la operación hasta 250 h para los minirreactores a régimen mesofílico, y hasta 450 h para los de régimen termofílico. Durante este tiempo observamos que la producción acumulada de hidrógeno (P_{H_2}) fue mayor en termofilia que en mesofilia. Lo mismo ocurrió con la productividad inicial de hidrógeno (R_{H_2}).

El análisis de varianza muestra que la temperatura, la adición de nitrógeno y la adición de sales tuvieron efectos significativos sobre la P_{H_2} ($p < 0.05$, Anexo Tabla A2). No se observó diferencia significativa en las interacciones de los factores, con excepción de la interacción de la temperatura y la adición de sales ($p = 0.089$). Con respecto a la R_{H_2} , el único factor que presentó diferencias significativas fue la temperatura ($p = 0.0025$, Anexo Tabla A3), aunque sí se registraron interacciones significativas entre la temperatura y la adición de nitrógeno ($p = 0.067$) y la interacción de los tres factores ($p = 0.015$).

Las mayores P_{H_2} se obtuvieron en el régimen termofílico sin adición de lodos (1983 y 1 785 $\mu\text{mol}_{H_2}/\text{g SV}$ para ensayos 5 y 7 respectivamente). El análisis de efectos muestra que la P_{H_2} (Fig. 23a) y la R_{H_2} (Fig. 23d) se vieron beneficiadas por el régimen termofílico ($p = 0.0004$ y $p = 0.0025$ respectivamente, Anexo Tablas A2 y A3).

No se registró fase de latencia considerable pues a las 14 h de operación la mayoría de los minirreactores ya presentaban un contenido de hidrógeno ($\%H_2$) superior al 30%. En reportes de Valdez-Vázquez *et al.* (2006a, 2006b) se presentaron tiempos de latencia de hasta 350 h para experimentos donde el inóculo fue tratado con choque térmico como método selectivo de bacterias hidrogenogénicas. En el mismo estudio, y utilizando acetileno en una concentración 1% v/v del espacio gaseoso para inhibir a las arqueas metanogénicas, se reportaron tiempos de latencia de 180 h. Por esto, Valdez-Vázquez *et al.* (2006a, 2006b) propusieron como mejor pretratamiento al acetileno. Con nuestros resultados el pretratamiento térmico se vuelve a situar como una alternativa adecuada para la selección de microorganismos hidrogenogénicos basados en la inapreciable fase de latencia.

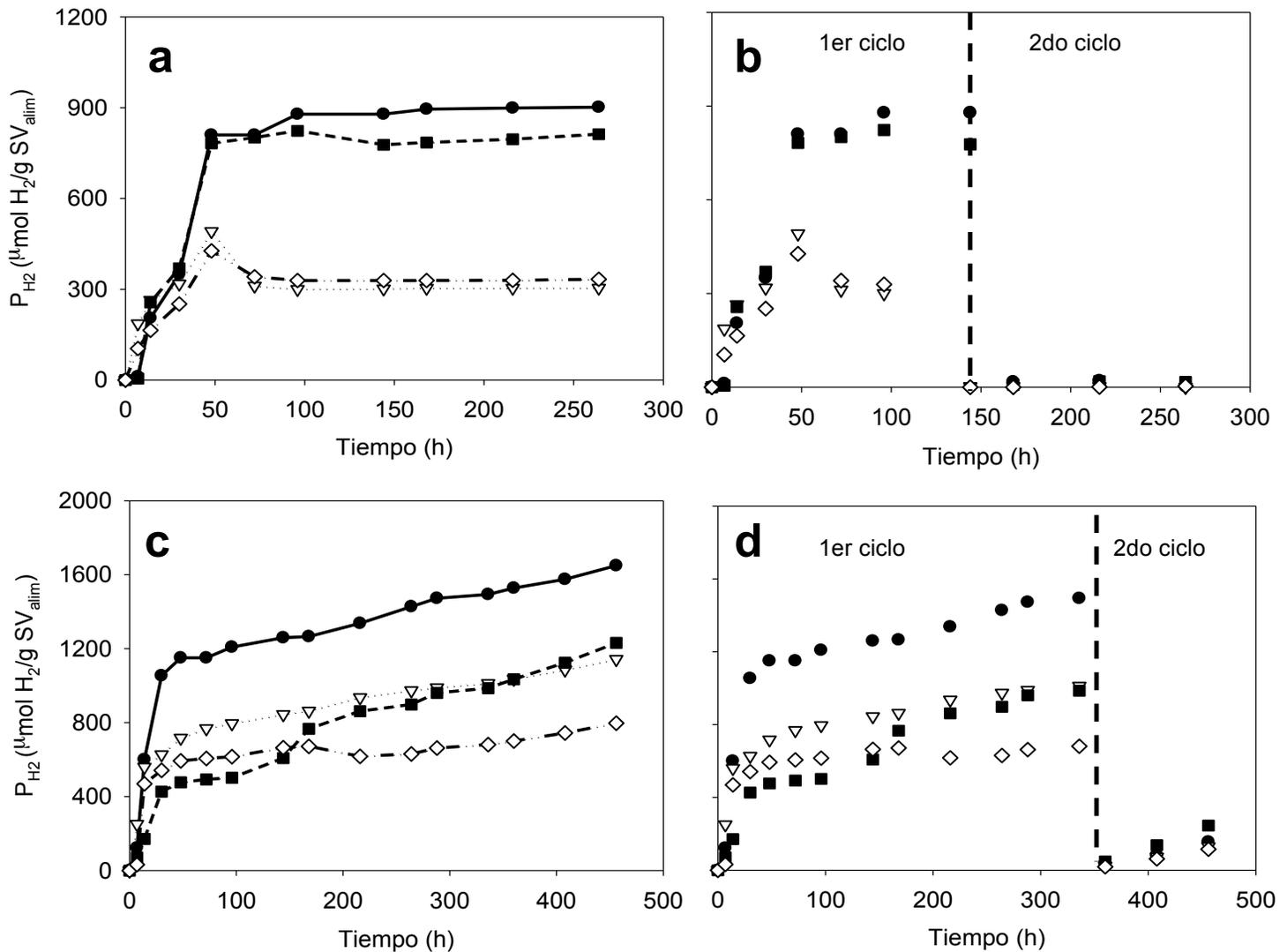


Fig. 22. Producción de hidrógeno, a) acumulada en mesofilia, b) por ciclo en mesofilia, c) acumulada en termofilia, d) por ciclo en termofilia. ●, sin adición de lodos ni sales; ▽, sólo adición de lodos; ■, sólo adición de sales; ◇, adición de lodos y sales.

La operación en régimen mesofílico mostró producción exponencial de hidrógeno hasta las 50 h (Fig. 22a). Una vez que se detuvo la P_{H_2} se realizó la técnica de gaseo con nitrógeno para sobreponerse a la inhibición por presión parcial de hidrógeno e iniciar un segundo ciclo de producción (Valdez-Vázquez *et al.*, 2006), sin embargo ésta no surtió efecto (Fig. 22b). Se ha utilizado esta técnica con otros sustratos (Tabla 46) y se han obtenido desde 2 (Muñoz-Paez, 2008) hasta 5 ciclos de producción de hidrógeno (Robledo-Narvaez *et al.*, 2010). En contraste, en termofilia después de la producción exponencial de hidrógeno ($t = 48$ h), se obtuvieron P_{H_2} constantemente crecientes (Fig.

22c) y sí se produjo un segundo ciclo de producción de hidrógeno a las 330 h (Fig. 22d). La P_{H_2} en este segundo ciclo fue en promedio el 10% de la obtenida en el primer ciclo para la mejor condición (Ensayo 5, TOO). Por su parte, Valdez-Vázquez *et al.* (2006) obtuvieron tres ciclos adicionales en su proceso en lote con FORSU al 25 %ST como sustrato, duplicando así la producción de hidrógeno obtenida en su primer ciclo.

Tabla 45. Resultados de FASSH-VI

Ensayos (código)	$P_{H_2}^a$ acum ($\mu\text{mol H}_2/\text{g SV}$)	$P_{H_2}^b$ acum ($\mu\text{mol H}_2/\text{reactor}$)	$R_{H_2}^c$ máx ($\mu\text{mol H}_2/\text{g SV/h}$)	pH_{final}	ΔpH	C/N
1 (MOO)	912 ± 83	14 311 ± 791	27.6 ± 3.8	5.66	2.50	44.5 ± 2.7
2 (MNO)	304 ± 35	5 253 ± 365	26.6 ± 2.4	5.87	2.02	29.3 ± 2.0
3 (MOA)	812 ± 179	12 742 ± 1 698	36.0 ± 9.2	6.07	1.34	44.8 ± 3.2
4 (MNA)	333 ± 74	5 752 ± 773	14.9 ± 2.0	6.25	1.11	31.4 ± 2.7
5 (TOO)	1 983 ± 17	30 931 ± 274	68.3 ± 10.4	6.20	1.62	47.2 ± 5.0
6 (TNO)	1 488 ± 369	25 554 ± 6 337	44.2 ± 4.2	6.41	1.32	36.8 ± 6.0
7 (TOA)	1 785 ± 124	27 840 ± 1 948	16.0 ± 2.0	6.39	1.02	53.2 ± 3.6
8 (TNA)	1 238 ± 130	21 265 ± 656	62.4 ± 5.9	6.86	0.39	38.9 ± 2.9
Control C	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NA	5.71		25.7 ± 2.0
Control F	3.2 ± 0.2	50.4 ± 4.6	NA	5.38		34.6 ± 2.2

Notas: ^a Producción acumulada de hidrógeno base sólidos volátiles; ^b producción acumulada de hidrógeno por reactor; ^c productividad inicial de hidrógeno; M, metanogénico; T, termofílico; N, adición de nitrógeno; A, adición de sales; O sin adición de nitrógeno/adición de sales; NA, no aplica.

Tabla 46. Resultados de hidrogenogénesis en lote en otros trabajos del grupo

Condiciones de operación	P_{H_2} acumulada ($\mu\text{mol H}_2/\text{g SV}$)	R_{H_2} máxima ($\mu\text{mol H}_2/\text{g SV/h}$)	C/N	$\text{pH}_{\text{inicial}}$	pH_{final}	Ref
FORSU 25% TS, 55 °C (4 ciclos)	1 363	2.69	18.3	9.0 ^a	NR	1
FORSU 24.5 % TS, 55 °C	1 346	7.19	18.3	7.34 ^a	NR	2
FORSU 24.5 % TS, 35 °C (2 ciclos)	186	1.55	-	6.3 ^b	NR	3
FORSA 18.0 %TS, 35 °C (5 ciclos)	3 220	NR	19.0	6.65 ^b	NR	4
FORSU 20.9% TS	1 983	68.3	55.3	7.82 ^a	6.20	5

Notas: ^a pH inicial, ^b pH ajustado; NR, no reportado.

Referencias: 1, Valdez-Vazquez *et al.* (2006); 2, Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo (2009); 3, Muñoz-Paez *et al.* (2011); 4, Robledo-Narvaez *et al.* (2010); 5, este trabajo.

Los controles utilizados en esta actividad, no presentaron producción significativa de hidrógeno.

El pH_{final} en los ensayos mesofílicos se ubicó en el intervalo 5.5 – 6.3 (Tabla 45). El Ensayo 1 (MOO) presentó los mayores P_{H₂} y R_{H₂}, y también presentó el pH_{final} más bajo de todos los ensayos mesofílicos. Para cada régimen térmico, el pH_{final} más bajo fue afín a una mayor P_{H₂}.

El objetivo de la adición de lodos fue contribuir con nitrógeno para ajustar la relación C/N a 30 y así favorecer el proceso fermentativo. Aparentemente la adición de los lodos activados tuvo un efecto significativamente negativo ($p = 0.0008$, Anexo Tabla A2) en la productividad acumulada de hidrógeno para ambos regímenes térmicos. En contraste, Zhu *et al.* (2008) atribuyeron una mejora de ca. 2 veces en la producción de hidrógeno debido a la combinación que realizaron de residuos de comida con lodos primarios y lodos activados. Ellos atribuyeron este efecto a una mejor relación C/N, más que a una conversión de la fracción proteica a hidrógeno, esto por que los carbohidratos son considerados un mejor sustrato para la producción de hidrógeno que las proteínas y las grasas (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Al comparar fuentes de nitrógeno inorgánico, como NH₄NO₃ o NaNO₃, contra las fuentes de nitrógeno orgánico, como el extracto de levadura o peptona, Pan *et al.* (2008) reportaron que las fuentes de nitrógeno orgánico son más benéficas para la producción de hidrógeno con *Clostridium beijerenckii* FanP3, con excepción de la urea. Lo atribuyen a que las fuentes de nitrógeno orgánico no sólo proporcionan nitrógeno, sino que además suministran factores de crecimiento, α -amino ácidos y sales, los cuales pueden ser benéficos para los microorganismos y para la generación del hidrógeno. Hallenbeck (2005), también concuerda que la producción de hidrógeno se ve afectada por la relación C/N, aunque sitúan la mayor producción de hidrógeno a valores moderados de C/N igual a 47. Se debe considerar que la fuente de nitrógeno en exceso, inorgánico u orgánico, puede ser perjudicial para la producción de hidrógeno (Pan *et al.*, 2008).

La adición de lodos sólo tuvo un efecto negativo para la P_{H₂} (Fig. 23b), mientras que no hubo diferencia significativa para la R_{H₂} ($p = 0.8$, Anexo Tabla A3; Fig. 23e). La adición de sales tuvo un efecto negativo ligeramente significativo ($p = 0.1$, Anexo Tabla A3) para ambas variables (Fig. 23c y f).

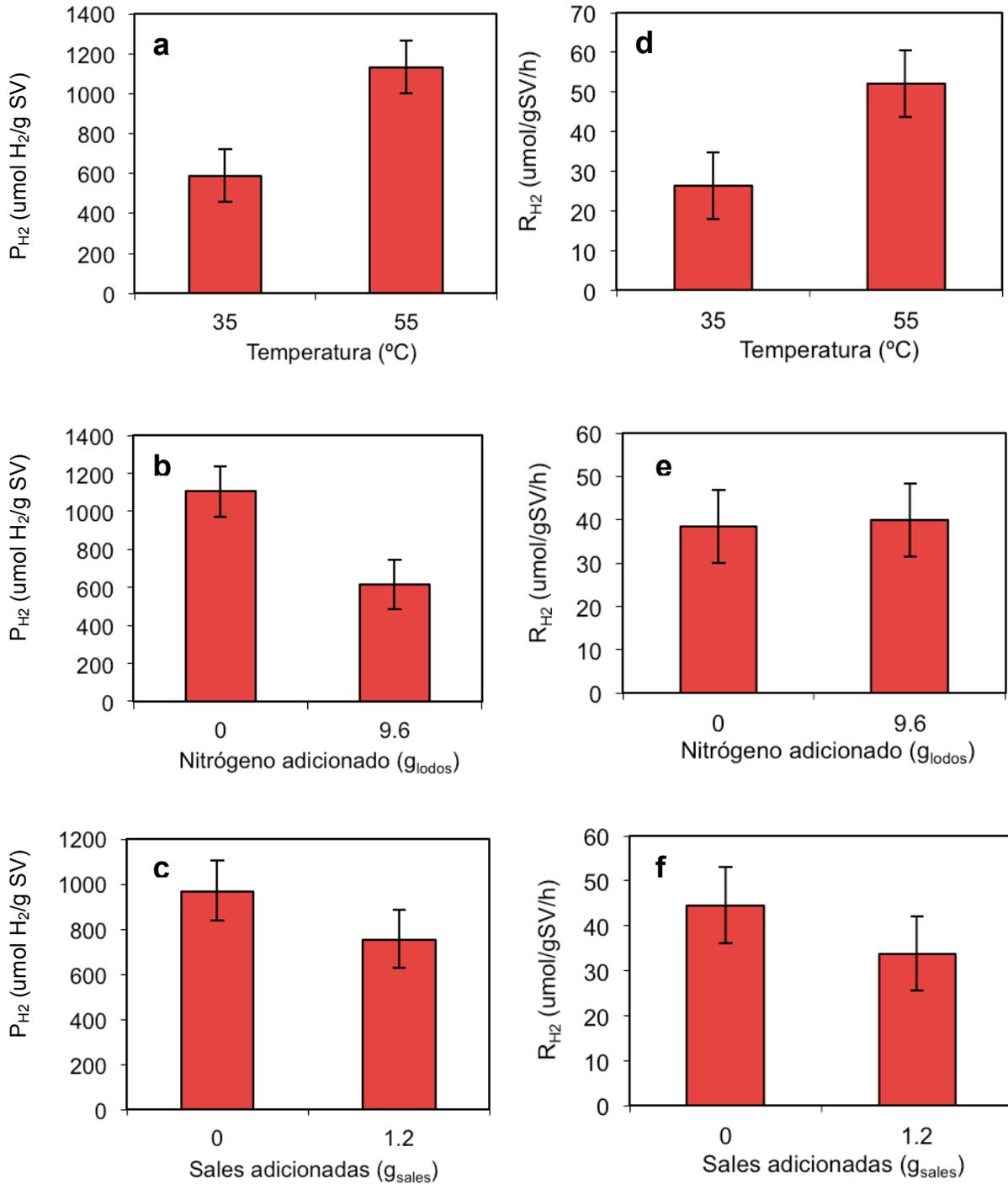


Fig. 23. Efectos sobre la producción acumulada de hidrógeno P_{H_2} de (a) temperatura, (b) adición de nitrógeno, (c) adición de sales. Efectos sobre la productividad inicial de hidrógeno R_{H_2} de (d) temperatura, (e) adición de nitrógeno, (f) adición de sales.

Se han propuesto tres explicaciones para los resultados negativos de la adición de lodos sobre la P_{H_2} : (i) alcalinización del pH por arriba del óptimo para la fermentación oscura debido a la liberación de cationes amonio, (ii) efecto tóxico de los iones amonio producidos sobre los microorganismos hidrogenogénicos, y (iii) contaminación del cultivo por microorganismos hidrogenotróficos presentes en los lodos.

La adición de nitrógeno en exceso puede favorecer la producción del ión amonio en la fermentación de aminoácidos (Ec. 30). Cuando el nitrógeno es liberado de la materia orgánica, éste se convierte en amonio, que es soluble en agua. A continuación se muestra el balance estequiométrico de la hidrólisis del aminoácido glutamato, generando acetato, ión amonio, dióxido de carbono e hidrógeno (Lay *et al.*, 2010).



Sin embargo, el ión amonio tiene la capacidad de subir el pH del medio por su carácter básico, lo que puede ser negativo para los bioprocesos que sean muy sensibles a los cambios de pH. En nuestro caso, los minirreactores adicionados con lodos (ensayos 2, 4, 6 y 8) tuvieron un pH superior y una ΔpH menor a la de los minirreactores sin adición (ensayos 1 y 5). De hecho los reactores con adición de lodos y adición de sales tuvieron el pH más elevado para cada régimen térmico (ensayos 4 y 8). En los lodos activados adicionados pudieron estar presentes algunas bacterias que realizaran reacciones similares a las de la Ec. 30.

El ión amonio y el amoniaco son tóxicos para cultivos metanogénicos (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997) y en fermentaciones hidrogenogénicas no se ha observado efecto favorable por su adición (Salerno *et al.*, 2006).

Con respecto a la tercera explicación sobre el fracaso de la adición de lodos, a las 72 h de operación se observó una reducción en la P_{H_2} (hidrogenotrofia) en los ensayos 2 y 4 (MNO y MNA), muy probablemente debido a la presencia de bacterias hidrogenotróficas y de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas en los lodos. Dicha hidrogenotrofia fue acompañada con la aparición de metano en el biogás en concentraciones de hasta el 9 %v/v a las 144 h. Para contrarrestar este efecto y esperando que la producción de hidrógeno mejorara, los ensayos 2 y 4 (MNO y MNA)

fueron sometidos a un nuevo choque térmico por 1 h a 93 °C. A partir de esto la producción de hidrógeno no mejoró pero se anuló la producción de metano. Es de hacer notar que la producción de metano a pH tan bajo no es de esperarse, pues a la par de la inhibición por choque térmico se espera una inhibición por pH bajo. Taconi *et al.* (2008) trabajaron con digestores anaerobios alimentados con ácido acético y reportaron metanogénesis aclimatada a pH bajos. Ellos obtuvieron ciclos de producción de metano mientras el pH oscilaba entre 4.0 y 5.3 después de 173 d de operación. Mencionan que la inhibición por pH estuvo relacionada a altas concentraciones de ácidos orgánicos no disociados, especialmente propiónico. Los autores imputaron que la metanogénesis a esos pH se debió a la simplicidad de su alimentación, constituida solamente por ácido acético como sustrato. Sin embargo, no descartan la posibilidad de existencia de microambientes a pH neutro (de Beer *et al.*, 1992) ya que la agitación de su reactor fue baja y esporádica (100 rpm sólo durante alimentación).

En nuestro caso, la aparición de la metanogénesis a las 144 h pudo deberse a la existencia de nichos aislados con pH mas alto debido a zonas del sustrato sólido con mezclado deficiente. Los minirreactores termofilicos no presentaron este comportamiento, salvo por una réplica del ensayo 8 (TNA) a las 216 h. A las 264 h este reactor se sometió a choque térmico y la producción de hidrógeno volvió a sus valores anteriores a la aparición de metano. De alguna forma, la alta temperatura en los reactores termofilicos pudo servir como barrera para impedir la proliferación de bacterias hidrogenotróficas.

La adición de sales tampoco favoreció la P_{H_2} , aunque fue menos perjudicial para la producción de hidrógeno que la adición de lodos. La R_{H_2} fue mayor en régimen termofilico y en los reactores sin adición de sales (Fig. 23; $p = 0.0025$ y $p = 0.1047$ respectivamente, Anexo Tabla A3). Reportes previos de nuestro grupo de trabajo señalan que una adición de 0.11 g $CaCO_3$ eq/g_{bs} en FSS semi-continua de FORSU a 20.9 %ST, tuvo una influencia positiva sobre una mayor productividad de hidrógeno (Valdez-Vazquez *et al.*, 2009). La adición de alcalinidad en nuestro estudio fue de 0.06 g $CaCO_3$ eq/g_{bs} para atenuar en cierta medida las posibles variaciones de pH. Adicionalmente a esta alcalinidad, existe una contribución al nitrógeno amoniacal producto del metabolismo microbiano, que probablemente contribuyó a la alcalinidad total de los reactores. Por un lado, las menores P_{H_2} en los minirreactores adicionados con alcalinidad se pudieron deber a un incremento

en la presión osmótica. Por otro lado, la amortiguación del pH a valores alejados del pH óptimo también pudo haber contribuido al menor desempeño. Los pH iniciales para los regímenes mesofílicos y termofílicos se encontraron en el rango 7.36 – 8.16 y 7.25 – 7.82, respectivamente (datos no mostrados). La biomasa se acidificó naturalmente a valores más bajos de pH por efecto de la fermentación libre de la que fue objeto. Los minirreactores adicionados con las sales de fosfato tuvieron una menor variación de pH (ΔpH), según lo esperado, que aquellos sin adición sales (Tabla 45). Justamente, en los reactores con mayor ΔpH el pH final pudo haberse encontrado más cercano del óptimo, mismo que pudo haber sido diferente para cada régimen térmico.

Entre las 30 y 50 h de operación los minirreactores cambiaron el ritmo de producción exponencial a producción constante (Fig. 22). Tomando como base la producción acumulada del minirreactor del ensayo 5 (TOO) a las 50 h, se pudo observar que al doble de tiempo (100 h) la producción acumulada había aumentado en 5 %, a las 150 h en 16 %, a las 400 h en 37 %, y a las 1000 h en 63 %. Esto introduce dudas sobre la factibilidad energética de mantener un proceso en lote por más de 50 h. Al respecto, Maintinguer *et al.* (2008) sugieren tiempos energéticamente rentables de 2 – 24 h para la producción de hidrógeno a partir de sacarosa utilizando cultivos mixtos.

7.2.1. Experimentos complementarios

Estos experimentos complementarios consistieron en adicionar lodos activados pretratados térmicamente a los minirreactores FASSH-VI (Tabla 47, Fig. 24). La operación se realizó por 500 – 600 h, periodo durante el cual no se observó fase de latencia apreciable en ningún ensayo.

Debido a que el diseño experimental no fue simétrico, los resultados de P_{H_2} y R_{H_2} se evaluaron en dos partes bajo un factorial 2^2 . En la primera evaluación se analizaron los efectos de la temperatura y la adición de nitrógeno (Tabla 47, ensayos 9, 10, 12 y 13). En la segunda evaluación se analizaron los efectos de adición de sales a los ensayos con nitrógeno para cada régimen térmico (Tabla 47, ensayos 10, 11, 13 y 14). La primera evaluación demostró que la temperatura fue significativa sobre la P_{H_2} y la R_{H_2} ($p = 0.0841$ y $p = 0.0269$ respectivamente, Anexo Tablas A4 y A5). La adición de nitrógeno no mostró diferencias significativas para ninguna variable de respuesta. En la segunda evaluación ambos factores tuvieron significancia sobre los resultados ($p < 0.1$, Anexo Tablas A6 y A7).

Tabla 47. Resultados de FASSH-VI complementario

Ensayos (código)	$P_{H_2}^a$ acum ($\mu\text{mol H}_2/\text{g SV}$)	$P_{H_2}^b$ acum ($\mu\text{mol H}_2/\text{reactor}$)	$R_{H_2}^c$ máx ($\mu\text{mol H}_2/\text{g SV/h}$)	pH_{final}	ΔpH	C/N
9 (MOO)	1 503 ± 118	14 397 ± 800	56.2 ± 1.9	5.72	1.21	31.1 ± 2.1
10 (MNO)	1 427 ± 30	14 777 ± 102	64.1 ± 1.8	5.79	1.56	28.3 ± 3.4
11 (MNA)	1 381 ± 205	14 306 ± 1 500	53.3 ± 11.4	6.2	0.78	27.1 ± 1.1
12 (TOO)	1 695 ± 80	14 482 ± 750	21.7 ± 6.1	6.33	0.87	38.1 ± 2.8
13 (TNO)	1 709 ± 65	17 799 ± 544	63.7 ± 23.2	6.35	0.67	30.5 ± 1.0
14 (TNA)	1 435 ± 20	14 944 ± 100	64.0 ± 1.0	6.36	0.69	30.4 ± 0.5

Notas: ^a Producción acumulada de hidrógeno base sólidos volátiles; ^b producción acumulada de hidrógeno por reactor; ^c productividad inicial de hidrógeno; M, metanogénico; T, termofílico; N, adición de nitrógeno; A, adición de sales; O sin adición de nitrógeno/adición de sales.

El análisis de efectos demostró que para la P_{H_2} el régimen termofílico fue significativamente superior al mesofílico, y que la adición de sales fue significativamente perjudicial (Anexo Fig. A1 y A2). En el caso de la R_{H_2} , ésta se vio significativamente favorecida por el régimen mesofílico y afectada por la adición de sales.

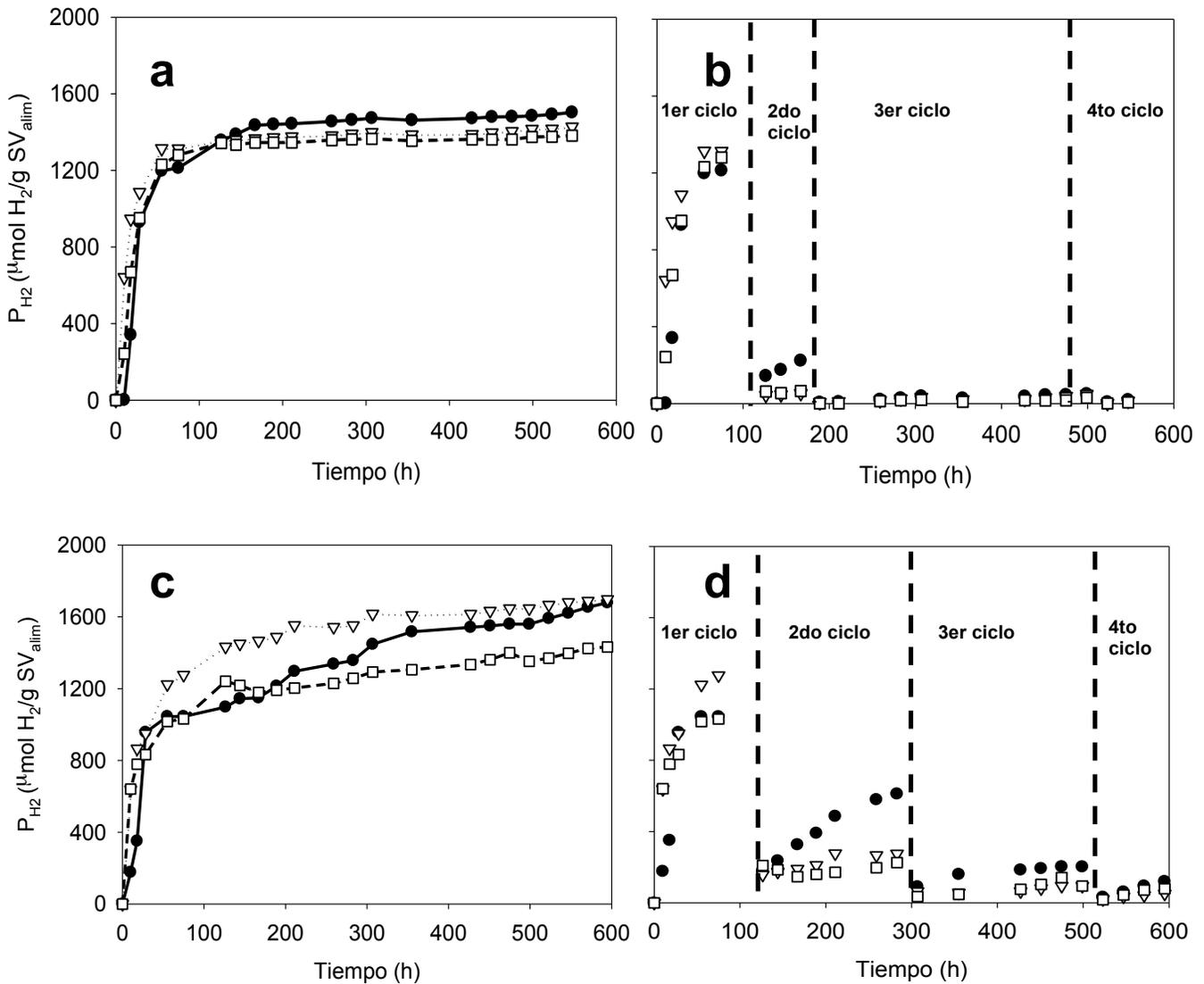


Fig. 24. Producción de hidrógeno, a) acumulada en mesofilia, b) por ciclo en mesofilia, c) acumulada en termofilia, d) por ciclo en termofilia. ●, sin adición de lodos ni sales; ▽, sólo adición de lodos; □, adición de lodos y sales

Para el régimen mesofílico, el Ensayo 9 (MOO) sin adición de lodos ni alcalinidad dio la P_{H_2} más alta, aunque entre los tres ensayos no hubo diferencia significativa ($p = 0.951$). En contraste con los ensayos que utilizaron lodos activados sin choque térmico como pretratamiento (Actividad 7.2, Fig. 22), no se observó consumo del hidrógeno acumulado y se obtuvieron al menos dos ciclos de producción observable de hidrógeno (Fig. 24). Además la producción de hidrógeno mejoró considerablemente con respecto a

los ensayos anteriores, pues se obtuvieron incrementos de la P_{H_2} hasta 4.7 veces superiores. Con esto se refuerza la idea de que en los ensayos con lodos sin pretratar ocurrió consumo de hidrógeno por parte de microorganismos mesofílicos presentes en los lodos activados.

En el caso del régimen termofílico, la P_{H_2} del Ensayo 13 (TNO) con lodos pretratados fue ligeramente superior que la del Ensayo 14 sin adición de lodos, aunque sin diferencia significativa ($p = 0.262$). En este régimen se lograron 4 ciclos de producción de hidrógeno hasta las 600 h de operación (Fig. 24d). Durante el primer ciclo la P_{H_2} más alta correspondió al Ensayo 13 (TNO) con adición de lodos, sin embargo en los ciclos posteriores el Ensayo 12 (TOO) sin adición de lodos presentó las más altas P_{H_2} , logrando casi alcanzar la del Ensayo 13 (TNO) a las 600 h. En experimentos de producción termofílica de hidrógeno en lote utilizando glucosa como sustrato (9 g/L) y variando la fuente de nitrógeno, Karadag (2011) reportó que la adición de peptona o amonio no mejoraba la producción de hidrógeno, e incluso la adición de estos compuestos reducían la concentración de ácido butírico e incrementaban la de ácido láctico. Aparentemente el contenido de nitrógeno del inóculo junto con el del sustrato, fue suficiente para suplir los requerimientos para el crecimiento microbiano.

Aunque no se pudo obtener una P_{H_2} similar a la de los ensayos de la Actividad 7.1 (1 983 $\mu\text{mol H}_2/\text{g SV}$), sí se observó coincidencia en que los ensayos con adición de lodos y sales dieron la menor P_{H_2} . También existió coincidencia en que para los ensayos con adición de alcalinidad la ΔpH fue la más baja, por lo que se corrobora el efecto amortiguador de las sales de fosfato, que resultó perjudicial para la hidrogenogénesis.

La fase exponencial para esta ronda de ensayos se registró hasta las 18 h en ambos regímenes, mientras que la fase estacionaria empezó a las 55 y 126.5 h para mesofilia y termofilia, respectivamente.

En la Tabla 48 se muestra el perfil de metabolitos orgánicos para los ensayos de esta actividad. El ácido acético fue el metabolito más abundante seguido del ácido butírico. El contenido de solventes fue bajo, lo que en general concuerda con una buena hidrogenogénesis.

Tabla 48. Perfil de metabolitos orgánicos

Ensayos (código)	Compuestos volátiles (mg DQO/kg _{bh})										Relación A/B ^a
	acetona	metanol	etanol	butanol	Σsolv	A. acético	A. prop	A. butírico	ΣAOV	A. láctico	
9 (MOO)	17	34	47	99	198	2 550	1 072	1 942	5 564	ND	1.31
10 (MNO)	19	0	79	110	208	3 404	1 842	2 646	7 893	ND	1.29
11 (MNA)	16	0	6	153	175	4 386	1 910	3 210	9 506	ND	1.37
12 (TOO)	9	33	217	271	529	2 860	895	2 557	6 311	ND	1.12
13 (TNO)	17	28	102	306	452	3 880	1 348	4 068	9 297	ND	0.95
14 (TNA)	9	0	73	453	535	3 986	1 262	3 832	9 080	ND	1.04

Notas: ND, no determinado; ^a Relación de ácido acético sobre ácido butírico acumulados en base mg DQO/kg_{bh}.

7.3 Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados

7.3.1 Arranque de digestores

Para la puesta en marcha de la Etapa M se realizó el arranque de digestores anaerobios en sustrato sólido metanogénicos (DASS-M) a régimen mesofílico y termofílico (35 y 55 °C, respectivamente). Los biorreactores metanogénicos se arrancaron de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos (sección 6.2.4.2.). Se operaron durante 59 días bajo el régimen de alimentación con FORSU a TRM decreciente, desde 100 d hasta 28 d TRM. Cuando se alcanzaron los 28 d TRM, los biorreactores se operaron durante 20 días (días 67 al 87) y su caracterización se muestra en la Tabla 49. A partir del día 87 se cambió la FORSU como alimentación por SF de la Etapa H de acuerdo a lo establecido en la Metodología (Tabla 25 y Fig. 12), con el fin de evaluar el potencial de los SF para la producción de metano a 35 y 55 °C a 28 d TRM. La composición de los SF se mostró en la Tabla 44 (sección 7.1.2).

Tabla 49. Caracterización de arranque de biorreactores metanogénicos

Parámetro	Mesofílico		Termofílico	
	Biorreactor 5	Biorreactor 6	Biorreactor 7	Biorreactor 8
TRM ^a (d)	28	28	28	28
I _{CH₄} ^b (NmL CH ₄ /kg _r /d)	935 ± 87	812 ± 153	1 040 ± 24	1 006 ± 449
% _{CH₄} en biogás	59.7 ± 5.1	54.6 ± 13.6	72.7 ± 3.3	73.5 ± 2.8
nSV ^c (%rem)	69.7 ± 6.7	67.8 ± 0.8	72.5 ± 1.2	72.8 ± 0.0
ST (%)	16.1 ± 4.6	17.7 ± 2.7	14.4 ± 3.5	12.2 ± 0.4
SV (% _{bh})	5.5 ± 1.2	5.8 ± 0.1	5.0 ± 0.2	4.9 ± 0.0
pH	8.11 ± 0.02	8.08 ± 0.12	8.20 ± 0.01	8.21 ± 0.02
DQO debida a ácidos orgánicos ^d	8 695 ± 435	6 271 ± 388	8 139 ± 501	14 312 ± 732
DQO debida a solventes ^d	0	0	0	0
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /kg _{bh})	10 417 ± 306	10 550 ± 259	8 350 ± 636	9 058 ± 1 567

Notas: ^a tiempo de residencia másico, ^b productividad de metano, ^c eficiencia de remoción de sólidos volátiles, ^d mg DQO/kg_{bh}.

7.3.2 Operación de Etapa M con sólidos fermentados de la Etapa H como sustrato

Los biorreactores metanogénicos correspondientes a la Etapa M se operaron por ca. 50 días bajo alimentación de SF. En la Tabla 50 se muestran los resultados promedio globales para las condiciones ensayadas por duplicado. El contenido de metano fue 63 – 69 %. La mejor operación metanogénica en términos de productividad (2 023 NmL CH₄/kg_r/d) correspondió a la realizada a 55 °C con alimentación de sólidos fermentados provenientes de la Etapa H a 14 d TRM (14-H). Para el régimen mesofílico, también la alimentación con sólidos fermentados provenientes de la Etapa H a 14 d TRM (14-H) dio mejores resultados de productividad de metano que con los sólidos fermentados de 21 d TRM (21-H). Este comportamiento se pudo deber a la carga de metabolitos presente en las distintas alimentaciones (14-H, 21-H) que variaron entre 14 000 y 29 000 mg DQO/kg_{bh}. Los SF de 14 d TRM tuvieron una mayor carga orgánica que los SF de 21 d TRM en cada régimen térmico (Tabla 44). Por lo tanto era de esperarse que la biomasa con alto contenido de metabolitos fuera más fácilmente convertida a metano. Los SF de menor TRM tuvieron mayor contenido de metabolitos debido a que en condiciones acidogénicas (Etapa H) una mayor carga orgánica produce una mayor cantidad de metabolitos (Bertin *et al.*, 2010).

Se debe cuidar de no proveer metabolitos en exceso en la alimentación para evitar posibles efectos negativos para la metanogénesis, como caídas de pH por acumulación de AOV (James *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2010; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012). Por otro lado, se debe tomar en cuenta que la microbiología de cada régimen térmico pudiera ser determinante en la metanogénesis, ya que aunque los SF provenientes de biorreactores mesofílicos tuvieron mayores cargas orgánicas que los termofílicos, los mesofílicos no presentaron mayores productividades de metano.

La alcalinidad alcanzada en los biorreactores fue adecuada, pues se considera que una alcalinidad por encima de 2 500 mg/L es necesaria para mantener un proceso metanogénico estable (Fannin, 1987). Además, a pH 6 – 8 el sistema CO₂ – bicarbonato es el principal sistema químico controlando la alcalinidad. A estas condiciones la alcalinidad del bicarbonato es el principal componente de la alcalinidad total (Fannin, 1987).

Las dinámicas de operación en función del Q_{bg}, I_{CH₄} y pH para cada condición de

operación se muestran en la Fig. 25. En esta figura se observa que todos los biorreactores presentaron en los primeros 15 días una productividad de metano con tendencia decreciente, que se pudo deber a un periodo de aclimatación al sustrato. Posteriormente las dinámicas se estabilizaron sin variaciones notables para los reactores mesofílicos (Fig. 25a y 25b) y con variaciones ligeramente más evidentes para los termofílicos (Fig. 25c y 25d). Esto fue congruente con una razón alpha menor para los biorreactores mesofílicos (Tabla 50), pues este parámetro está estrechamente relacionado con la estabilidad de los sistemas metanogénicos. Con motivo de hacer una comparación más sencilla, en la Fig. 26 se incluyen las dinámicas de operación en función del I_{CH_4} para régimen mesofílico y termofílico, para la alimentación 21-H (Fig. 26a) y 14-H (Fig. 26b).

Tabla 50. Resultados promedio de la Etapa M

Parámetro	Unidades	35 °C		55 °C	
		21-H	14-H	21-H	14-H
Días en operación	d	50	50	50	50
Metano en biogás	%	64.9 ± 3.7	63.2 ± 3.4	69.2 ± 9.4	68.9 ± 7.7
Producción de biogás diaria (Q_{bg})	NmL/d	1 093 ± 78	1 205 ± 13	1 190 ± 52	1 445 ± 21
Productividad de metano (I_{CH_4})	NmL CH_4 /kg _r /d	1 423 ± 17	1 565 ± 26	1 688 ± 30	2 023 ± 34
Rendimiento de metano (Y'_{CH_4})	NmL CH_4 /g SV_{rem}	700 ± 7	654 ± 20	755 ± 32	694 ± 10
pH promedio	(-)	7.88 ± 0.14	7.86 ± 0.14	8.16 ± 0.21	8.11 ± 0.20
ST	%	15.2 ± 1.9	15.5 ± 2.4	13.1 ± 1.2	11.7 ± 0.7
SV	%	5.0 ± 0.6	5.21 ± 0.53	4.93 ± 0.1	4.83 ± 0.1
Alcalinidad	mg $CaCO_3$ /kg _{bh}	10 367 ± 660	10 183 ± 684	11 396 ± 265	10 875 ± 825
Alpha	(-)	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.40 ± 0.18	0.44 ± 0.16
Eficiencia de remoción de SV	% SV_{rem}	52.7 ± 5.7	60.0 ± 4.0	58.6 ± 1.0	65.5 ± 0.6

Notas. Los resultados corresponden al promedio de la media de los duplicados en el tiempo de operación. La desviación corresponde a la variación del promedio con los valores de los duplicados.

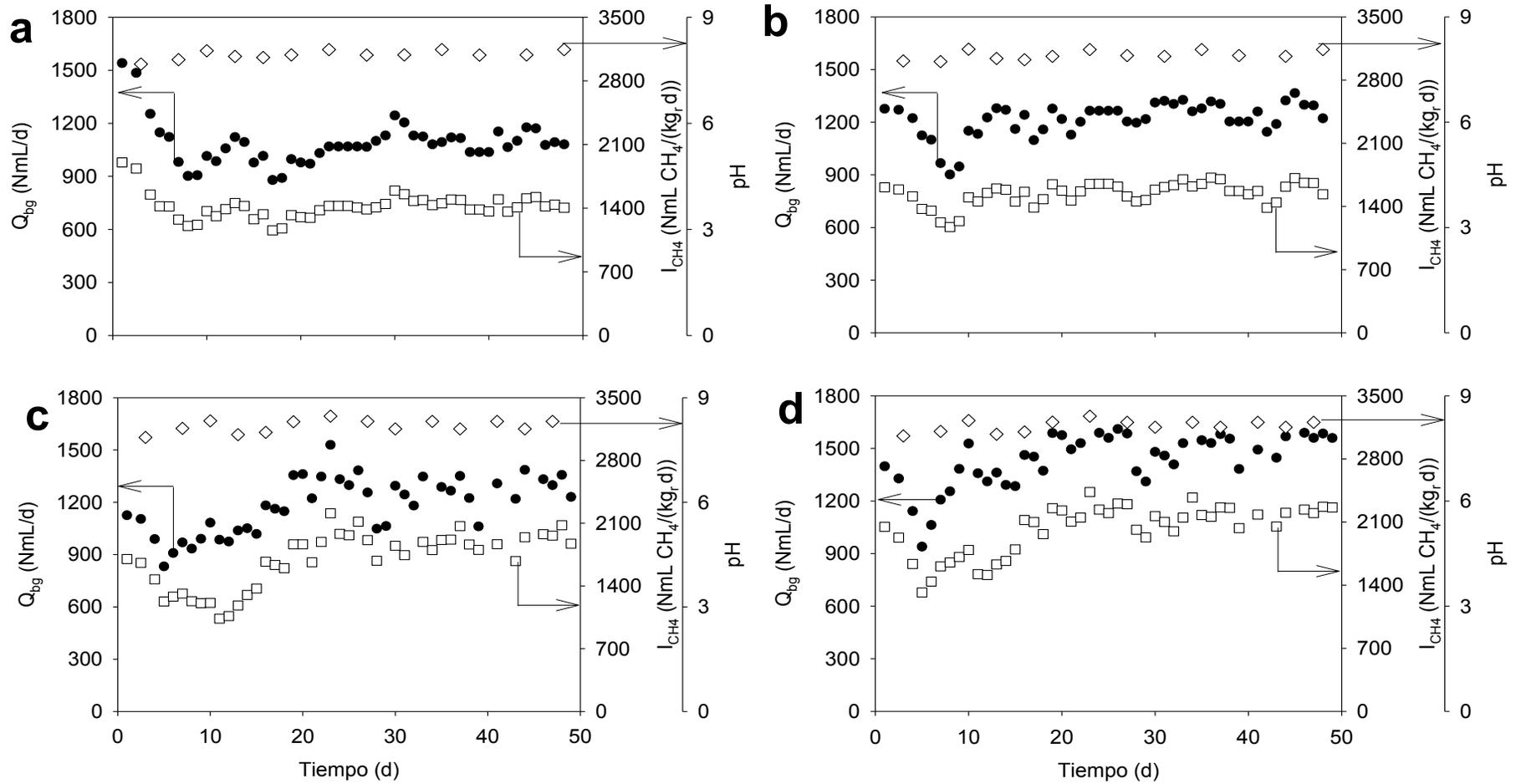


Fig. 25. Dinámicas de operación promedio para duplicados de la Etapa M. Condiciones: a) mesofílico alimentado con sólidos fermentados de 21 d TRM, b) mesofílico alimentado con sólidos fermentados de 14 d TRM, c) termofílico alimentado con sólidos fermentados de 21 d TRM, d) termofílico alimentado con sólidos fermentados de 14 d TRM; (•) Q_{bg} : producción de biogás; (□), I_{CH_4} : productividad de metano; (◇) pH.

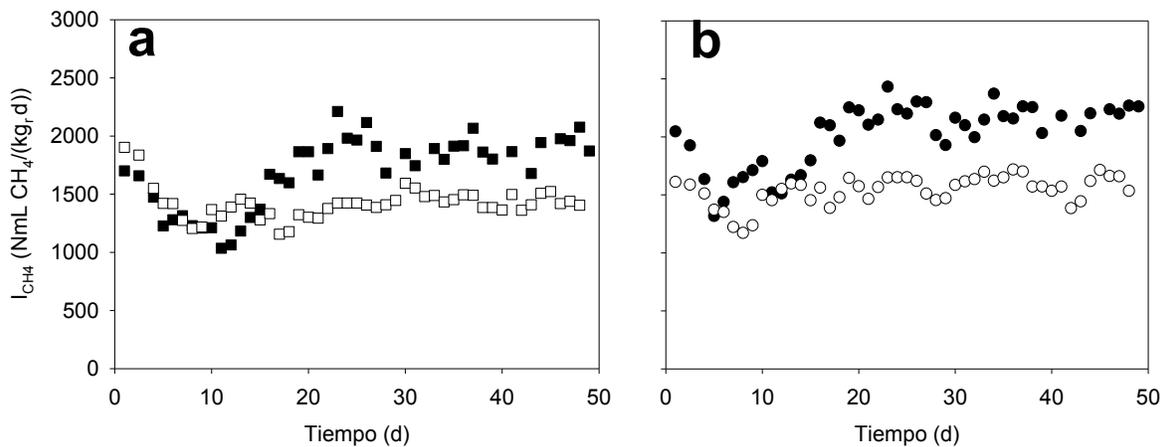


Fig. 26. Dinámicas de operación de la Etapa M comparando la operación mesofílica (claras) con la termofílica (negras) con alimentación proveniente de sólidos fermentados de a) 21-H y b) 14-H.

Se realizaron ANDEVAs para determinar la significancia del régimen térmico y del origen de la alimentación sobre las variables de respuesta Q_{bg} , I_{CH_4} , Y_{CH_4} y Y'_{CH_4} (Tabla 51, Anexos A8 – A11). Se observó que el origen de la alimentación y el régimen térmico tuvieron influencia significativa en la mayoría de las variables ($p < 0.1$). Para Y'_{CH_4} la temperatura fue el único factor con influencia significativa. Las interacciones entre factores sólo tuvieron influencia para I_{CH_4} y la Q_{bg} .

Tabla 51. Selección de variables de respuesta de la Etapa M para evaluar el diseño experimental 2²

Temperatura (°C)	Alimentación ^a (d)	I_{CH_4} ^b (NmL CH ₄ /kg./d)	Y'_{CH_4} ^c (NmL CH ₄ /g SV)	Y_{CH_4} ^c (NmL CH ₄ /g SV _{rem})	Q_{bg} ^d (NmL/d)
35	21-H	1 427	366	700	1 098
35	21-H	1 419	356	701	1 089
55	21-H	1 731	386	782	1 220
55	21-H	1 646	359	728	1 160
35	14-H	1 558	336	679	1 228
35	14-H	1 492	308	629	1 182
55	14-H	2 045	395	702	1 455
55	14-H	2 002	385	685	1 434

Notas: ^a Sólidos fermentados de la Etapa H; ^b productividad de metano; ^c rendimiento de metano; ^d producción de biogás

Con respecto a la Q_{bg} , los SF 14-H lograron un incremento del 16% de producción de biogás sobre los SF 21-H (Fig. 27a) y el régimen termofílico logró incrementar un 14% la Q_{bg} comparado con el régimen mesofílico (Fig. 27b).

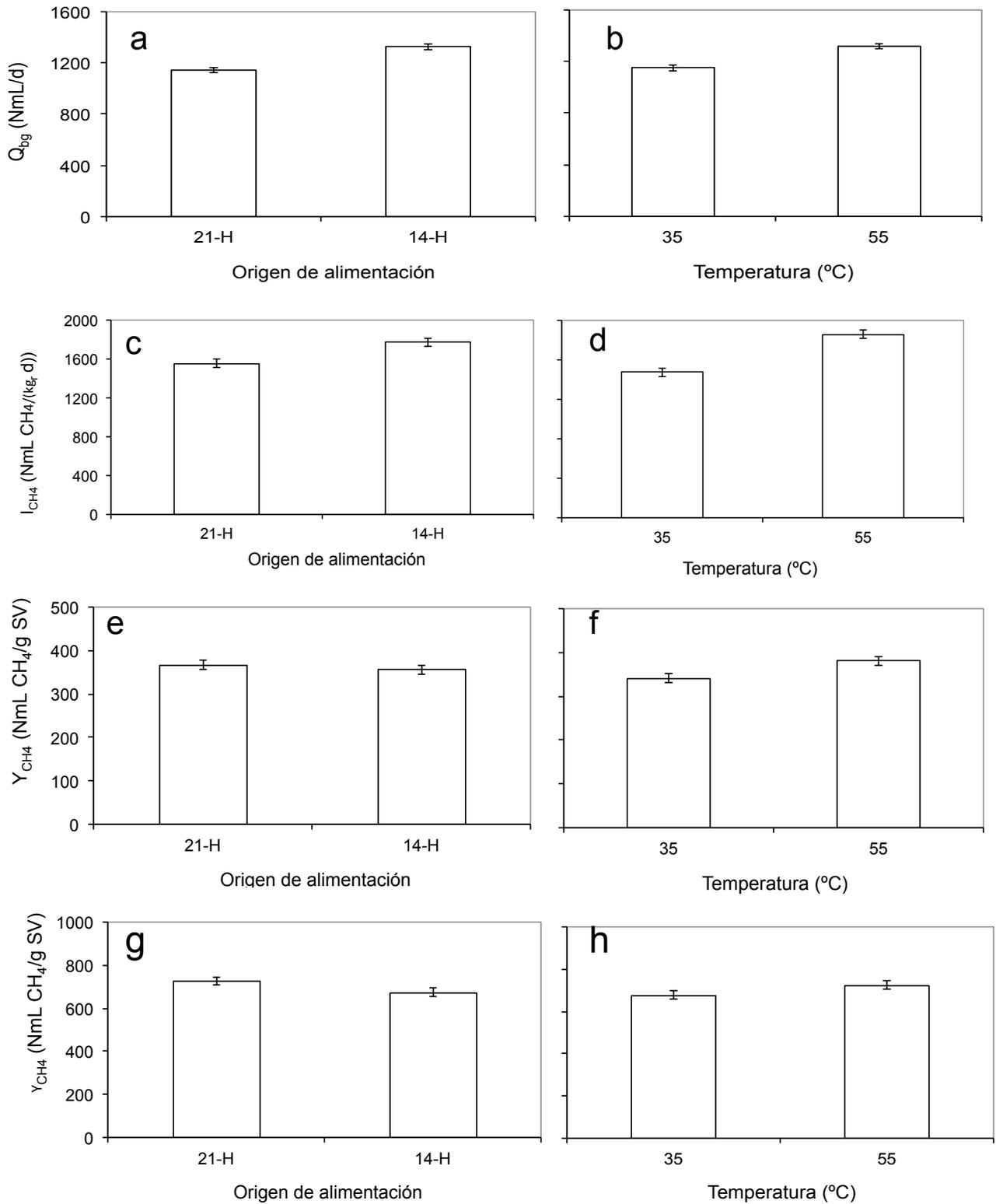


Fig. 27. Efecto del origen de alimentación y la temperatura sobre: la producción de biogás (a y b), la productividad de metano (c y d), el rendimiento de metano por sustrato alimentado (e y f), y el rendimiento de metano por sustrato removido (g y h)

El análisis de la I_{CH_4} nos mostró que los SF 14-H mostraron un incremento del 14% sobre los SF 21-H (Fig. 27c) y el régimen termofílico logró incrementar un 26% la I_{CH_4} comparado con el régimen mesofílico (Fig. 27d). El Y'_{CH_4} sólo se vio ligeramente incrementado en un 11% por el efecto de la temperatura (Fig. 27f). Con base en el sustrato removido, la alimentación 21-H fue más eficientemente convertida a metano, y de ambos regímenes, el termofílico fue el más eficiente (Fig. 27g y 27h, respectivamente).

De acuerdo a los mostrado en la Tabla 50, en los biorreactores metanogénicos hubo remociones de SV del (50 – 60 %), lo que es señal de una eficiente degradación anaerobia del sustrato. Esto también indica que aún existe sustrato remanente que podría ser utilizado por otras tecnologías para obtener subproductos y productos derivados como las enzimas.

Si se toma en cuenta la productividad de metano, resulta evidente que el mejor sustrato fueron los SF 14-H muy posiblemente debido al mayor contenido de ácidos orgánicos. En contraste, los SF 21-H provinieron de los digestores de la Etapa H que dieron los mejores resultados de producción de hidrógeno (ver sección 7.1.2). Esto resulta paradójico, pues para poder obtener una mayor productividad de metano aparenta ser necesario reducir la productividad de hidrógeno. Cuetos *et al.* (2007) realizaron una fermentación hidrogenogénica alimentada con residuos orgánicos y sangre de pollerías, y los resultados obtenidos los introdujeron a un modelo matemático para calcular la producción de metano a partir de los contenidos de ácidos orgánicos presentes en las purgas de la fermentación. Reportaron que para tener las condiciones óptimas de producción de metano era necesario maximizar los metabolitos intermediarios (i.e. AOV como ácidos acético, propiónico, butírico, caproico) producidos durante la etapa de acidogénesis y producción de hidrógeno. Sin embargo y como se discutió con anterioridad, una alta producción de AOV puede incluso llevar a la completa inhibición de la producción de hidrógeno (Han & Shin, 2004). Para Cuetos *et al.* (2007) las mejores condiciones de producción de metano conllevaron a una reducción en la producción de hidrógeno en alrededor de una cuarta parte de la producida en condiciones óptimas hidrogenogénicas. Por otro lado, también se debe considerar que un exceso en el contenido de los AOV puede afectar la metanogénesis (Poggi-Varaldo & Oleszkiewicz, 1992).

Aunque la elección de un régimen térmico definitivo no ha alcanzado un consenso en la comunidad científica, la mayor productividad del régimen termofílico en la Etapa M está en acuerdo con lo reportado por otros investigadores (Poggi-Varaldo & Oleszkiewicz, 1992; De Baere, 2000; Hartmann & Ahring, 2006; Ueno *et al.*, 2007). En contraste, al menos el 60 % de las plantas de digestión anaerobia son mesofílicas (De Baere, 2000; Mata-Alvarez *et al.*, 2000). Se considera que los procesos de digestión anaerobia con temperaturas más altas incrementan las velocidades de conversión pero también disminuyen la estabilidad del proceso (Fannin, 1987). A mayor temperatura el amoníaco se presenta en forma libre en una mayor proporción que a temperaturas moderadas, siendo por consiguiente más tóxico a menores concentraciones (Ahring, 1995). Guardando las debidas precauciones, los procesos termofílicos pueden ser tan estables como los mesofílicos (Hartmann & Ahring, 2006). Por ejemplo, una estrategia para reducir el efecto inhibitorio del amoníaco es la adición de bentonita en aceite a los reactores (Ahring, 1995). Otras ventajas del uso de condiciones termofílicas son el incremento de la eficiencia de destrucción de los compuestos orgánicos, mejores características de 'desagüe' y la destrucción de organismos patógenos (Ahring, 1995; Hartmann & Ahring, 2006). De hecho, a menudo el destino final de los lodos anaerobios es como fertilizador de suelos.

Los rendimientos máximos de metano reportados en la literatura pueden alcanzar ca. 500 mL CH₄/gSV_{adicionado} (Xing *et al.*, 2008). El máximo teórico a partir de un mol de hexosa es 373 mL CH₄/gSV. Valores por arriba de este máximo se pueden deber a variaciones en la composición del sustrato, como un mayor contenido de lípidos u otros compuestos menos oxidados, como alcoholes (metanol, propanol, butanol) y AOVs de cadena larga (Ahring, 1995). En este sentido los SF provenientes de la Etapa H tuvieron un alto contenido de dichos compuestos. Además, la comparación de sustratos como los desechos de jardinería o papel de baja calidad, contra los residuos de comida, indica que los residuos de comida dan los mayores rendimientos de biogás (Hartmann & Ahring, 2006). Conjuntamente, la adición de papel a los residuos orgánicos beneficia la producción de biogás y reduce la concentración de amoníaco.

Como se mostrará más adelante, los SD producidos en esta etapa no encontraron un nicho de uso en las otras etapas de biorrefinería probadas (i.e. producción enzimática,

sacarificación). Una estrategia adicional para lograr mayores productividades de metano se podría lograr cambiando la configuración del reactor, permitiendo un mayor tiempo de retención para los microorganismos, y uno menor para el sustrato. En este sentido, los iones de calcio (2+) tienen la capacidad de formar gránulos de biomasa, haciendo relativamente sencillo la separación de éstos del los SD (Yu *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2008). Se ha propuesto que este efecto se debe a que el calcio forma parte de los polisacáridos y/o proteínas involucrados como agentes de unión.

Otro aspecto que se debe tomar en cuenta son los requerimientos nutricionales. Cuando los residuos orgánicos carecen de éstos, a menudo los requerimientos se satisfacen con lodos municipales (Hartmann & Ahring, 2006). Los nutrientes en orden de importancia son nitrógeno, azufre, fósforo, hierro, cobalto, níquel, molibdeno, selenio, riboflavina y vitamina B12. La fermentación de metano ocurrirá sin todos los nutrientes, pero las velocidades de producción se verán disminuidas (Speece, 1987).

7.3.3 Operación de digestores control

Se evaluó la productividad de metano en biorreactores control alimentados con FORSU 20.9% ST (Tabla 52), para comparar sus productividades con las de la Etapa M alimentada con SF. Se evaluaron 28, 32, 42 y 49 d TRM a régimen térmico mesofílico (35 °C) y termofílico (55 °C).

La productividad y rendimiento de metano fueron superiores en el régimen termofílico comparado con el mesofílico. Las mejores productividades de metano para el régimen mesofílico y termofílico fueron 1 220 y 1 560 NmL CH₄/kg_r/d, respectivamente (Tabla 52). Estos valores fueron inferiores a los obtenidos por los digestores de la Etapa M alimentados con SF de la Etapa H (Tabla 50). Comparando los resultados de las secciones 7.3.2 y 7.3.3 se pudo observar que en régimen mesofílico de la Etapa M y en función del origen de los SF (21-H o 14-H), se logró una mejora de la productividad de metano de entre 16 y 28 % con respecto al digestor control de 28 d TRM también a régimen mesofílico. En el régimen termofílico de la Etapa M, e igualmente en función del origen de los SF, la mejora de productividad de metano fue entre 8 y 30 % con respecto al digestor control de 28 d al mismo régimen térmico. Esto demuestra que la alimentación

con SF influyó positivamente en la obtención de mayores productividades de la Etapa M con respecto a los controles alimentados con FORSU.

Se observó que al aumentar el TRM de 28 a 49 d se perjudicó la producción de biogás y la productividad de metano en ambos regímenes térmicos. El aumento del TRM aparentemente también influyó en el aumento del pH y alcalinidad de los reactores.

Tabla 52. Resultados promedio de la operación metanogénica control

Parámetro	Unidades	35 °C				55 °C			
		28 d	32 d	42 d	49 d	28 d	32 d	42 d	49 d
Días en operación	d	21	72	21	72	21	72	21	72
Metano en biogás	%	62.7 ± 9.5	62.7 ± 0.1	57.2 ± 0.6	63.2 ± 2.39	65.1 ± 2.5	70.9 ± 0.5	69.1 ± 0.9	69.4 ± 0.6
Producción de biogás diaria	NmL/d	991 ± 30	766 ± 30	670 ± 76	472 ± 34	1 198 ± 41	1 036 ± 125	904 ± 49	818 ± 47
I_{CH_4}	NmL	1 220	942	771	583	1 560	1 462	1 254	1 126
	CH ₄ /kg _r /d	± 112	± 10	± 93	± 17	± 107	± 182	± 51	± 53
Y'_{CH_4}	NmL CH ₄ /g SV	321 ± 29	283 ± 10	305 ± 36	269 ± 8	411 ± 28	440 ± 55	496 ± 20	519 ± 24
pH promedio	-	7.86 ± 0.02	8.11 ± 0.01	7.91 ± 0.01	8.19 ± 0.04	8.27 ± 0.02	8.49 ± 0.05	8.40 ± 0.02	8.59 ± 0.02
ST	%	13.4 ± 0.8	14.6 ± 1.1	15.0 ± 0.8	15.6 ± 0.3	11.5 ± 0.4	12.9 ± 0.3	13.8 ± 0.3	14.8 ± 0.2
SV	%	7.28 ± 0.50	7.24 ± 0.43	7.22 ± 0.30	7.21 ± 0.16	5.80 ± 0.20	5.90 ± 0.13	6.1 ± 0.15	6.30 ± 0.18
Alcalinidad	mg	6 804	7 197	7 844	8 893	6 143	7 321	6 804	8 325
	CaCO ₃ /kg _{bh}	± 267	± 25	± 134	± 70	± 401	± 841	± 10	± 87
Alpha	-	0.24 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.26 ± 0.01	0.38 ± 0.09	0.31 ± 0.04	0.40 ± 0.02
Eficiencia de remoción de SV	%SV _{rem}	58.7 ± 1.0	59.9 ± 0.9	60.3 ± 0.5	59.8 ± 2.4	64.2 ± 1.1	65.0 ± 1.0	66.7 ± 0.8	67.2 ± 0.7

Notas. Los resultados corresponden al promedio de la media de los duplicados en el tiempo de operación. La desviación corresponde a la variación del promedio con los valores de los duplicados.

Para el régimen mesofílico el rendimiento de metano disminuyó con el aumento del TRM, lo que se puede visualizar como un metabolismo más lento con una ligeramente mayor remoción de SV pero sin una mayor producción de metano. Para el régimen termofílico el Y_{CH_4} aumentó junto con el TRM, lo que pudo estar relacionada con una más

eficiente conversión del sustrato a metano por efecto de un mayor tiempo de contacto entre los microorganismos y el sustrato.

Previamente se ha sugerido que la temperatura puede ser un factor determinante en el desempeño de la digestión anaerobia, ya que por un lado influye en la factibilidad termodinámica (ΔG) de las reacciones biológicas involucradas (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012) y por otro lado juega un papel muy importante en la selección de los microorganismos presentes (Ahring, 1995; Karadag *et al.*, 2011).

7.3.4. Potencial energético del sistema H-M

La hidrogenogénesis en lote FASSH-VI y la semi-continua de la Etapa H mostraron potenciales energéticos (\hat{E}_{P,H_2}) muy similares (Tabla 53). Esto puede indicar que la hidrogenogénesis a 20.9 % ST con las actuales condiciones de operación, podría estar alcanzando un máximo de hidrógeno extraíble del FORSU en fermentación en sustrato sólido. En contraste, la FASSH-VI tuvo un flujo energético (E_{F,H_2}) casi diez veces mayor que la Etapa H semi-continua. Analizando la literatura (Tabla 54), observamos que Chu *et al.* (2008) alcanzaron los más altos \hat{E}_{P,H_2} (786 kJ/kg_{bs}) y E_{F,H_2} (70.7 kJ/kg_r/d). Nuestros \hat{E}_{P,H_2} se encontraron dentro del intervalo reportado para sustratos similares. El E_{F,H_2} de la Etapa H se situó en la parte baja del intervalo, mientras que la de la FASSH-VI mostró valores aceptables muy cercanos a los de un proceso semi-continuo como el de Ueno *et al.* (2007).

Tabla 53. Parámetros de operación y principales resultados de las etapas H, M y FASSH-VI

Parámetros	Unidades	FASSH-VI ^a	H ^b 55 °C	M ^c 55 °C
t_{op} ^d	d	2.5 d	21 d	28 d
Q ^e	NmL/d	114	89.5	996
I_{H_2} ^f	NmL H ₂ /kg _r /d	1910	202	NA ^g
I_{CH_4} ^h	NmL CH ₄ /kg _r /d	NA	NA	2 023
Y_{H_2} ⁱ	mmol H ₂ /kg SV	1 200	1 485	NA
Y_{CH_4} ^j	mmol CH ₄ /kg SV	NA	NA	15 800
R ^k	mmol/kg SV/h	68.3	NA	NA
\hat{E}_P ^l	kJ/kg _{bs}	271	256	11 889
E_F ^m	kJ/kg _r /d	24.11	2.55	80.25

Notas: ^a producción de hidrógeno en lote, ^b Etapa H semi-continua, ^c Etapa M, ^d tiempo de operación, ^e producción de biogás, ^f productividad de hidrógeno, ^g no aplica, ^h productividad de metano, ⁱ rendimiento de hidrógeno, ^j rendimiento de metano, ^k productividad inicial de hidrógeno, ^l potencial energético, ^m flujo energético.

Los \hat{E}_P y E_F obtenidos para la combustión teórica del metano producida para todo el sustrato alimentado fueron de 11 889 kJ/kg_{bs} y 80.25 kJ/kg_r/d, respectivamente. De hecho, el acoplamiento de la Etapa M a la Etapa H incrementó los \hat{E}_P y E_F del sistema en 46 y 31 veces, respectivamente. Por otro lado, un acoplamiento de FASSH-VI y Etapa M

incrementarían 43 y 3.5 veces los \dot{E}_P y E_F , respectivamente. Estos resultados demuestran una ventaja clara del acoplamiento de la producción de metano a la producción de hidrógeno a partir de FORSU.

Tabla 54. Desempeños energéticos

Sustrato	I_{H_2, CH_4} ^a	\dot{E}_{P,H_2} ^b (kJ/kg _{bs})	\dot{E}_{P,CH_4} ^c (kJ/kg _{bs})	E_{F,H_2} ^d (kJ/kg _r /d)	E_{F,CH_4} ^e (kJ/kg _r /d)	Ref
Residuos de comida y papel (68.3 g/L)	2.4 L H ₂ /L/d 4.4 L CH ₄ /L/d	303	11 475	30.3	175	1
Residuos de comida (100 g/L)	1.05 L H ₂ /L/d 2.4 L CH ₄ /L/d	259	16 309	13.3	95	2
Residuos de comida (170 g/L)	1.47 L H ₂ /L/d 2.52 L CH ₄ /L/d	701	18 872	18.6	100	3
Desecho modelo de papa (10 g/L)	1.28 L H ₂ /L/d 0.67 L CH ₄ /L/d	41	1 303	16.2	26	4
Agua residual sintética y glucosa (3 g/L)	0.19 L H ₂ /L/d 0.189 L CH ₄ /L/d	684	3 094	2.5	7	5
FORSU (11.7% TS)	5.6 L H ₂ /L/d 3 L CH ₄ /L/d	786	13 859	70.7	119	6
Residuo orgánico (2.9 %TS)	0.054 L H ₂ /L/d 2.051 L CH ₄ /L/d	29	35 235	0.69	81	7
Excreta de vaca y comida de perro (2.25 %TS)	0.125 L H ₂ /L/d 0.4 L CH ₄ /L/d	281	7 847	1.58	16	8
FORSU (20.9% TS) en procesos semi-continuo	0.20 L H ₂ /kg _r /d 2.02 L CH ₄ /kg _r /d	256	12 145	2.55	80	9
FORSU (20.9% TS) en procesos en lote y semi-continuo	1.798 L H ₂ /kg _r /d 2.02 L CH ₄ /kg _r /d	271	12 160	24.1	80	9

Notas: ^a productividades hidrógeno o metano, ^b potencial energético específico neto debido a la producción de hidrógeno, ^c potencial energético específico neto debido a la producción de metano, ^d flujo energético de la producción de hidrógeno, ^e flujo energético de la producción de metano.

Referencias: 1, Ueno *et al.* (2007); 2, Liu *et al.* (2006); 3, Wang & Zhao (2009); 4, Zhu *et al.* (2008); 5, Venkata-Mohan *et al.* (2008); 6, Chu *et al.* (2008); 7, Cavinato *et al.* (2011); 8, Yokoyama *et al.* (2010); 9, este trabajo.

En algunos trabajos de producción de hidrógeno y metano acoplados se ha señalado que energéticamente la fermentación hidrogenogénica no es competitiva con la digestión metanogénica (Zhu *et al.*, 2008). Sin embargo, dicho acoplamiento puede considerarse como una relación sinérgica, pues la fermentación hidrogenogénica (en

nuestro caso Etapa H), aunque de menor \hat{E}_P y E_F que la digestión metanogénica (Etapa M), proporciona dos ventajas muy importantes. Una ventaja es que favorece un mayor \hat{E}_P y E_F en la digestión metanogénica debido a que proporciona un sustrato pre hidrolizado (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2014); y la otra ventaja es que una fracción importante de energía es obtenida como combustible limpio, ya sea por el potencial uso del hidrógeno como combustible en máquinas de combustión interna o en celdas de combustible.

7.3.5. Observación de la interacción microorganismos-sustrato por medio de microscopía de barrido electrónico (SEM).

En la Fig. 28 se muestran micrografías de muestras de los sólidos digeridos de la Etapa M. Las principales morfologías observadas fueron cocos (Fig. 28a y 28b), bacilos cortos y largos (Fig. 28c), y bifidobacterias (Fig. 28d).

En la metanogénesis cabe esperar una amplia diversidad microbiana que desempeñe todas las relaciones sintróficas necesarias para hidrolizar la biomasa vegetal y fermentarla en ácidos orgánicos y acetato, hasta su digestión final a metano y CO₂ (Madigan *et al.*, 2009). Como bacterias hidrolíticas y fermentativas cabe esperar la presencia de microorganismos del género *Clostridium*, *Bacillus* y *Enterobacter*, entre otros (Duangmanee *et al.*, 2007; Sumiko-Hirasawa *et al.*, 2008; O-thong *et al.*, 2009). Algunas bacterias del ácido láctico (LAB) pueden tener la apariencia de bifidobacterias (Duangmanee *et al.*, 2007; Bertin *et al.*, 2010). Por otro lado algunas arqueas como los Methanobacteriales se alimentan de H₂/CO₂ o formato y presentan apariencia tubular (Song *et al.*, 2010).

Existe un debate en torno a la preponderancia de los órdenes de las arqueas en la metanogénesis (Tabla 2). Algunos autores señalan que son las arqueas acetoclastas (Methanosarcinales) las que predominan en los reactores metanogénicos (Ahring, 1995; Gomec *et al.*, 2009), mientras que otros señalan que son las hidrogenoclastas, que incluyen tres de los cuatro órdenes de arqueas metanogénicas, las predominantes (Nettmann *et al.*, 2008; Krakat *et al.*, 2010; Cardinali-Rezende *et al.*, 2012). Se ha señalado que en presencia de amonio, las arqueas del orden Methanosarcinales se ven afectadas y su abundancia disminuye, esto debido a su mayor sensibilidad a la inhibición por este compuesto que los demás órdenes (Demirel & Scherer, 2008).

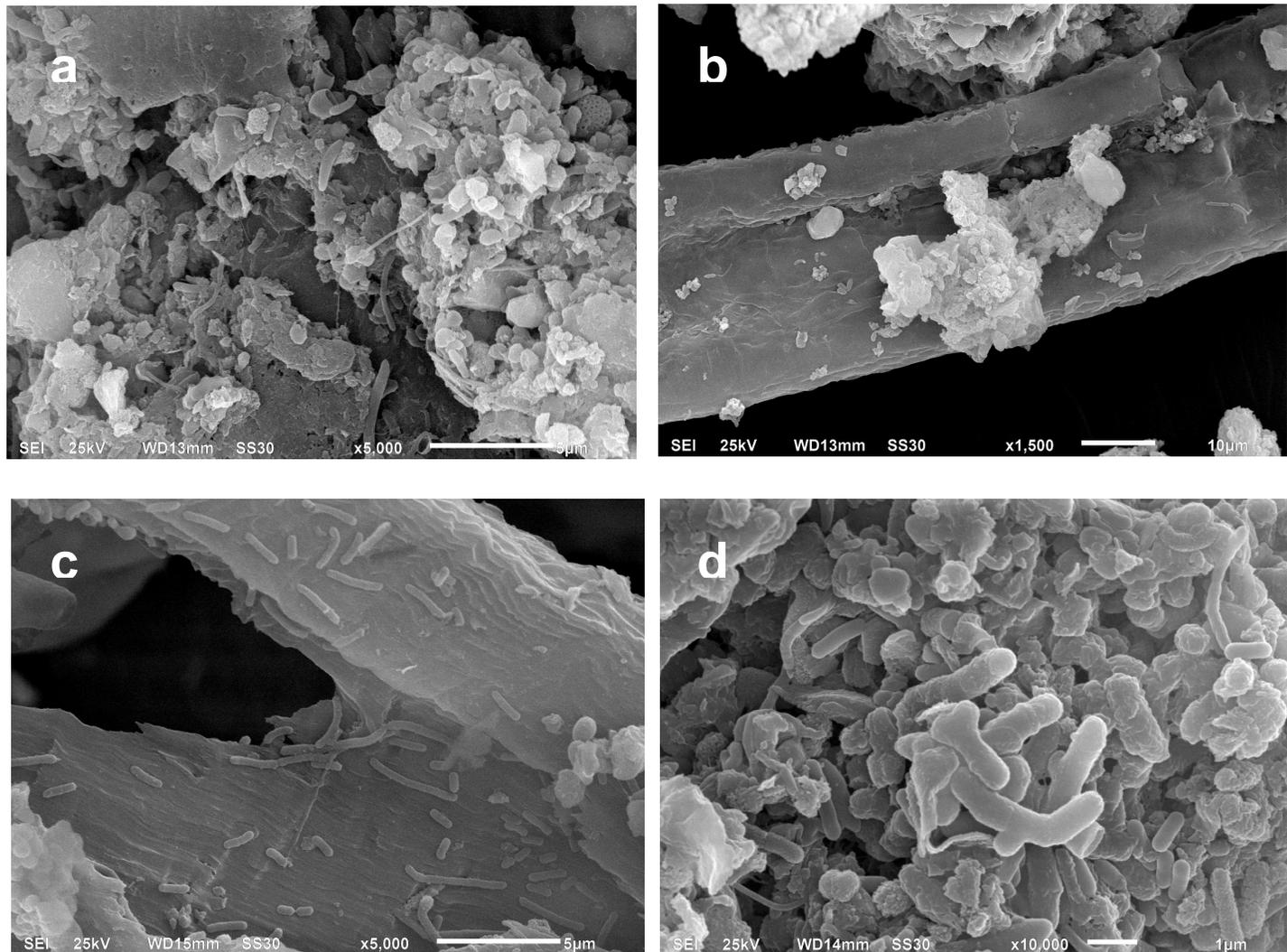


Fig. 28. Micrografías de sólidos digeridos

7.4. Actividad 3. Producción enzimática con *T. reesei* MCG 80

Los experimentos de producción de celulasas con *Trichoderma reesei* MCG 80 se realizaron en el siguiente orden: (i) fermentación en sustrato sólido (FSS) contra fermentación en cultivo sumergido (FCS), (ii) fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones de FORSU y controles, (iii) producción enzimática usando sólidos del proceso H-M, y (iv) producción enzimática en fermentador Sixfors®.

7.4.1. Fermentación en sustrato sólido contra fermentación en cultivo sumergido.

La inducción enzimática en FCS fue superior a la de FSS (Tabla 55). Los mejores resultados de actividad enzimática en papel filtro (FPx) en FSS (Ensayo 10, 0.29 FPU/mL) fueron de aproximadamente la mitad de la FPx obtenida para la FCS de 1 % FORSU (Ensayo 11, 0.64 FPU/mL). La FPx obtenida en el Ensayo 11 se logró duplicar al utilizar el doble de sustrato (2 %ST) en el Ensayo 12 (FPx = 1.3 FPU/mL). Aún así, el Ensayo 10 al ser comparado con los resultados reportados en la literatura, presentaron un rendimiento enzimático superior ($Y'z = 48$ FPU/g holocelulosa) a los obtenidos por Kumar *et al.* (2008) y Xing & Geng (2010), quienes trabajaron con *T. reesei* RUT C30 crecida en bagazo de caña (25.6 FPU/g_{bs}) y en desecho de horticultura (15.2 FPU/g_{bs}), respectivamente. El título enzimático se podría incrementar si en la recuperación/extracción de enzima se utilizan volúmenes de dilución menores al recuperar las enzimas (Chahal *et al.* 1985), sin embargo esto no incrementaría el rendimiento.

Evaluando la FSS bajo el diseño de un factor a la vez en los ensayos 1 a 10, se observaron diferentes comportamientos. En los ensayos de control de humedad (ensayos 1 y 2) no se presentaron diferencias notables. No hubo evaporación apreciable del medio líquido pues la humedad residual en los sólidos al final de la fermentación fue ligeramente menor, en alrededor de 2%, con respecto a la humedad inicial (datos no mostrados). Cabe señalar que en estos ensayos cada vez que se tomó muestra, los sólidos fueron mezclados por volteo utilizando una espátula estéril con el fin de homogenizar el medio.

En los ensayos 3 y 4 se realizó la producción enzimática en matraz Erlenmeyer, en contraste con los ensayos 1 y 2 que se realizaron en cajas Petri concéntricas. En el Ensayo 3, utilizando la misma agitación por volteo de los ensayos 1 y 2, no se observó mejora ni en actividad enzimática en carboximetilcelulosa (CMCx) ni en FPx. En contraste

el Ensayo 4 realizado en matraz sin mezclado presentó CMCx superior en 10% comparado con el de caja Petri, mientras que para FPx no se observó diferencia apreciable con respecto al Ensayo 2. Posiblemente la humedad y el pH afectaron el sistema.

Tabla 55. Condiciones de operación y resultados para los experimentos de fermentación en sustrato sólido y fermentación en cultivo sumergido

Ensayo	[FORSU] ^a	C/N ^b	Control de humedad	Cultivo	pH _i ^c	Agit / mezclado	CMCx ^d Az ^e / Y'z ^f	FPx ^g Az ^e / Y'z ^f
1	20 %	40	Glicerol 10%	Petri	6.4	Volteo	0.37 / 60.9	0.25 / 41
2	20 %	40	No	Petri	6.4	Volteo	0.38 / 63.7	0.24 / 40.8
3	20 %	40	No	Matraz	5.0	Volteo	0.37 / 61.5	0.13 / 21.1
4	20 %	40	No	Matraz	5.0	No	0.42 / 70.7	0.23 / 38.6
5	25 %	40	No	Matraz	5.0	No	0.45 / 59.3	0.19 / 25.3
6	15 %	40	No	Matraz	5.0	No	0.21 / 45.7	0.16 / 36.2
7	20 %	40	No	Matraz	4.7	No	0.47 / 78.6	0.23 / 38.5
8	20 %	30	No	Matraz	4.7	No	0.49 / 81.1	0.21 / 34.7
9	20 %	20	No	Matraz	4.7	No	0.55 / 90.8	0.28 / 46.0
10	20 %	13	No	Matraz	4.7	No	0.54 / 90.4	0.29 / 48.3
11	1 %	8	NA	Matraz	4.8	300 rpm	0.99 / 89.1	0.64 / 67
12	2 %	14	NA	Matraz	4.8	300 rpm	1.21 / 60.0	1.3 / 84

Notas: ^a Concentración del sustrato FORSU en ST, ^b relación carbono/nitrógeno, ^c pH inicial, ^d actividad de carboximetilcelulasas, ^e actividad enzimática volumétrica (UI/ml para CMCx y FPU/mL para FPx), ^f rendimiento enzimático (UI/g holocelulosa para CMCx o FPU/g holocelulosa para FPx), ^g actividad enzimática en papel filtro.

El Ensayo 5 (a 25 %ST) y el Ensayo 6 (a 15 % ST) se realizaron para evaluar la variación del contenido de sólidos totales en FSS con respecto a la concentración que se venía utilizando desde el Ensayo 1 hasta el Ensayo 4 (20 %ST). Las menores actividades enzimáticas volumétricas correspondieron al Ensayo 6 con 15 %ST. El Ensayo 4 tuvo los mayores rendimientos enzimáticos comparado con los ensayos 5 y 6. Comparando únicamente las actividades enzimáticas del Ensayo 5 (25 %ST) contra las del Ensayo 4 (20 %ST), observamos que si bien la CMCx fue mayor a 25 %ST (0.45 UI/mL, Ensayo 5), la FPx resultó mayor que a 20 %ST (0.23 FPU/mL, Ensayo 4). Si se hace la comparación en términos de rendimiento enzimático, entonces fue evidente que a 20 %ST (Ensayo 4) se obtuvieron los mejores resultados (70.7 UI/g holocelulosa y 38.6 FPU/g holocelulosa para CMCx y FPx, respectivamente). Aunque hasta cierto punto una mayor concentración de sustrato permite una mayor inducción enzimática, existe evidencia de que a bajas

concentraciones se tiene una mayor utilización de la celulosa (Reczey *et al.*, 1996). Utilizar altas concentraciones de sustrato también puede implicar un probable incremento en la resistencia de la transferencia de masa debido a que se tiene una reducción en la humedad que funciona como fase para el intercambio de materiales entre el microorganismo y el medio (Reczey *et al.*, 1996, Mitchell *et al.*, 2006). Adicionalmente, bajos contenidos de humedad (alto contenido de ST) causan la reducción en la solubilidad de nutrientes, bajo grado de hidratación y alta tensión de agua o presión osmótica (Brown, 1976). Por otro lado, contenidos de humedad muy altos pueden originar una reducción en el rendimiento enzimático debido a obstáculos estéricos para el crecimiento celular como resultado de la reducción de la porosidad de la matriz sólida o espacios interpartícula (Xin & Geng, 2010). Se considera que una menor porosidad interfiere con la transferencia de oxígeno y a su vez influye negativamente en el crecimiento celular.

Xin & Geng (2010), al trabajar con *T. reesei* RUT C30 crecida en desechos de horticultura pretratados con NaOH, reportaron que para un intervalo del contenido de humedad del 50 – 87.5 %, fue el de 80 % (20 %ST) con el que se obtuvieron los mejores resultados para FPx (14.5 FPU/g sustrato) y CMCx (80 U/g sustrato). A este contenido de humedad *T. reesei* también secretó más proteína soluble. Ellos observaron que cuando se incrementaba el contenido de humedad del 55 al 80 %, la FPx y la CMCx también se incrementaban. Sin embargo, el incremento de la humedad por arriba del 80 % afectó negativamente ambas actividades. Por otro lado, también reportaron que contenidos de humedad del 85 – 87.5 % fueron necesarios para obtener máximas producciones de xilanasa, β -glucosidasa y β -xilosidasa. Como explicación a estos comportamientos, mencionan que la diferencia del contenido óptimo de humedad para cada enzima podría deberse a su dependencia por las características de fijación al agua de los sustratos, así como a los microorganismos utilizados.

Durante los ensayos 1 – 6 en FSS se observó que el pH del cultivo en sustrato sólido se incrementaba durante las cinéticas, llegando en algunos casos hasta 8, valor muy alejado del pH 5 óptimo para el crecimiento de *T. reesei*. Mantener un control del pH en un proceso en lote de FSS es complicado, por lo que es común operar la fermentación a pH libre si ésta no implica una variación muy alta entre el pH inicial y el final. La fermentación a pH libre consiste en comenzar la fermentación a un pH ligeramente

alejado del óptimo sin que se afecte sustancialmente el proceso, de manera que al modificarse el pH durante la fermentación se logre la operación en un pH cercano al óptimo durante el mayor tiempo posible. En otras palabras, el término libre se debe a la ausencia de control con las variaciones propias del metabolismo.

Otra alternativa para disminuir las variaciones de pH puede ser complementar el medio Mandels con un amortiguador adecuado. Juhász *et al.* (2005) adicionaron amortiguador Tris-maleato pH 6 (ácido maleíco, Tris-hidroxi-metil-amino-metano e hidróxido de sodio) a un cultivo de *T. reesei* RUT C30 crecida en una variedad de fuentes de carbono que incluían, celulosa delignificada, rastrojo de maíz y astillas de abeto. También el KH_2PO_4 al 1.5 % está reportado como un buen amortiguador para FCS de *T. reesei* MCG 77 crecida en una variedad de sustratos lignocelulósicos (Doppelbauer *et al.*, 1987), ya que permitió la variación del pH en 0.5 unidades.

En el Ensayo 7, al igual que en los ensayos 1 – 6, también se ocupó fermentación libre, pero comenzando la fermentación con 0.3 unidades por debajo del pH 5.0 que se venía utilizando en los ensayos anteriores. Los resultados mostraron que se logró incrementar en casi 5% el máximo obtenido para endoglucanasas con el Ensayo 5, mientras que para FPx se obtuvieron valores cercanos a las mayores actividades registradas hasta el momento (ensayos 1, 2 y 4). En general, los hongos filamentosos tienen un buen crecimiento en un amplio intervalo de pH 2 – 9, teniendo el óptimo entre 3.8 – 6.0. Xin & Geng (2010) evaluaron las producciones enzimáticas a pH inicial desde 4.5 a 8.0, con intervalos cada 0.5, para *T. reesei* RUT C30 crecida en desechos de horticultura. Ellos determinaron que no existe un efecto significativo sobre la producción enzimática entre cada intervalo de pH inicial utilizado ($\Delta\text{pH} = 0.5$). Sin embargo entre intervalos más amplios de pH sí se pudieron observar diferencias significativas. De hecho, los mínimos y máximos de actividad enzimática en tal experimento fueron para FPx de 9 - 15 FPU/g y para CMCx de 70 – 80 UI/g. A pH bajos (4.5 – 5.5) se favoreció la producción enzimática, siendo pH 5.0 el óptimo para las CMCx, xilanasas (Xilx) y β -xilosidasas. Cuando el pH fue mayor a 6.0, las actividades enzimáticas se vieron disminuidas, así como la proteína extracelular, con excepción de las β -xilosidasas cuya actividad se mantuvo casi constante.

Con respecto al efecto del pH en la actividad del extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80, se realizó un ensayo que mostró que las máximas hidrólisis se obtienen en el intervalo 4.8 – 5.22 (Anexo Fig. A3).

Los ensayos con 20 %ST de FORSU tuvieron una relación C/N de 40 (Tabla 55). Este valor se ubicó por encima del valor al que trabajaron diferentes autores con otros sustratos lignocelulósicos. Por ejemplo, Xin *et al.* (2010) utilizaron desechos de horticultura con C/N 16.8, y Kumar *et al.* (2008) bagazo de caña con C/N 15.7. Se sabe que la disponibilidad del nitrógeno influye directamente en los procesos biológicos al ser un elemento esencial tanto de los aminoácidos relacionados con el crecimiento celular, como para la síntesis de los aminoácidos que constituyen las enzimas que utilizan los organismos para facilitar la asimilación de nutrientes, como en nuestro caso de las enzimas holocelulolíticas.

Por esto se decidió realizar tres corridas con diferentes relaciones C/N, de 30, 20 y 13 (ensayos 8, 9 y 10 respectivamente), para observar sus efectos en los títulos enzimáticos. La modificación de las relaciones C/N se logró aumentando las concentraciones de urea (a 2 g/L para los tres ensayos) y de peptona de soya (a 5, 25 y 65 g/L, para los ensayos 8, 9 y 10, respectivamente). Se observó que todas las relaciones C/N probadas en los ensayos 8, 9 y 10 presentaron valores tan altos o incluso superiores para la CMCx y la FPx con respecto a los obtenidos en las corridas anteriores. Para los ensayos 9 y 10, que presentaron los mayores títulos enzimáticos (CMCx: 0.54 – 0.55 UI/ml, FPx: 0.28 – 0.29 UI/ml) y con relaciones C/N de 20 y 13 respectivamente, no se encontraron diferencias apreciables entre sus resultados ($p > 0.1$). Esto sugiere que en términos de actividad enzimática, es indistinto trabajar con la relación C/N de 20 o 13, sin embargo se puede considerar que utilizar una relación C/N de 20 representa un ahorro del 60% de la peptona utilizada para la C/N de 13.

Los últimos ensayos 11 y 12 se realizaron en FCS en matraz con 1 y 2 %ST de FORSU. Los resultados se ubicaron debajo de los 2 – 3 FPU/mL esperados para concentraciones de 2 %ST de una variedad de sustratos, de acuerdo a lo reportado por Esterbauer *et al.* (1991). En FCS, se ha observado que los títulos enzimáticas se incrementan casi proporcionalmente con el incremento de concentración del sustrato, existiendo una concentración límite después de la cual los títulos disminuyen. Dicha

concentración límite es distinta para cada sustrato y microorganismo (Linko, 1977; Doppelbauer *et al.*, 1987; Esterbauer *et al.*, 1991; Wen *et al.*, 2005). Este efecto se pudo observar en la FPx, cuyo valor se duplicó al trabajar con 2 %ST comparado con 1 %ST. Sin embargo no sucedió lo mismo con la CMCx, pues para el Ensayo 12 ésta sólo se incrementó en un 21 %.

La FCS, con una menor cantidad de sustrato que la FSS, presentó los mayores títulos enzimáticos volumétricos y holocelulósicos. Esto pudo deberse principalmente a la agitación intensiva (300 rpm) que a su vez favoreció mejores procesos de transferencia de masa sólido-líquido, oxigenación del medio y un pH más homogéneo. De la misma forma también las relaciones C/N fueron lo suficientemente bajas como para proveer suficiente nitrógeno al cultivo.

7.4.2. Fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones de FORSU y con sustratos celulósicos refinados (controles).

Se probaron las concentraciones de FORSU al 1, 2 y 3 %SV. En la Fig. 29 se muestran las cinéticas tipo de fermentaciones a estas concentraciones, mientras que en la Tabla 56 se muestran las máximas actividades obtenidas para los ensayos realizados, que continúan con la numeración de la Tabla 55.

Tabla 56. Condiciones de operación y resultados para los experimentos fermentaciones en cultivo sumergido a pH inicial 4.8 y 250 rpm

Ensayo	Sustrato	pH _i ^a	pH _f ^a	Agitación (rpm)	CMCx ^b Az ^c / Y'z ^d	FPx ^e Az ^c / Y'z ^d
13	FORSU 1 %SV	4.8	8.10	250	1.01 / 100	0.68 / 67
14	FORSU 2 %SV	4.8	8.01	250	1.23 / 61	1.20 / 59
15	FORSU 3 %SV	4.8	7.88	250	1.30 / 43	1.01 / 33
16	PF 1 %SV	4.8	4.39	250	1.6 / 127	2.5 / 198
17	PF 1 %SV + L	4.8	4.40	250	1.8 / 143	2.9 / 230
18	Solka flocc 2 %SV	4.8	4.30	250	1.7 / 65	2.1 / 80
19	Solka flocc 2 %SV + L	4.8	4.44	250	1.7 / 65	1.9 / 74
20	FORSU 1 %SV	4.8	6.66	250	1.25 / 128	1.4 / 149
21	FORSU 1 %SV + L	4.8	6.36	250	1.19 / 126	1.3 / 136

Notas: ^a pH final, ^b actividad de carboximetilcelulasas, ^c actividad enzimática volumétrica (UI/ml para CMCx y FPU/mL para FPx), ^d rendimiento enzimático (UI/g holocelulosa para CMCx o FPU/g holocelulosa para FPx), ^e actividad enzimática en papel filtro.

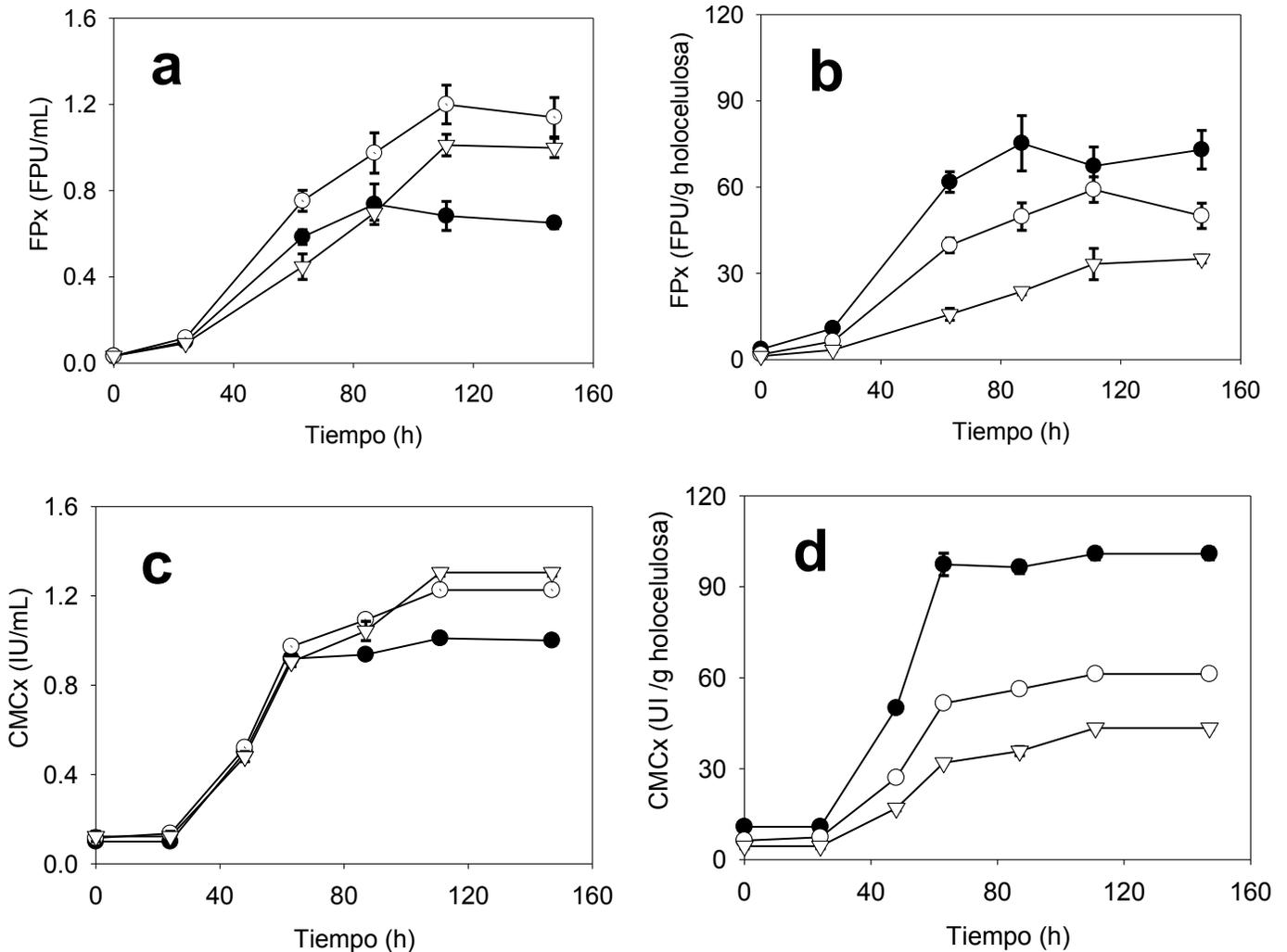


Fig. 29. Cinéticas de producción enzimática utilizando FORSU como sustrato: a) actividad de papel filtro; b) rendimiento enzimático de actividad de papel filtro; c) actividad de carboximetilcelulasas; d) rendimiento enzimático de carboximetilcelulasas. Círculos vacíos, 1 %SV; círculos rellenos 2 %SV; triángulos, 3%SV.

Con FORSU como sustrato (ensayos 13, 14 y 15), al 2 %SV se obtuvo la mayor FPx volumétrica (1.2 FPU/mL) y al 3 %SV la mayor CMCx volumétrica (1.3 UI/mL), sin embargo en términos de actividad en base holocelulosa, o rendimiento enzimático, los mejores resultados se obtuvieron al 1 %SV (100 UI/g holocelulosa y 67 FPU/g holocelulosa). Este efecto se pudo deber a que el incremento de la concentración del

sustrato haya limitado los procesos de transferencia de materia y oxígeno, teniendo por consecuencia un detrimento en el rendimiento enzimático. Existe la posibilidad de que una mayor concentración de sustrato también pudiera liberar una mayor cantidad de inhibidores por efecto de la degradación vegetal, la cual puede generar furaldehidos, ácidos débiles y compuestos fenólicos que resulten tóxicos o inhibidores de algunos procesos metabólicos (Parawira & Tekere, 2011). Sin embargo en el caso de *T. reesei* no se tienen reportes de una inhibición de producción de celulasas por estas causas. Incluso, este microorganismo ha sido utilizado para dar tratamiento biológico a hidrolizados de sauce, logrando la disminución de furfural, ácido acético y derivados de ácido benzoico (Palmqvist *et al.*, 1997).

Por la simplicidad y los buenos resultados obtenidos a 1 % SV, se determinó seguir trabajando con esta concentración.

En los ensayos control donde se usaron papel filtro Whatman No. 1 o Solka floc como sustratos (Tabla 56), se observó que *T. reesei* MCG 80 tuvo buen crecimiento y producción enzimática en estos sustratos. Adicionalmente se intentó la estrategia de adicionar lactosa 0.1 % p/v para incrementar la inducción enzimática (Fang *et al.*, 2008). Los mejores resultados (1.8 UI/mL y 2.9 FPU/mL) se obtuvieron con papel filtro adicionado con lactosa (Ensayo 17). Sin embargo, al adicionar lactosa 0.1 % p/v a ensayos con Solka floc o FORSU los resultados no mostraron mejora alguna (Fig. 30).

La lactosa no es utilizada por todas las cepas de *T. reesei* y aunque la cepa MCG 80 sí puede crecer en lactosa por medio del metabolismo alterno de la D-galactosa (Menon & Rao, 2012), la inducción del complejo celulolítico es débil (Warzywoda *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 2008). La razón principal de su uso es que resulta más económica que otros inductores, mejores pero mucho más caros, como la soforosa. De hecho, en cultivos continuos el sustrato más utilizado es lactosa o suero de leche (Esterbauer *et al.*, 1991). Para las fermentaciones con FORSU se determinó que la lactosa es prescindible ya que no mejoró las actividades enzimáticas.

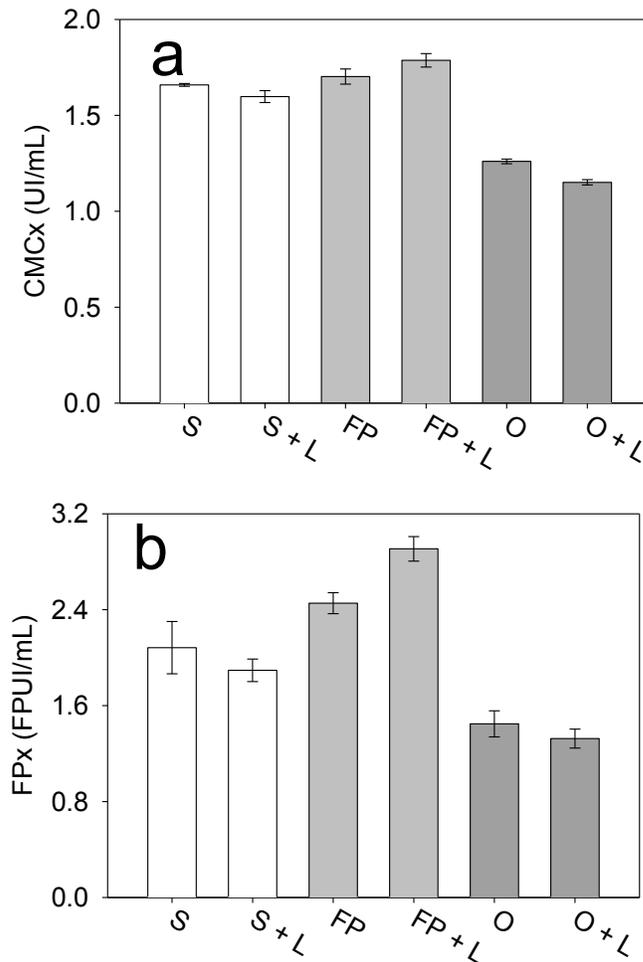


Fig. 30. Comparación de actividades enzimáticas de diferentes sustratos con y sin adición de lactosa. a) FPx, b) CMCx. (S) Solka flocc 2%, (S+L) Solka flocc 2% adicionada con lactosa, (FP) papel filtro, (FP + L) papel filtro adicionado con lactosa como sustratos, (O) FORSU, (O+L) FORSU adicionado con lactosa.

7.4.3. Producción enzimática usando sólidos de las etapas H y M.

Se realizaron cinéticas de producción enzimática con FORSU, sólidos fermentados SF de la Etapa H y sólidos digeridos SD de la Etapa M como sustratos. En la Tabla 57 se muestran las máximas actividades y rendimientos enzimáticos para los ensayos que continúan con la numeración de las Tablas 55 y 56. Los mejores títulos se obtuvieron con los SF (0.88 UI/mL y 2.14 FPU/mL) y los menores con los SD (0.68 UI/mL y 0.66 FPU/mL). Incluso para rendimientos enzimáticos el mejor sustrato fueron SF. Varios ensayos confirmatorios demostraron que los SD fueron el sustrato con menor inducción

enzimática, por lo que se dejó de considerar como sustrato para experimentos posteriores y se eligieron los SF para los ensayos a nivel fermentador. La FPx obtenida con SF fue superior en 46 % a la obtenida con FORSU, sin embargo la CMCx sólo mejoró en un 5%.

Tabla 57. Condiciones de operación y resultados para experimentos de producción enzimática usando sólidos de las etapas H-M

Ensayo	Sustrato	pH _i ^a	pH _f ^b	Agitación (rpm)	CMCx ^c Az ^d / Y'z ^e	FPx ^f Az ^d / Y'z ^e
22	FORSU 1 %SV	4.8	8.10	250	0.84 / 74	1.47 / 121
23	SF 1 %SV	4.8	7.40	250	0.88 / 77	2.14 / 178
24	SD 1 %SV	4.8	7.13	250	0.68 / 132	0.66 / 123

Notas: ^a pH inicial, ^b pH final, ^c actividad de carboximetilcelulasas, ^d actividad enzimática volumétrica (UI/ml para CMCx y FPU/mL para FPx), ^e rendimiento enzimático (UI/g holocelulosa para CMCx o FPU/g holocelulosa para FPx), ^f actividad enzimática en papel filtro.

En la Fig. 31 se observan las dinámicas de producción enzimática para FPx y CMCx. En términos de FPx, a partir de las 65 h los SF presentaron un mayor título enzimático que el FORSU y los SD. Los SF presentaron brevemente un comportamiento exponencial; en contraste, la tendencia del FORSU y de los SD fue de incremento moderado constante.

Para la CMCx llama la atención que las tendencias fueron similares entre los tres sustratos ensayados, pero diferentes de las observadas para FPx, pues no se observó ni la trayectoria tipo exponencial ni un aumento constante de actividad enzimática. El máximo de actividad enzimática se presentó a las 72 h, y a los tiempos siguientes ocurrió una disminución ligeramente constante. Además, las CMCx a tiempo cero fueron relativamente altas (0.45 – 0.60 UI/mL) con respecto a las máximas actividades alcanzadas (> 1.01 UI/mL). Este fenómeno se pudo deber tanto a la baja inducción de este tipo de enzimas, como a los fenómenos de adsorción. Se debe considerar que en el inóculo, además de micelio y sustrato, debe existir enzima libre en el medio líquido y enzima adsorbida al sustrato. Por esto, el título enzimático registrado a tiempo cero se pudo deber tanto a la enzima presente en el medio líquido como a la enzima adsorbida que se liberó al encontrarse en un nuevo medio. Por otro lado, a altos tiempos de incubación (> 80 h) la disminución del título enzimático se pudo deber a que la enzima se readsorbiera en el sustrato o por la degradación de las enzimas celulolíticas por proteasas

liberadas al medio en condiciones de bajas concentraciones de sustrato (Whelan & Pembroke, 1989; Dosoretz et al., 1990). Estos fenómenos también pueden observarse en la FPx, pero pudieran ser menos notables debido a que esta actividad es consecuencia de la interacción sinérgica de varios tipos de celulasas, en lugar de una sola clase como es el caso de la CMCx. Se ha determinado que se puede absorber en los residuos orgánicos alrededor del 33 % de endoglucanasas, 43.6 % de FPx y 15 % de β -glucosidasas (Hogan & Mes-Hartree, 1990).

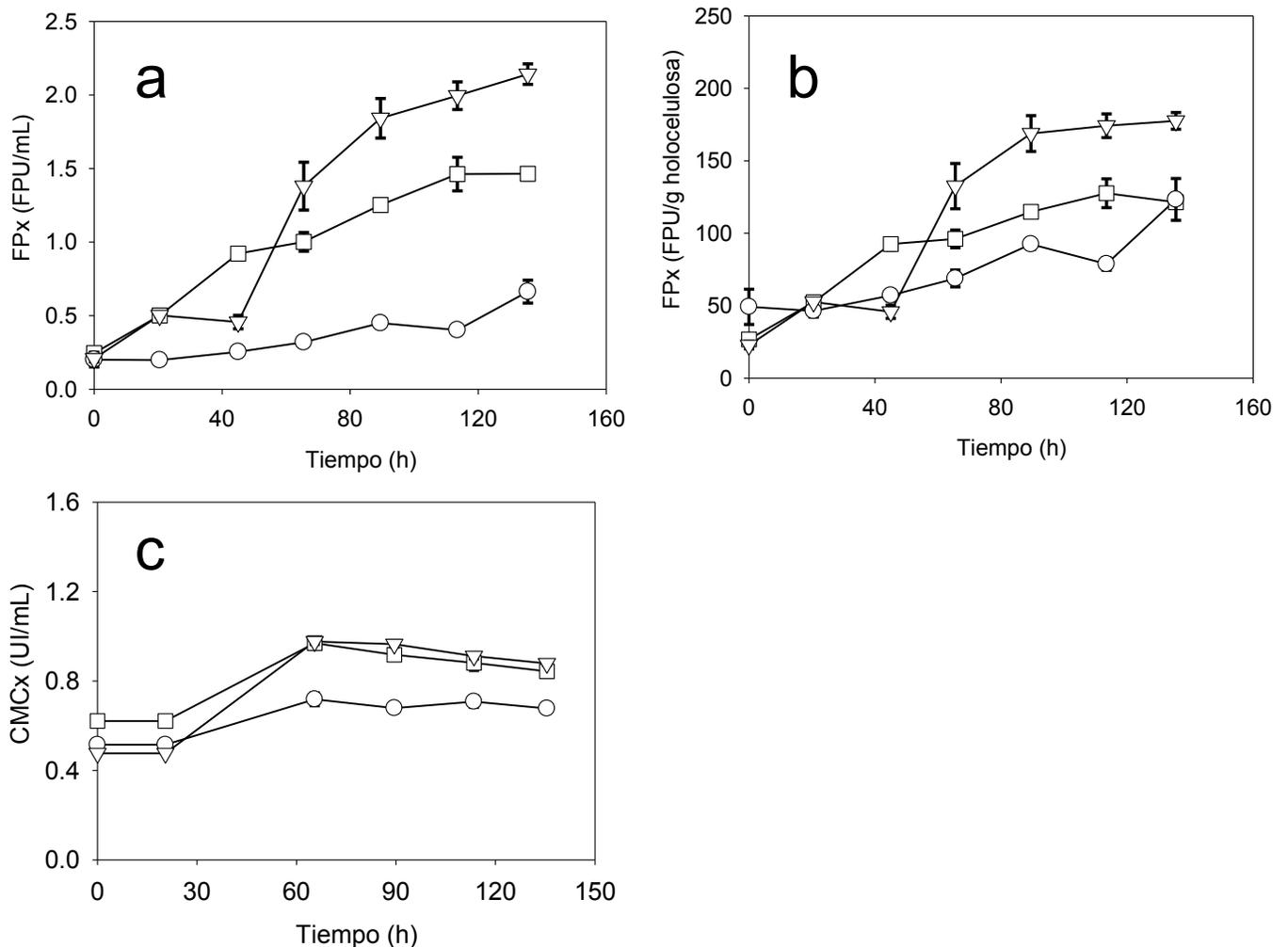


Fig. 31. Dinámicas de actividad enzimática para la evaluación de diferentes sustratos. a) actividad de papel filtro, b) rendimiento enzimático de actividad de papel filtro, c) actividad de carboximetilcelulasas. Símbolos: cuadros, FORSU 1 %SV; triángulos, SF 1 %SV; círculos, SD 1 %SV.

Se esperaba que con el FORSU, al tratarse de un sustrato sin una degradación previa y con el mayor contenido de holocelulosa de los tres sustratos probados, se obtuvieran los mejores títulos enzimáticos. Sin embargo fueron los SF como sustrato con los que se obtuvieron los mejores resultados. Una explicación pudiera ser que durante la Etapa H la actividad microbiana sobre los SF contribuyó a exponer celulosa amorfa o incluso a alterar algunas zonas cristalinas, lo que tendría como consecuencia un sustrato más fácilmente degradable y que a su vez actuara como inductor. Análogamente, Singh *et al.* (1991) obtuvieron actividades de FPx y CMCx ligeramente mayores con *T. reesei* Rut C30 crecida en pulpa gastada de papa proveniente de un proceso de sacarificación enzimática, que con las obtenidas cuando se creció en pulpa de papa fresca. Sin embargo, ellos atribuyeron este fenómeno a una mayor recalcitrancia de la pulpa gastada que la pulpa fresca que pudo haber influenciado una mayor inducción de la enzima.

En el caso de Hogan & Mes-Hartree (1990) encontraron que los residuos de álamo de una hidrólisis enzimática fueron una fuente adecuada de carbono para *Trichoderma harzianum*. Sin embargo, sólo pudieron usar este sustrato hasta una concentración de 1 %, ya que a mayores concentraciones hubo una reducción de la inducción de celulasas.

Para Chen & Wayman (1991) el uso de papel periódico parcialmente hidrolizado con celulasas también resultó benéfico para la producción de enzimas a partir de *T. reesei* RUT C30, incluso mejor que usando papel periódico pretratado con NaOH. El hecho de que los SF hayan sido un mejor inductor holocelulasas que el FORSU, pudo estar relacionado con lo observado en el proceso H-M, donde la generación de metano fue mayor con las purgas de la Etapa H (i.e. SF) que cuando se ocupaba solamente FORSU como sustrato.

Con respecto a los resultados inesperadamente bajos obtenidos con los SD, existen varias explicaciones posibles. Una pudo ser la presencia de compuestos inhibitorios que no se removieron adecuadamente en los lavados del sustrato. No se ha reportado información concluyente que califique a la lignina como un inhibidor de la actividad enzimática de *T. reesei* (Doppelbauer *et al.*, 1987, Reczey *et al.*, 1996). En experimentos realizados con hasta 4 %ST de sauce pretratado con vapor, Reczey *et al.* (1996) descubrieron que el rendimiento enzimático aumentaba con el contenido de lignina de tal forma que incluso no recomiendan el uso de sauce delignificado. Sin embargo,

dejaron abierta la posibilidad de que a concentraciones mayores de sólidos la lignina sí pudiera demostrar un efecto inhibitorio.

Una forma en que la lignina es considerada indirectamente como un inhibidor es mediante su hidrólisis, ya que forma compuestos aromáticos de bajo peso molecular como el siringaldehído, 4 hidroxibenzaldehído y la vainillina (Parawira & Tekere, 2011). Otros inhibidores para la formación de celulasas son los ácidos orgánicos como el acetato, formato, propionato y butirato (Mandels & Reese, 1960). Aún así, es poco probable que esta haya sido la causa, ya que ambos sustratos fueron sometidos al mismo procedimiento de lavado.

Otra posible causa para la baja producción enzimática con SD se pudo deber a una baja disponibilidad de celulosa degradable. Aunque el contenido de SV fue el mismo para todos los experimentos, la fracción amorfa o degradable de celulosa, que propiciara un crecimiento del microorganismo y una consecuente producción enzimática, pudo haber sido mucho menor debido a su consumo durante la Etapa M. Esto pudo haber traído como consecuencia un incremento en la proporción de celulosa cristalina y de lignina. Sin embargo, el mayor contenido de celulosa cristalina o recalcitrante no se siempre se considera como una desventaja para un sustrato, sino que al contrario se ha reportado que en algunos casos incrementa los títulos enzimáticos comparados contra sustratos con mayor contenido de celulosa amorfa (Hogan & Mes-Hartree, 1990; Singh *et al.*, 1991).

Otra causa pudo ser al mayor contenido de cenizas en este sustrato comparado con los otros. El contenido de cenizas alcanzó los 69.7 %_{bs}, comparado con 14.2 y 18.4 %_{bs} del FORSU y de los SF, respectivamente. Doppelbauer *et al.* (1987) no encontraron una relación entre el contenido de ceniza (0.4 – 17 %) para sustratos como paja de trigo, papel periódico y pulpa, entre otros, con la actividad enzimática de *T. reesei* MCG 77. Por el contrario, Wang *et al.* (2010) reportaron que los altos contenidos de ceniza (36 %_{bs}) en los lodos provenientes de la molienda del papel Kraft, alimentados para la producción enzimática de *T. reesei* RUT C30, fueron perjudiciales para el crecimiento de este microorganismo y un fuerte inhibidor de la producción de celulasas. Los autores lograron duplicar la producción enzimática al remover el contenido de cenizas de lodos a menos del 4 % por medio de un tratamiento con ácido sulfúrico que transformó el carbonato de calcio en la ceniza a sulfato de calcio. Ya en esta forma, el sulfato de calcio fue removido

con agua y el sustrato tratado con NaOH 1 N para regresar el pH a la neutralidad. Cabe señalar que su mejora también pudo haber estado influenciada positivamente por una hidrólisis ácida como consecuencia del uso del ácido sulfúrico.

Tras analizar las posibles causas del bajo desempeño de los SD como sustrato para la inducción enzimática en *T. reesei* MCG 80, la más factible parece ser la de la afectación por el alto contenido de cenizas (ca. 70%).

Un experimento presuntivo adicional tuvo por objetivo determinar si el volumen de inóculo tendría un efecto sobre los títulos enzimáticos. Se utilizaron porcentajes de inoculación de 6 y 10% v/v para matraces conteniendo SF al 1 %SV (Anexo Fig. A4). Los comportamientos para ambos porcentajes de inoculación fueron casi idénticos y a las 96 h no se encontraron diferencias significativas para CMCx ($p = 0.625$) ni para FPx ($p = 0.781$). Los máximos títulos enzimáticos concuerdan con los resultados previamente obtenidos (CMCasa ≈ 1.0 UI/mL y FPasa ≈ 2.0 UI/mL). Es probable que utilizar porcentajes de inoculación fuera del intervalo probado sí presenten efectos en la producción enzimática. Uno de estos efectos puede ser la formación de esférulas de micelio debido a una deficiente aireación o por una baja agitación (Lo, 2008). También la composición del medio puede influir en la formación de esférulas, que se han relacionado con una disminución en la producción enzimática (Domingues *et al.*, 2000; Lo, 2008). En este sentido el Tween 80 juega un papel muy importante pues es indispensable para evitar la formación de éstas (Domingues *et al.*, 2000).

7.4.4. Producción enzimática en fermentadores Sixfors®.

Los ensayos 25 a 31 de la Tabla 58 muestran los resultados utilizando fermentadores con volumen de operación de 450 mL en lugar de matraces Erlenmeyer, en fermentación libre o con control de pH y con cambio de régimen de lote a lote alimentado.

Los ensayos 25 a 28 muestran resultados muy similares entre sí. El Ensayo 27 con control de pH 4.8 mostró la mayor CMCx (1.07 UI/mL), sin embargo la fermentación libre empezando a pH 4.8 y finalizando en 6.15 tuvo la mayor FPx (1.76 FPU/mL).

Los ensayos 27 y 28 con pH controlado tuvieron sus máximos rendimientos y actividades enzimáticas entre las 132 y 156 h de operación. Posterior a este tiempo, se cambió su régimen de operación de lote a lote alimentado, cuyos resultados finales

corresponden a los ensayos 29 y 30. La conversión de la operación en lote a lote alimentado mediante pulsos de alimentación a un ritmo de 1.5 g SV/L/d (señalado con flechas en la Fig. 30), remontó las actividades enzimáticas hasta la cuarta adición, después de la cual las actividades disminuyeron hasta valores de 1.6 y 1.5 FPU/mL a las 252 h. Tanto en lote como en lote alimentado, los mejores resultados se obtuvieron a pH 4.8, aunque ambas cinéticas mostraron un perfil muy similar en cuanto a fases de latencia y productividades.

Tabla 58. Condiciones de operación y resultados para experimentos de producción enzimática en fermentadores Sixfors, usando como sustrato SF 1.5 %SV

Ensayo	Operación	pH _i	pH _f	Agitación (rpm)	CMCx Az ^a / Y'z ^b	FPx Az ^a / Y'z ^b
25	Lote	4.8	6.15	350 – 450	1.05 / 80.1	1.76 / 126
26	Lote	4.2	4.2	350 – 450	0.98 / 60.9	1.46 / 91.4
27	Lote	4.8	4.8	350 – 450	1.07 / 65.8	1.61 / 101
28	Lote	5.8	5.8	350 – 450	0.95 / 53.2	1.29 / 74.2
29	Lote alimentado ^c	4.8	4.8	350 – 450	1.13 / 80.0	2.06 / 146
30	Lote alimentado ^c	5.8	5.8	350 – 450	1.01 / 64.9	1.76 / 111
31	Lote	3.8	3.8	350 – 450	1.10 / 80.0	1.59 / 116

Notas: ^a Actividad enzimática volumétrica (UI/ml para CMCx y FPU/mL para FPx), ^b Rendimiento enzimático (UI/g holocelulosa para CMCx o FPU/g holocelulosa para FPx), ^c Resultados para el cambio de régimen de lote a lote alimentado del ensayo 28.

Si bien el cambio de régimen a lote alimentado logró el incremento de la actividad enzimática, la productividad enzimática en términos de FPU/L/h fue menor en este régimen. Omitiendo las fases de latencia, de las 24 a las 108 h la productividad para ambos ensayos en lote (ensayos 27 y 28) fue 11.3 FPU/L/h, mientras que en lote alimentado de las 156 a las 228 h, las productividades fueron 7.0 y 6.7 FPU/L/h para el Ensayo 29 (pH 4.8) y para el Ensayo 30 (pH 5.8) respectivamente. Tal vez sería posible incrementar las productividades en el lote alimentado o al menos igualarla a las productividades en lote, si la carga orgánica se duplicara o triplicara. La producción enzimática por lote alimentado a menudo es considerada una buena opción para incrementar las producciones y rendimientos enzimáticos. Kim *et al.* (1997) lograron el incremento de más del doble de FPx al cambiar el modo de producción de lote a lote

alimentado en un fermentador de tanque agitado de 3 L para la producción de holocelulasas a partir de *Aspergillus niger* KKS crecida en paja de trigo.

Aunque los resultados de fermentación por lote alimentado en reactores Sixfors tipo tanque agitado fueron prometedores, tal vez el escalamiento a un volumen de operación mayor podría ser realizado en fermentadores diferentes a los agitados por aspás. Éstos provocan efectos de corte que lesionan el micelio y que pueden desactivar las enzimas, por lo que los biorreactores tipo air-lift o columna de burbujas podrían ser usados en su lugar (Howard *et al.*, 2003). Para Kim *et al.* (1997) el uso de biorreactores tipo air-lift y columna de burbujas dieron ligeramente mayores rendimientos y productividades enzimáticas que un reactor de tanque agitado con *Aspergillus niger* KKS crecida en paja de trigo al 1 – 2 %p/v.

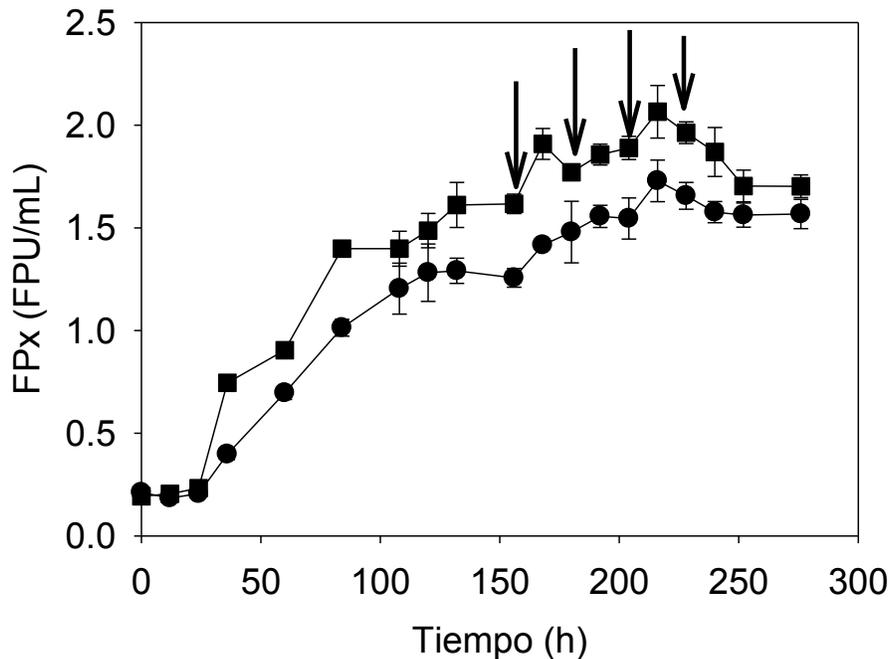


Fig. 32. Cinética de actividad enzimática. Ensayos en lote: (■) Ensayo 27 pH 4.8, (●) Ensayo 28 y 30 pH 5.8. Las flechas indican los pulsos de alimentación.

El Ensayo 31 muestra un experimento presuntivo donde se ocupó un pH controlado 3.8. Comparándolo contra un control interno a pH controlado 4.8 se obtuvieron resultados prometedores (Anexo Fig. A5), sin embargo éstos necesitan ser confirmados.

7.5. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80

7.5.1 Sacarificación de sustratos celulósicos

Se realizaron ensayos de sacarificación de FORSU, papel filtro (PF) y SF de la Etapa H con los extractos enzimáticos de *T. reesei* MCG 80 (Extracto Tr) y con la enzima comercial Celluclast (Novozymes) bajo un diseño experimental 3x2 (Tabla 59). Ambas preparaciones enzimáticas de Extracto Tr y Celluclast se cargaron en la misma proporción de FPasa (1.2 FPU/mL o 60 FPU/g SV de sustrato). Cuando se usó el Extracto Tr, todas las sacarificaciones fueron mayores que las obtenidas con Celluclast para todos los sustratos (Fig. 33a); mientras que el papel filtro fue el sustrato que más sacarificados produjo (Fig. 33b). Los sustratos produjeron más sacarificados en el orden papel filtro > SF > FORSU. Se observó que tanto el sustrato como el tipo de enzima tuvieron influencia significativa en la sacarificación ($p < 0.0012$ y $p < 0.0402$, Anexo Tabla A13), sin embargo no se observó interacción entre ambos factores. Por otro lado, el comportamiento de la sacarificación en todos los casos fue asintótico (Fig. 34).

Tabla 59. Resultados de sacarificación a 60 FPU/g SV de sustrato a las 86 h

Sustrato	[GX] ^a (g/L)	X/G ^b (-)	$\eta_{s,sv}$ ^c (% _{bSV})	$\eta_{s,h}$ ^d (% _{bholocel})
FORSU + extr Tr	9.77 ± 0.63	0.30 ± 0.011	48.9 ± 3.2	54.3 ± 3.5
FORSU + Celluclast	7.99 ± 0.52	0.28 ± 0.010	39.9 ± 2.6	44.4 ± 2.9
PF + extr Tr	18.32 ± 0.56	0.13 ± 0.002	91.6 ± 2.1	96.4 ± 2.4
PF + Celluclast	15.51 ± 0.22	0.09 ± 0.025	77.6 ± 2.6	83.3 ± 2.9
SF + Ext Tr	13.09 ± 0.79	0.18 ± 0.009	65.4 ± 3.8	72.7 ± 4.2
SF + Celluclast	10.34 ± 2.61	0.24 ± 0.029	51.7 ± 12.6	57.4 ± 14.1

Notas: ^a concentración de glucosa y xilosa (ver Ec. 24), ^b relación xilosa/glucosa (ver Ec. 25), ^c eficiencia de sacarificación en base SV (ver Ec. 26), ^d eficiencia de sacarificación en base holocelulosa (ver Ec. 27).

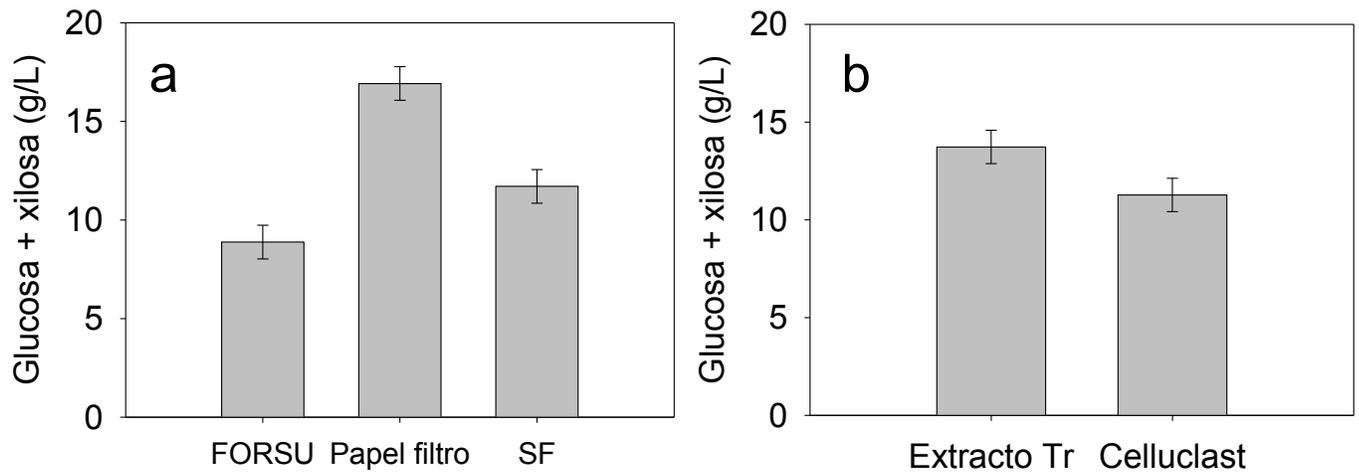


Fig. 33. Efectos de la sacarificación sobre (a) sustratos, (b) enzimas.

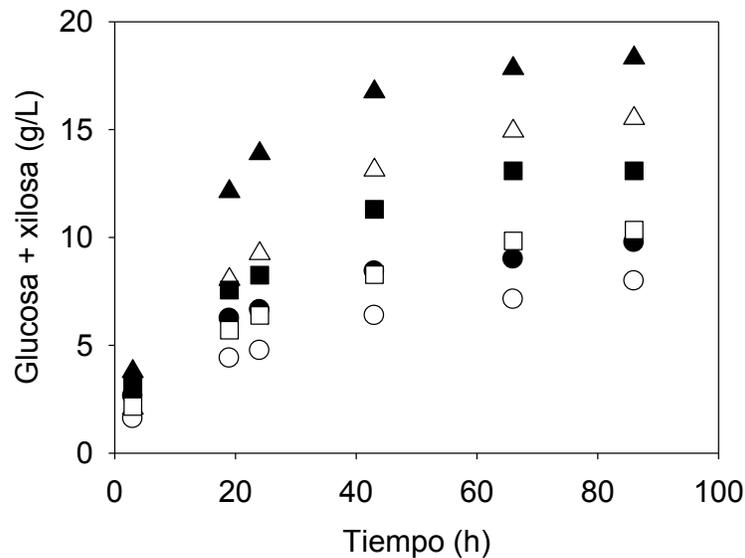


Fig. 34. Cinéticas de sacarificación. Símbolos negros, extracto enzimático; símbolos blancos, Celluclast^{mr}; Triángulos, papel filtro; Cuadros, SF; Círculos, FORSU.

La razón por la cual los SF presentaron mayor sacarificación que la FORSU puede ser análoga a lo ocurrido en la metanogénesis a partir de SF (Etapa M), donde con este sustrato se obtuvieron mejores productividades de CH₄ que ocupando la FORSU. En su momento se explicó que era probable que los SF presentaran zonas más accesibles a la degradación por efecto de la hidrólisis parcial sucedida en la Etapa H. Esto también fue

similar a lo observado en la Etapa Z, donde los SF indujeron mayor producción de celulasas que la FORSU (sección 7.4.3).

Se alcanzaron eficiencias de sacarificación en base sólidos volátiles ($\eta_{s,SV}$) cercanas al 50 % para la FORSU, y de hasta 65 % para los SF. La mayor $\eta_{s,SV}$ se obtuvo con PF como sustrato, algo completamente esperable al tratarse de un sustrato refinado y sin presencia de probables inhibidores (Singh *et al.*, 1991; Parawira & Tekere, 2011). Comparado con otros procesos de sacarificación reportados en literatura, los resultados obtenidos en esta actividad se encuentran en el intervalo superior de η_s . La mayoría de los estudios de sacarificación ocupan pretratamientos químicos, térmicos o mecánicos, entre los que se encuentran los de hidrólisis ácida diluida, explosión de vapor, molido de bolas y ozonación (Tabla 7). Por ejemplo, Ballesteros *et al.* (2010) ocuparon un pretratamiento térmico (160 °C por 30 min) aplicado a RSM al 20 %ST, para obtener 35 g glucosa/L ($\eta_{s,SV} = 41.6$ %) con celulasas Celluclast 1.5 L (NS 50013) y β -glucosidasas Novozyme 188 (NS 50010). Clanet *et al.* (1988) también sacarificaron RSM pero a una concentración menor (6 %ST). Utilizaron extracto enzimático de *T. reesei* CL847 y lograron una $\eta_{s,SV}$ de 48 %. A una concentración aún menor de RSM (1 %ST), Li *et al.* (2007) obtuvieron una alta sacarificación ($\eta_{s,bcel} = 72.8$ %) con una carga enzimática de *T. viride* (60 FPU/g) aplicada al sustrato pretratado con ácido diluido (H_2SO_4 al 1% v/v, 3 h, 60 °C) seguido de pretratamiento térmico (120 °C, 15 min). Esta combinación fue la mejor para una serie de ensayos que incluyeron pretratamientos de ácido diluido, térmico, microondas, y sus combinaciones. Con un pretratamiento aún más agresivo (H_2SO_4 al 0.4% v/v, 3 h y 60 °C, seguido de explosión de vapor a 210 °C, 3 min), Nguyen *et al.* (1999) lograron una $\eta_{s,bcel} = 80$ % para desechos sólidos mixtos a 2.7 %ST sacarificados con celulasas a 66 FPU/g celulosa. Por otro lado, Vavouraki *et al.* (2013) ocuparon únicamente tratamiento termoquímico (1.5% HCl, 120 °C, 120 min) aplicado a residuos de cocina al 1 %ST, sin ningún sistema enzimático, alcanzando así una $\eta_{s,SV} = 57.3$ %.

Los pretratamiento incrementan la sacarificación de un sustrato lignocelulósico, sin embargo se debe considerar su agresividad al ambiente y costos involucrados. Al respecto, se considera que el costo del pretratamiento de ácido diluido es menor que los tratamientos térmicos de corta duración, y que el efecto del tratamiento térmico sobre la sacarificación es menor comparado con el efecto que tiene la carga enzimática (Li *et al.*,

2007). Algunos pretratamientos generan inhibidores, principalmente furaldehidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos derivados de la hidrólisis de la lignina (Parawira & Tekere, 2011).

En la Tabla 60 se muestran las características enzimáticas de Celluclast y del Extracto Tr. Las actividades específicas normalizadas en base FPx, muestran que el Extracto Tr tuvo mayor concentración de Xilx y CMCx comparado con Celluclast. Tal vez debido a esta mayor carga de Xilx y CMCx en relación a la FPx fue que se obtuvieron mayores sacarificados con el Extracto Tr que con Celluclast, aún a pesar de que la β -glucosidasa normalizada fuera menor en el Extracto Tr.

Tabla 60. Características enzimáticas de Celluclast y del Extracto Tr

Parámetro	Celluclast ^a		
	Volumétrico	Específico	Específica normalizada ^b
FPx	98.5 ± 2.7 FPU/mL	0.80 ± FPU/mg	1 FPU/FPU
CMCx	65.1 ± UI/mL	0.53 ± UI/mg	0.66 UI/FPU
Xilx	156.3 ± U/mL	1.26 ± U/mg	1.58 U/FPU
β -glucosidasa	14.0 ± μ mol/min/mL	0.11 ± μ mol/min/mg	0.14 μ mol/min/FPU
Proteína	123.6 ± mg/mL	NA	NA
Parámetro	Extracto Tr ^c		
	Volumétrico	Específico	Específica normalizada ^b
FPx	37.01 ± 3.0 FPU/mL	0.87 ± 0.07 FPU/mg	1 FPU/FPU
CMCx	35.25 ± 0.01 UI/mL	0.83 ± 2.3E-4 UI/mg	0.95 UI/FPU
Xilx	87.6 ± 0.42 U/mg	2.07 ± 0.01 U/mg	2.4 U/FPU
β -glucosidasa	1.63 ± μ mol/min/mL	0.04 ± μ mol/min/mg	0.04 μ mol/min/FPU
Proteína	42.3 ± 1.2 mg/mL	NA	NA

Notas: ^a enzima comercial concentrada Celluclast (Sigma-Aldrich); ^b actividad específica normalizada en base 1 FPU/mL; NA, no aplica; ^c extracto de *T. reesei* concentrado.

7.5.2. Sacarificación utilizando diferentes relaciones enzima:sustrato

Se realizaron experimentos para probar 5 niveles de relaciones enzima:sustrato. El sustrato utilizado fueron los SF y la enzima fue el Extracto Tr. En la Tabla 61 y en la Fig. 35 se muestran los resultados en función de la glucosa liberada, la eficiencia y el rendimiento de sacarificación. Se determinó que el experimento fue significativo ($p < 0.0038$, Anexo Tabla A14) para la producción de glucosa y para el rendimiento de sacarificación ($p < 0.0001$, Anexo Tabla A15).

Como era de esperarse, con el incremento de la relación enzima:sustrato la sacarificación también fue mayor, obteniéndose la máxima sacarificación ($G_X = 11.59$ g/L) a 120 FPU/g SV. Sin embargo, el máximo rendimiento de sacarificación no se observó a 120 FPU/g SV sino a 40 FPU/g SV ($Y_s = 11.06$ mg azúcares/FPU). Esto se debió a que el incremento de la sacarificación del sustrato no siguió la proporcionalidad del incremento de la relación enzima:sustrato. Ballesteros *et al.* (2010) también ensayaron el efecto de diferentes cargas enzimáticas sobre los RSM (20 %ST). Como era de esperarse, con la carga enzimática más baja de 20 FPU/g celulosa sus sacarificaciones fueron las más bajas (30 g glucosa/L), y aunque con cargas mayores de 40 y 60 FPU/g celulosa las sacarificaciones fueron mayores (34.8 y 35 g glucosa/L), éstas no mostraron un incremento proporcional al incremento de las cargas enzimáticas. De aquí se aprecia que un incremento del doble de la carga enzimática, sólo logró un incremento del 20 % de la glucosa liberada, lo que puede comprometer la factibilidad económica del proceso. En general, considerando el alto costo de las enzimas, para cada proceso se debe encontrar la relación enzima:sustrato que satisfaga las necesidades de eficiencia, rendimiento y costo del proceso.

Tabla 61. Resultados de sacarificación para ensayos de relación enzima:sustrato

Relación enzima: sustrato (FPU/g SV)	[GX] ^a (g/L)	$\eta_{s,sv}$ ^b (% _{bSV})	$\eta_{s,h}$ ^c (% _{bholocel})	Y_s ^d (mg azúcares/FPU)
40	10.02 ± 0.26	50.1 ± 1.0	55.7 ± 1.33	11.06
60	9.60 ± 0.29	48.0 ± 1.9	53.3 ± 2.2	6.80
80	9.65 ± 0.40	48.2 ± 3.6	53.6 ± 3.9	5.43
100	10.49 ± 0.29	52.5 ± 3.4	58.3 ± 3.7	4.59
120	11.59 ± 0.13	58.0 ± 1.5	64.4 ± 1.9	4.31
Control Celluclast 60 FPU/g SV	7.13 ± 0.23	35.6 ± 1.4	39.6 ± 1.8	5.34

Notas: ^a concentración de glucosa + xilosa (ver Ec. 24), ^b eficiencia de sacarificación en base SV (ver Ec. 26), ^c eficiencia de sacarificación en base holocelulosa (ver Ec. 27), ^d rendimiento de sacarificación (ver Ec. 28).

Los sólidos remanentes del proceso de sacarificación pueden incluso utilizarse como sustrato de otros procesos. Por ejemplo, como se discutió con anterioridad, Singh *et al.* (1991) utilizaron la pulpa sacarificada de papa para inducir una producción enzimática de *T. reesei* Rut C30 ligeramente mayor, comparada con la producción enzimática a partir

de pulpa fresca de papa.

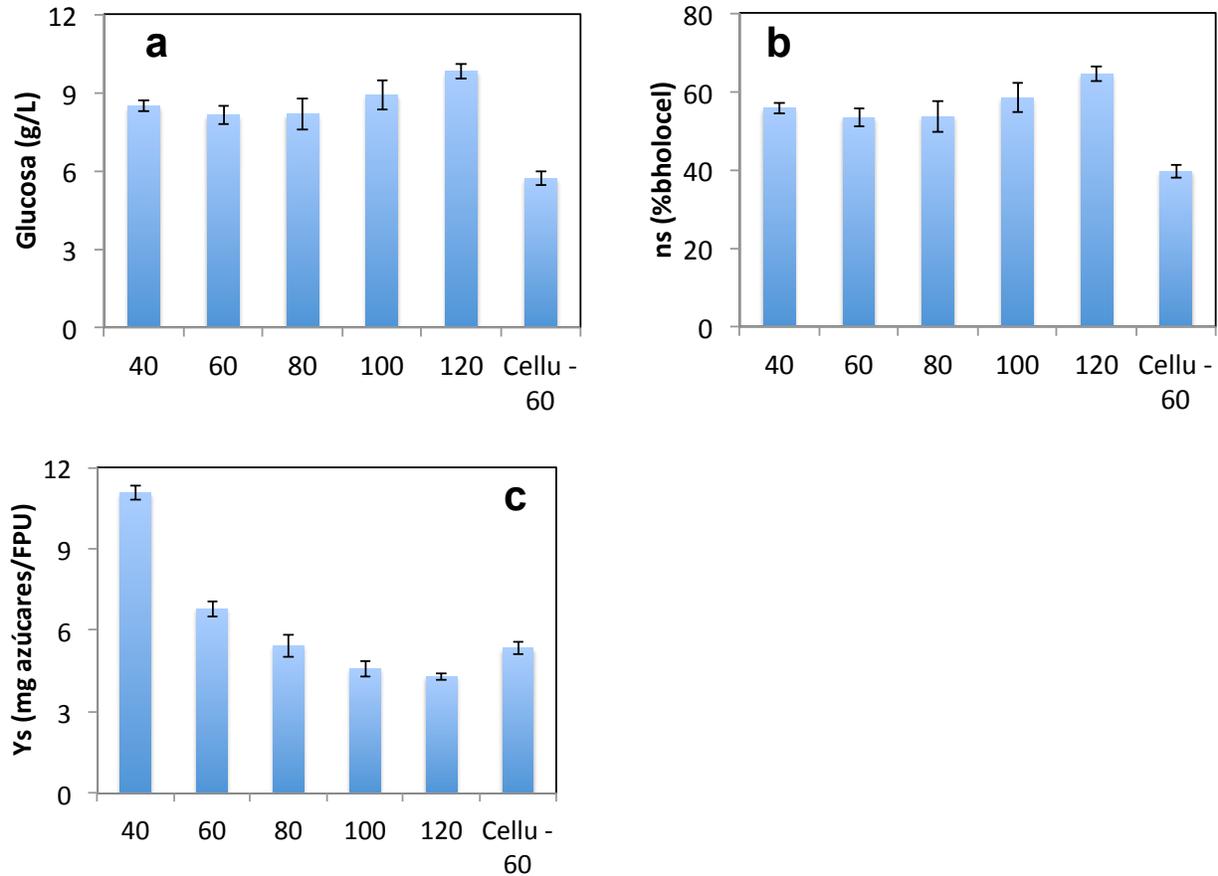


Fig. 35. Comparativo de los experimentos de relación enzima:sustrato y el control Celluclast a 60 FPU/g SV, a) concentración final de glucosa, b) eficiencia de sacarificación en base holocelulosa, c) rendimiento de sacarificación. Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento. Los errores del diseño fueron 0.246 y 0.165 para la producción de glucosa y para el rendimiento de sacarificación, respectivamente (Anexo, Tabla A14 y A15).

Se realizaron los ensayos confirmatorios de los resultados obtenidos con 40 y 60 FPU/g SV en los experimentos de relación enzima:sustrato (Tabla 62). En estos ensayos no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.1$) para la sacarificación de los SF, por lo que se propone que un posible escalado pudiera realizarse con la carga enzimática de 40 FPU/g SV para ahorrar costes.

El tiempo de sacarificación podría reducirse a menos de las 72 h con el fin de reducir los gastos energéticos de operación, justo hasta el tiempo necesario para alcanzar

el 80 % de la sacarificación experimental máxima, o hasta algún otro tiempo lo suficientemente rentable. Por ejemplo con FORSU como sustrato se alcanzó el 80 % de la sacarificación experimental máxima alrededor de las 22.5 – 29 h, y para PF como sustrato, el mismo porcentaje se alcanzó entre las 29 – 40 h (Fig. 34). Ballesteros *et al.* (2010) observaron que para cargas enzimáticas de 40 y 60 FPU/g de celulosa, la máxima sacarificación casi se alcanzó a las 48 h de reacción. Kaur *et al.* (2012) también reportaron las máximas sacarificaciones a las 48 h para tallos de algodón pretratados con álcali (4 %p/v) y con ozono (42 g/L y 23 g/L, respectivamente).

Tabla 62. Resultados de sacarificación confirmatoria para ensayos de relación enzima:sustrato

Relación enzima: sustrato (FPU/g SV)	[GX] ^a (g/L)	$\eta_{s, sv}$ ^b (% _{bSV})	$\eta_{s, h}$ ^c (% _{bholocel})	Y_s ^d (mg _{azúcares} /FPU)
40	7.86 ± 0.34	46.1 ± 2.0	51.3 ± 1.3	8.68
60	9.60 ± 0.29	44.5 ± 0.2	49.5 ± 2.2	6.15
Control Celluclast 60 FPU/g SV	7.13 ± 0.23	36.3 ± 5.1	40.3 ± 1.8	4.84

Notas: ^a concentración de glucosa y xilosa (ver Ec. 24), ^b eficiencia de sacarificación en base SV (ver Ec. 26), ^c eficiencia de sacarificación en base holocelulosa (ver Ec. 27), ^d rendimiento de sacarificación (ver Ec. 28).

La Tabla 63 muestra las características composicionales de los diferentes sólidos utilizados y/o generados en la experimentación del modelo de biorrefinería H-M-Z-S. Se observa que el principal componente agotado de la holocelulosa fue la hemicelulosa, pues de constituir hasta un 40 % del total de la holocelulosa en el FORSU, pasó a representar entre el 7 y 12 % en los SF y SD respectivamente. Más aún, en los sólidos re-fermentados (SRF) de la Etapa Z y en los sólidos hidrolizados (SH) de la presente Etapa S, su contenido fue menor al 5 % del total de holocelulosa. Debido a la recalcitrancia de la lignina, su concentración en los sólidos totales aumenta conforme la holocelulosa se degrada. Los SRF presentan una concentración de celulosa tan baja como la de los SD. En el caso de los SH, la celulosa se encuentra en una proporción elevada, presumiblemente en forma de celulosa cristalina (Hogan & Mes-Hartree, 1990).

Para lograr un uso integral de los sacarificados es importante que éstos no sean inhibitorios para otros procesos microbiológicos. Por ejemplo, Clanet *et al.* (1988) obtuvieron sacarificados a partir de RSM hidrolizados con extracto enzimático de *T. reesei*

CL847, los cuales fueron utilizados exitosamente como sustrato por bacterias, levaduras y hongos, con crecimientos comparables a los obtenidos con glucosa como fuente de carbono. Por su parte, Ballesteros *et al.* (2010) utilizaron también sacarificados de RSM para la producción de etanol (30 g/L) utilizando sacarificación y fermentación simultáneas en lote alimentado. Para Nguyen *et al.* (1999), quienes obtuvieron sus sacarificados a partir de una mezcla de diferentes residuos, fue necesaria una aclimatación a este sustrato para su cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se debió principalmente a una ligera generación de compuestos tóxicos como consecuencia de las condiciones drásticas de su pretratamiento, conformado por una hidrólisis ácida con explosión de vapor (0.4 % H₂SO₄, 210 °C, 3 min). Cuando la presencia de compuestos tóxicos (e.g. furaldehidos, compuestos fenólicos) es muy alta, una de las estrategias para removerlos es por métodos biológicos, como la adición de lacasas o por el uso de cultivos de *T. reesei* (Parawira & Tekere, 2011).

Tabla 63. Características composicionales de sólidos utilizados/generados

Parámetro	FORSU	SF	SD	SRF	SH
Sólidos volátiles (% _{bs})	85.8 ± 0.24	81.6 ± 0.33	30.3 ± 0.20	67.5 ± 0.06	80.7 ± 1.78
Ceniza (% _{bs})	14.2 ± 0.35	18.4 ± 0.24	69.7 ± 0.54	32.2 ± 0.50	19.3 ± 0.95
Celulosa (% _{bs})	46.6 ± 1.40	66.2 ± 0.75	14.8 ± 0.35	19.7 ± 0.81	52.8 ± 0.44
Celulosa (% _{bsV})	54.3 ± 1.54	81.1 ± 0.88	48.8 ± 1.31	29.2 ± 1.20	65.4 ± 0.74
Hemicelulosa (% _{bs})	31.1 ± 1.60	5.40 ± 0.79	2.10 ± 0.28	0.60 ± 0.55	0.20 ± 0.18
Holocelulosa (% _{bs})	77.7 ± 1.80	71.6 ± 0.83	16.9 ± 0.21	20.3 ± 0.45	53.0 ± 1.01
Lignina (% _{bs})	8.1 ± 0.98	9.9 ± 0.54	13.5 ± 0.68	21.0 ± 0.02	28.7 ± 0.40

Notas: FORSU, fracción orgánica de residuos sólidos urbanos; SF, sólidos fermentados; SD, sólidos digeridos; SRF, sólidos re-fermentados; SF, sólidos hidrolizados.

7.5.3. Ensayos de actividad enzimática residual

Se constató el potencial de reutilizar las enzimas después de la sacarificación de los SF a 5 niveles de relación enzima:sustrato (Tabla 64). Al finalizar las 72 h de sacarificación, los sobrenadantes fueron recuperados y se les determinó actividad de FPasas ($p < 0.0001$, Anexo Tabla A16).

En general se obtuvieron muy buenas recuperaciones de actividad enzimática (FP_{x,r} > 70 %). Los resultados fueron significativos, señalando que la FP_{x,r} fue mayor a

menores cargas enzimáticas (Tabla 64).

La sacarificación con la carga de 40 FPU/g SV presentó la mayor FPx,r de 86 %. Esto se pudo deber a una mayor adsorción de la enzima al sustrato en los ensayos que tuvieron las relaciones enzima:sustrato más altas, puesto que se ha reportado que la proporción de enzima adsorbida al sustrato residual es dependiente de la relación enzima:sustrato, de la eficiencia de la hidrólisis y del contenido de lignina del sustrato (Hogan & Mes-Hartree, 1990). Se debe lograr una mejor comprensión de los fenómenos de adsorción y desorción para mejorar tanto la hidrólisis de los sustratos, como la recuperación enzimática. Las exoglucanasas se pueden unir al sustrato insoluble por medio de dos elementos: el dominio catalítico y el dominio de unión a celulosa. La adsorción sólo del dominio de unión a celulosa no permite la hidrólisis del sustrato; para esto también es necesaria la unión del dominio catalítico (Duff & Murray, 1996). Se considera que una adsorción más fuerte lleva a una mayor hidrólisis del sustrato (Hogan & Mes-Hartree, 1990). Consecuentemente cuando existe una fuerte adsorción de las endo y exoglucanasas al sustrato celulósico, la desorción no se realiza a menos que el sustrato se haya degradado (Duff & Murray, 1996).

Tabla 64. Recuperación de actividad enzimática

Experimento (FPU/g SV)	FPx,i ^a (FPU/mL)	FPx,f ^b (FPU/mL)	FPx,r ^c (%)
40	1.00	0.86	86
60	1.31	1.08	82
80	1.68	1.28	76
100	2.03	1.57	77
120	2.45	1.77	72
Control Celluclast 60 FPU/g SV	1.34	1.00	75

Notas: ^a FPx inicial a t = 0 h, ^b FPx final a t = 72 h, ^c Recuperación de la FPx (FPx,r = FPx,f/FPx,i * 100). Las actividades enzimáticas de los concentrados del extracto Tr y de Celluclast fueron 17.55 y 111.2 FPU/mL respectivamente. Error del diseño = 0.

Las FPx,r del 70 – 86 % observadas, abren la posibilidad de recuperar y reciclar el extracto enzimático para nuevas sacarificaciones. El reciclaje de enzimas es visto como una excelente alternativa para disminuir los costos de la hidrólisis enzimática, ya que se considera que el costo de las enzimas es aproximadamente el 60 % del costo total del proceso (Singh *et al.*, 1991, Nguyen *et al.*, 1999). Algunas de las técnicas de reciclaje o

de reutilización de las enzimas incluyen la inmovilización de éstas en soportes, la ultrafiltración del hidrolizado para separar las enzimas de los sacarificados, recuperación por desorción del residuo no hidrolizado utilizando amortiguador fosfatos pH 7, o por contacto del mismo hidrolizado con sustrato fresco (Singh *et al.*, 1991).

Singh *et al.* (1991) adsorbieron las enzimas del hidrolizado de pulpa de papa de 24 h a un sustrato fresco mediante 10 min de agitación a temperatura ambiente. A continuación centrifugaron esta mezcla y el sustrato con las enzimas adsorbidas fue hidrolizado en un nuevo matraz a 50 °C por 24 h, con lo que alcanzaron 32 % de sacarificación. Además, en otro experimento los mismo autores incubaron el residuo no hidrolizado de una sacarificación junto con sustrato fresco y amortiguador, a una concentración del sustrato de 60 g/L. En esta ocasión en 24 h se logró el 18 % de sacarificación del sustrato mixto. Después de remover los hidrolizados, se utilizó nuevo amortiguador y tras 24 h a 50 °C se logró un 38 % de hidrólisis de los polisacáridos.

Por otro lado, Nguyen *et al.* (1999) recuperaron por ultrafiltración las celulasas provenientes de un reactor en lote alimentado para la sacarificación de desechos sólidos mixtos, y las reutilizaron en el mismo. De esta forma hidrolizaron entre 80 y 90 % de la celulosa contenida en el sustrato mixto compuesto por aserrín, podas de almendro, paja de trigo, papel de oficina de desecho y papel periódico. La carga enzimática neta fue 10 FPU/g celulosa. Más aún, posteriormente ocuparon los hidrolizados para la producción de etanol con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los sólidos hidrolizados pueden incluso tener aún algún valor biotecnológico. Una aplicación es su reuso en combinación con sustrato fresco para incrementar la producción enzimática. Hogan & Mes-Hartree (1990) combinaron residuo de álamo hidrolizado con madera de álamo tratada por explosión de vapor y obtuvieron altos niveles de celulasas (0.72 – 0.85 FPU/mL) comparados con sustrato sin hidrolizar (0.55 – 0.67 FPU/mL).

7.6. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos (ES-Reprode)

La hipótesis general de esta Tesis consideraba el supuesto que el modelo de biorrefinería se constituiría por un proceso de cuatro etapas en serie: H (producción de hidrógeno), M (producción de metano), Z (producción de enzimas) y S (producción de sacarificados); logrando así el aprovechamiento máximo de la FORSU. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos experimentalmente en las etapas H, M, Z y S, se estableció que la configuración del modelo de biorrefinería que daba los mejores resultados correspondía a un proceso serie-paralelo.

El proceso serie-paralelo (Fig. 36) planteado inicia con la alimentación de FORSU a la Etapa H para la producción de hidrógeno y sólidos fermentados (SF). Una porción de los SF generados en esta etapa es alimentada tal cual a la Etapa M para la producción de metano y generación de sólidos diferidos (SD). Los SD serían usados potencialmente como acondicionador de suelos.

La porción de SF que no se alimentó a la Etapa M, fue sometida a un tratamiento de lavado para extraer los lixiviados (Lx), principalmente constituidos por AOVs y solventes. Estos SF lavados (SF_L) son alimentados a la Etapa Z y a la Etapa S.

En la Etapa Z se realiza la producción de enzimas usando el hongo *T. reesei* MCG 80 alimentado con SF_L . Las enzimas producidas son recuperadas en forma de extracto concentrado (Ez) tras un proceso de centrifugación (C) y ultrafiltración (UF). El Ez puede ser comercializado para otros procesos (e.g. sacarificación, deslavado de mezcilla, clarificación de jugos, etc.). El sedimento de la centrifugación fueron los sólidos re-fermentados (SRF), constituidos por sustrato residual y biomasa de *T. reesei*, que pueden ser utilizados como alimento de ganado. El filtrado (F) del proceso de ultrafiltración está conformado por sales y compuestos de bajo peso molecular (< 10 kDa). Éstos pueden ser utilizados como suplemento para medios de cultivo de otros procesos biotecnológicos.

La Etapa S utiliza SF_L y extracto enzimático Ez para la obtención de sacarificados. Tras la sacarificación se realiza una centrifugación (C) para separar los sólidos hidrolizados (SH) del medio líquido que contiene los licores sacarificados (LS) y la enzima residual (Ez,r). Estos dos últimos componentes se separan más adelante por

ultrafiltración (UF). La Ez,r es reutilizada en la misma Etapa S para reducir el consumo de extracto concentrado Ez de la Etapa Z. Los licores sacarificados LS se pueden utilizar en procesos de producción de bioetanol o como sustrato de otros procesos biotecnológicos, mientras que los SH podrían utilizarse como suplemento de sustrato para otros procesos biológicos.

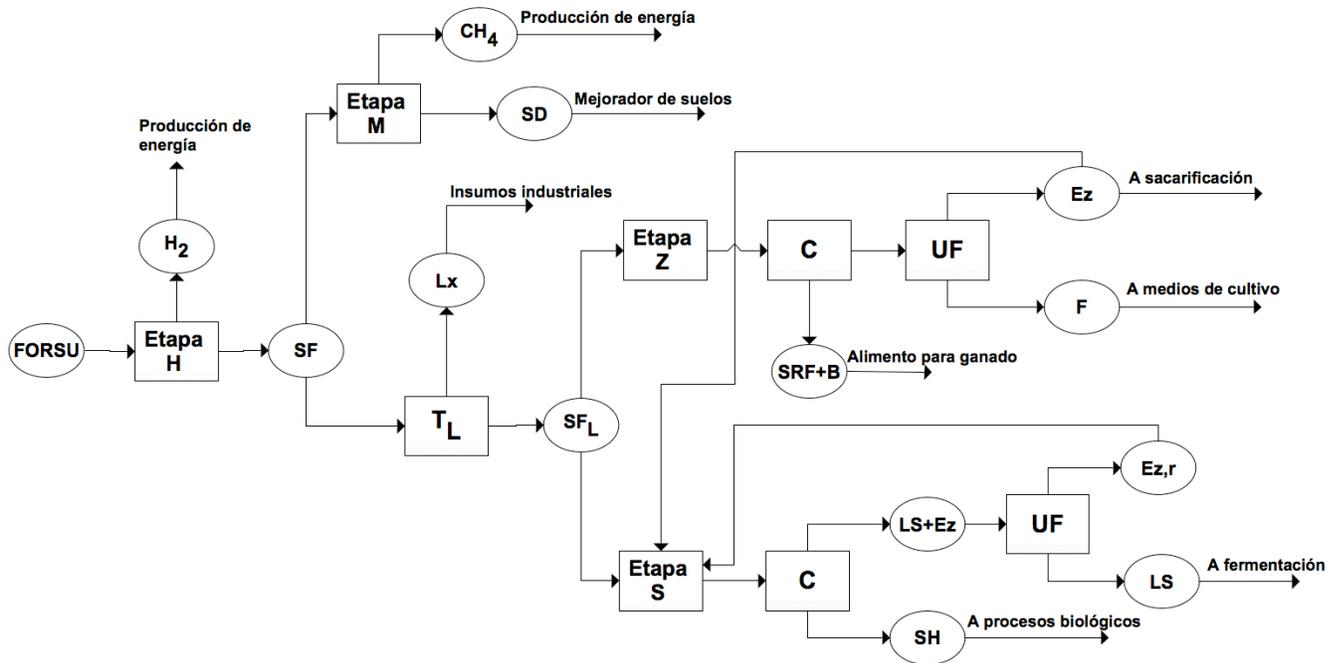


Fig. 36. Diagrama de bloques de operación serie-paralelo del modelo de biorrefinería H-M-Z-S. FORSU, fracción orgánica de residuos sólidos urbanos; SF, sólidos fermentados; SD sólidos digeridos; TL, tratamiento de lavado; Lx, lixiviados; SFL, sólidos fermentados lavados; C, centrifugación; UF, ultrafiltración; SRF, sólidos re-fermentados; B, biomasa; Ez, extracto enzimático concentrado; F, filtrados; LS, licores sacarificados; Ez,r, enzima residual; SH, sólidos hidrolizados.

La Fig. 37 muestra el diagrama de flujo de procesos del modelo de biorrefinería. Esta figura es una ampliación de la Fig. 36, ya que además de contener las principales operaciones unitarias, recursos y productos, también muestra otros procesos auxiliares (procesos de producción de energía a partir del H₂ y del CH₄), el destino de algunas corrientes de salida, y nuevas corrientes de entrada. Los insumos y los productos aparecen de acuerdo a lo descrito en la sección 6.7.3.3.

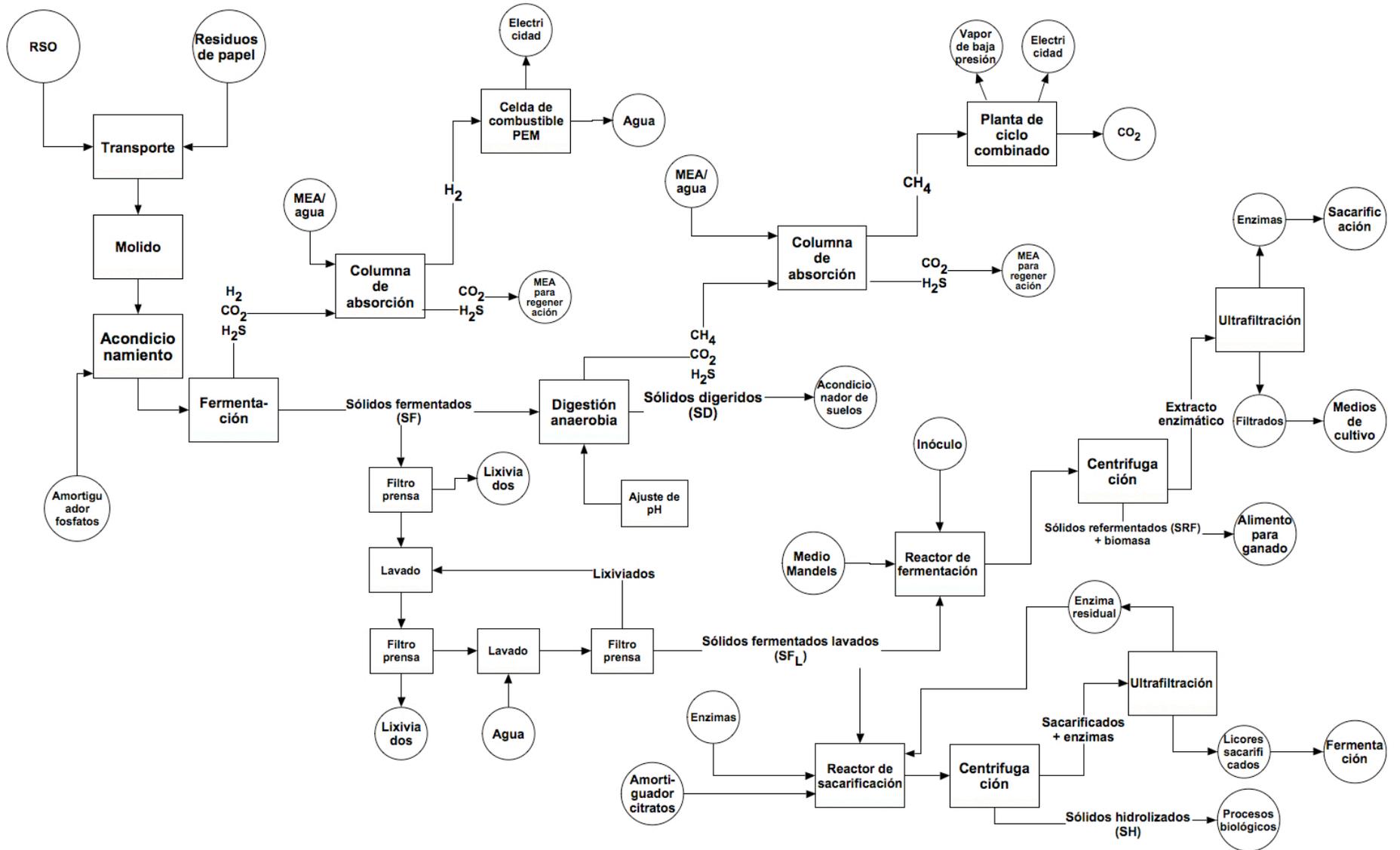


Fig. 37. Diagrama del flujo de procesos del modelo de biorrefinería H-M-Z-S.

El FORSU es constituido por los residuos sólidos orgánicos (RSO) y papel, que tienen que ser transportados hasta la biorrefinería. Estos son mezclados y molidos, para posteriormente ser acondicionados con la humedad y sales necesarios para su fermentación. El biogás generado, conformado por hidrógeno, CO₂ y H₂S principalmente, es purificado con una solución de monoetanolamina (MEA) para aumentar la concentración de H₂ removiendo el CO₂ y para evitar la corrosión por las trazas de H₂S presente. El H₂ purificado puede ser utilizado entonces para generar electricidad en una celda de combustible con membrana de intercambio protónico (PEM).

Los sólidos fermentados (SF) producidos por la fermentación de la FORSU son alimentados a la digestión anaerobia. El biogás producido compuesto por CH₄, CO₂ y trazas de H₂S es purificado por una absorción con solución de MEA. El CH₄ purificado puede ser entonces usado para producir electricidad y vapor de baja presión en una planta de ciclo combinado. Los sólidos digeridos generados pueden ser utilizados como acondicionadores de suelos.

Una porción de los SF que no se alimentaron a la digestión anaerobia, son procesados a través de un filtro prensa para extraer lixiviados, a continuación son lavados con lixiviados de recirculación y nuevamente prensados para extraer lixiviados más concentrados. Finalmente se lavan con agua y se prensan nuevamente, extrayendo lixiviados para recirculación y los sólidos fermentados lavados (SF_L).

Los SF_L se alimentan a un reactor de fermentación que se inocula con micelio de *T. reesei* MCG 80 para la obtención de un extracto enzimático que se tiene que separar por centrifugación de los sólidos re-fermentados (SRF) y de la biomasa, y posteriormente concentrarse por un proceso de ultrafiltración. Este extracto enzimático concentrado puede utilizarse para procesos de sacarificación.

Nuestro proceso de sacarificación utiliza una porción de los SF_L, extracto enzimático concentrado y extracto enzimático recirculado proveniente de la ultrafiltración del extracto sacarificado, previamente centrifugado para remover los sólidos hidrolizados. Los licores sacarificados filtrados del proceso de ultrafiltración, pueden utilizarse en otros procesos fermentativos para la producción, por ejemplo, de bioetanol.

De las librerías de SimaPro v7.1.8 se seleccionaron los procesos similares a los propuestos en la biorrefinería H-M-Z-S. Los flujos de las corrientes principales de

reactivos y productos se ajustaron con los datos del balance global de masa mientras que los flujos de corrientes secundarias o complementarios se ajustaron con los datos de las librerías.

La Tabla 65 contiene las principales tecnologías que se ocuparon en la evaluación de sistemas ES-Reprode. Los pasos uno y dos corresponden a la actividad de recolección de los residuos sólidos orgánicos (RSO) y el papel, y su acondicionamiento con sales de fosfato para proveer amortiguamiento del pH. En el paso 1 se consideró el consumo de CO₂ del aire para la constitución de los RSO y del papel. Se consideraron también cargas ambientales por transporte de los RSO y del papel en vehículo de 3.5 ton dentro de la biorrefinería.

La Etapa H incluye los pasos de producción de biogás a partir de FORSU acondicionada (paso 3), la purificación del hidrógeno (paso 4) y la generación de electricidad en celda de combustible PEM (paso 5). En el paso 3 se emitió CO₂ como producto de la fermentación. Tanto el calor como la electricidad requeridas en la Etapa 3 se consideraron abastecidas por la generación de las mismas en la biorrefinería.

En la Etapa M se consideró la producción de biogás a partir de SF (paso 6), la purificación del metano al 96 % (paso 7) y la conversión de éste en calor y electricidad en una planta de ciclo combinado (paso 8). En el paso 6 se generaron sólidos digeridos (SD) y CO₂ de origen biogénico por la digestión anaerobia.

La actividad de lavado de los SF para su posterior alimentación a las etapas Z y S se basó en una tecnología de trituración de piedras y su lavado con agua. Se consideró agua de lavado adicional para la constitución de los lixiviados. La electricidad fue abastecida por la biorrefinería, pero el calor se generó a partir de la quema de gas natural en caldera.

La Etapa Z consideró el consumo SF lavados, agua y calor para la producción del extracto enzimático concentrado. Se generaron también sólidos refermentados (SRF) y CO₂ de origen biogénico por la fermentación.

En la Etapa S se consideró el consumo de SF lavados, agua, enzimas concentradas y calor para la producción de sacarificados y sólidos hidrolizados (SH).

Tabla 65. Tecnologías incluidas en la evaluación de sistemas y sus principales flujos

Paso	Producción		DdC ^a (%)	Consumo		Tecnología (en inglés)	Observaciones de la tecnología
Recolección/acondicionamiento							
1	RSO 25 %ST + papel 99 %ST	1 kg	100	CO ₂ , en el aire	0.5663 kg	Biowaste at collection point	
				Transporte dentro de biorrefinería	0.0001 t*km	Transport van <3.5t	220 000 t*km/vehículo, Suiza/Europa
2	FORSU acondicionada 20 %ST	1 kg	100	RSO 25 %TS + papel 99 %TS	0.5610 kg	Biowaste at collection point	
				Agua de acondicionamiento	0.4392 kg	Tap water	Suiza.
				Fosfatos en roca	0.0362 kg ^b	Dry rock or dried wet rock processing	Promedio de mezcla de tecnologías, EUA.
Etapa H							
3	Biogás de FORSU acondicionada	1 m ³	20	FORSU acondicionada 20 %ST	57.1429 kg	Biogas from biowaste	Planta de digestión anaerobia de desechos orgánicos, 10 000t/año, 25 años, termofílica, digestión en una etapa, con post-composteo, Suiza.
	SF 16.2 %ST	55.7381 kg	80	CO ₂ , biogénico	1.3750 kg		
	CO ₂ , biogénico	1.3750 kg	-	Calor (sustituido)	9.6674 MJ	Biogas burned in cogen	Eficiencia electr. 0.32, Eficiencia calorífica 0.55, Suiza.
				Electricidad (sustituida)	0.3737 kWh	Electricity, low voltage	Voltaje medio a bajo, Suiza e importaciones.
4	Hidrógeno al 99% de biogás	1 m ³	100	Biogás de FORSU acondicionada	3.3333 m ³	Methane 96% purification	Instalaciones para producción de químicos. Composición de una planta química basada en una unidad de destilación, Suiza.
				Electricidad (sustituida)	1.1100 kWh ^c	Electricity, medium voltage	Voltaje alto a medio, Suiza e importaciones.
5	Electricidad de H ₂ al 99% en celda PEM	1 kWh	100	Hidrógeno al 99% de biogás	0.3564 m ³	Electricity, biogas, alloc. exergy, PEM future	Celda de combustible PEM, 2 kW salida eléctrica, 15 años o 80 000 h de operación. Eficiencia eléctrica 32 %, eficiencia total 87%, Europa central.

Paso	Producción		DdC ^a (%)	Consumo		Nombre de tecnología	Observaciones de la tecnología
Etapa M							
6	Biogás de SF 16.2 %ST	1 m ³	90	SF 16.2 %ST	10.5519 kg	Biogas from biowaste	Planta de digestión anaerobia de desechos orgánicos, 10 000t/año, 25 años, termofílica, digestión en una etapa, con post-composteo, Suiza.
	SD 11.2 %ST	8.8726 kg	10	CO ₂ , biogénico	0.6875 kg		
	CO ₂ , biogénico	0.6875 kg	-	Calor (sustituido)	0.3982 MJ	Natural gas burned in boiler	Modulación condensada >100kW, Suiza a Europa.
				Electricidad (sustituida)	0.0905 kWh	Electricity, low voltage	Voltaje medio a bajo, Suiza e importaciones.
7	Metano al 96% de biogás de SF	1 m ³	100	Biogás de SF 16.2 %ST	1.5385 m3	Methane 96% purification	Instalaciones para producción de químicos. Composición de una planta química basada en una unidad de destilación, Suiza.
				Electricidad (sustituida)	0.5000 kWh ^b	Electricity, medium voltage	Voltaje alto a medio, Suiza e importaciones.
8	Energía del metano al 96%	1 MJ	100	Metano al 96% de biogás de SF	0.0336 m3	Electricity cogen biogas	Planta de gas de ciclo combinado, 400 MWe: turbina de gas 265 MWe, turbina de vapor 140 MWe.
				CO ₂ , biogénico	0.0659 kg		
Lavado SF							
9	SF lavados 80 %ST	1 kg	90	SF 16.2 %ST	5.4812 kg	Limestone crushed, washed.	Maquina industrial, pesada. Trituradora de rocas, 195 000 t/año, 25 año, Suiza.
	Lixiviados de SF	12.8180 kg	10	Agua de lavado	8.3368 kg	Tap water	Suiza.
				Calor	0.6978 MJ	Natural gas burned in boiler	Modulación condensada >100kW, Suiza a Europa.
				Electricidad (sustituida)	0.00072 kWh	Electricity, medium voltage	Voltaje alto a medio, Suiza e importaciones.

Paso	Producción		DdC ^a (%)	Consumo		Nombre de tecnología	Observaciones de la tecnología
Etapas Z							
10	Enzimas concentradas 10 veces	1 kg	80	SF lavados 80 %ST	0.2080 kg	Proteins from grass/Syrup from sugar beet molasses	Planta de fermentación para etanol, 90 000 t etanol/año, 20 años, EUA, trigo como recurso.
	Filtrados de SRF	9 kg	15	Agua para fermentación	8.9737 kg	Tap water	Suiza.
	SRF 90 %ST	0.2019 kg	5	Agua para inóculo	1.0202 kg	Tap water	Suiza.
	CO ₂ , biogénico	0.0567 kg	-	Calor	0.2183 MJ ^d	Natural gas burned in boiler	Modulación condensada >100kW, Suiza a Europa.
				Electricidad (sustituída)	0.2000 kWh ^b	Electricity, medium voltage	Voltaje alto a medio, Suiza e importaciones.
Etapas S							
11	Sacarificados al 6.19%	1 kg	90	SF lavados 80 %ST	0.1355 kg	Proteins from grass/Syrup from sugar beet molasses	Planta de fermentación para etanol, 90 000 t etanol/año, 20 años, EUA, trigo como recurso.
	SH 90 %TS	0.0480 kg	10	Agua para sacarificación	0.8663 kg	Tap water	Suiza
				Enzimas concentradas 10 veces	0.0462 kg		
				Calor	0.0488 MJ ^d	Natural gas burned in boiler	Modulación condensada >100kW, Suiza a Europa.
				Electricidad (sustituída)	0.0800 kWh ^b	Electricity, medium voltage	Modulación condensada >100kW, Suiza a Europa.

Notas: ^a distribución de cargas contaminantes, ^b valor sujeto a verificación, ^c valor probablemente sobrestimado, ^d valor probablemente subestimado; RSO, residuos sólidos orgánicos; ST, sólidos totales; FORSU, fracción orgánica de residuos sólidos urbanos; SF sólidos fermentados; PEM, membrana de intercambio de protones; SD, sólidos digeridos; SRF, sólidos refermentados; SH, sólidos hidrolizados

7.6.1. Balance de masa

En la Tabla 66 se muestra el balance de masa considerando los elementos descritos en la Tabla 39 (sección 6.7.4). De acuerdo a la unidad funcional, la corriente de entrada del sustrato fue 1 ton_{bh} de FORSU. Como los SF fueron el sustrato de las etapas M, Z y S, su distribución fue discrecional. Se repartieron 40 % a la Etapa M, 40 % a la Etapa Z, y 20 % a la Etapa S.

Tabla 66. Balance de masa del modelo de biorrefinería

Etapa	Corriente de entrara	Ton _{bh}	Corriente de salida	Ton _{bh}
H	RSO	0.480	SF	0.975
	Papel	0.081	Pérdidas por evaporación	0.0001
	Agua	0.439	H ₂	0.0005
	Solución MEA	1.660	CO ₂	0.024
			Solución MEA	1.660
	Total	2.660	Total	2.660
M	SF	0.390	SD	0.328
	Solución MEA	1.753	Pérdidas por evaporación	0.020
			CH ₄	0.017
			CO ₂	0.025
			Solución MEA	1.753
	Total	2.143	Total	2.143
Z	SF	0.390	Lixiviados	0.912
	Agua de lavado	0.593	SRF	0.050
	Inóculo	0.349	Concentrado enzimático	0.342
	Medio Mandels	3.071	Filtrado	3.080
			CO ₂	0.006
	Total	4.404	Total	4.404
S	SF	0.195	Lixiviados	0.456
	Agua de lavado	0.297	SH	0.013
	Enzima fresca	0.012	Enzima reciclada	0.029
	Enzima reciclada	0.029	LS	0.263
	Amortiguador citratos	0.228		
	Total	0.761	Total	0.761

Notas: LS, licores sacarificados; MEA, monoetanolamina; RSO, residuos sólidos orgánicos; SF, sólidos fermentados; SRF, sólidos re-fermentados; SH, sólidos hidrolizados.

El balance de masa contempla algunas sustancias auxiliares en la operación de la biorrefinería. Tal es el caso de la solución de monoetanolamina (MEA) que se utilizó para purificar el hidrógeno y metano del biogás en las etapas H y M. La producción de los

lixiviados extraídos de los SF en el tratamiento de lavado, se distribuyó en las corrientes de salida de las etapas Z y S proporcionalmente a la cantidad de SF que se consumieron en cada etapa. Se muestran las cantidades de CO₂ biogénico producido por las fermentaciones y digestión de las etapas H, M y Z.

7.6.2. Balance de energía

En la Tabla 67 se muestra el balance de energía en términos de producción y consumo de calor y electricidad. El balance de energía se realizó a partir de cálculos, aproximaciones y estimaciones haciendo uso de los datos de diferentes procesos disponibles en las librerías de SimaPro v7.1.8 (Tabla 65).

Tabla 67. Balance de energía del modelo de biorrefinería

Etapa	Producción		Consumo		Neto	
	Calor (MJ)	Electricidad (kWh)	Calor (MJ)	Electricidad (kWh)	Calor (MJ)	Electricidad (kWh)
H	0	14.73	169.18	12.37	-169.18	2.36
M	190.97	145.88	14.72	15.36	176.25	130.52
Z	-	-	124.36	68.49	-124.36	-68.49
S	-	-	37.65	21.04	-37.65	-21.04
Total	190.97	160.61	345.92	117.26	-154.95	43.35

En la Etapa H la producción de energía eléctrica se realizó usando celdas de combustible de membrana de intercambio protónico (PEM) con una eficiencia coulombimétrica del 80 %. La electricidad desarrollada por esta tecnología fue suficiente para contrarrestar los consumos eléctricos de esta etapa (operación de digestores, purificación del hidrógeno). El consumo de energía calórica fue el mayor de todas las etapas. Esto se debió a que la Etapa H presentó un flujo de entrada de 1 ton de FORSU que tuvo que ser calentado desde 20 hasta 55 °C.

La Etapa M presentó autosuficiencia energética (eléctrica y calórica) al quemar metano al 96 % de pureza en una planta de ciclo combinado con eficiencias eléctrica y calórica de 55 y 20 % respectivamente. El consumo calórico se debió principalmente a pérdidas de calor en el digestor y por la recuperación de la temperatura en la transferencia de 0.39 ton de SF de la Etapa H a la M (Tabla 66).

La electricidad producida en la planta de ciclo combinado fue suficiente para abastecer el consumo de las etapas M, Z y S, pero no así el calor, que se utilizó únicamente para la operación de las etapas H y M.

El calor necesario en las Etapas Z y S fue suplido por medio gas natural quemado en caldera.

Se observó que la Etapa Z presentó altos consumos calóricos, principalmente por el tratamiento de lavado con agua a 60 °C que se realizó a la alimentación de 0.39 ton de SF (Tabla 66).

En la Etapa S, al usar un relativamente alto contenido de sólidos volátiles en el reactor (8 %SV), se disminuyeron los requerimientos de agua de dilución y con esto también los requerimientos energéticos para calentarla a los 50 °C de temperatura de sacarificación.

En general, se tuvo un superávit eléctrico del 37 % de la electricidad requerida para la operación de la biorrefinería (Tabla 67). El déficit calórico fue del 45 % del requerido para la operación de la misma, el cuál tuvo que ser suplido con un combustible fósil, i.e. gas natural. Cherubini & Ulgiati (2010) analizaron una biorrefinería de rastrojo de maíz para la obtención de metano, bioetanol, electricidad, calor y fenoles; reportando que la biorrefinería requirió el 77 % de la electricidad y el 99 % del calor generado a través de cogeneración. Ocuparon un pretratamiento térmico para hidrolizar la biomasa, ocupando los azúcares C6 y C5 para la fermentación alcohólica, los aceites pirolíticos de la lignina para producir fenoles, y los residuos de lignina y de la fermentación para la producción de energía.

En términos de energía neta, sumando calor y electricidad, la biorrefinería tuvo un balance de cero; es decir, no hubo ganancia ni pérdida energética. La ventaja de haber obtenido sobreproducción eléctrica, es que este tipo de energía tiene mayor valor agregado que la energía calórica. Este postulado podría ser demostrado realizando un balance de exergía, o energía aprovechable en forma de trabajo, ya que la energía eléctrica tiene un mayor valor exergético que la energía calórica de temperatura menor a 100 °C (Goedkoop *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2009; Anexo 9.1.6.1).

7.6.3. Evaluación ambiental

Como primer paso para comparar la sustentabilidad ambiental de la biorrefinería se realizó un balance de CO₂ siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{CO}_{2,\text{neto}} = \sum \text{CO}_{2,\text{biogenico}} + \sum \text{CO}_{2,\text{fósil}} - \sum \text{CO}_{2,\text{biomasa}} \quad [31]$$

la cual considera el CO₂ producido en la biorrefinería H-M-Z-S por procesos biológicos (116.1 kg CO₂), el CO₂ de origen fósil por efectos de la quema de combustibles fósiles (8.01 kg CO₂) y el consumo de CO₂ de la atmósfera consecuencia de su integración a la biomasa vegetal (317.6 kg CO₂). El resultado del balance fue – 193.5 kg CO₂/ton FORSU; lo que indica que se tienen ahorros de CO₂ al utilizar la biomasa de la FORSU en la producción de biocombustibles y bioproductos. El CO₂ biogénico que no fue liberado en los procesos de biorrefinería, se asume que se encuentra aún fijado en los SD, SRF, SH, enzimas, lixiviados y LS que se produjeron en las etapas M, Z y S. El destino final de estos productos se planteó en la sección 6.7.3.3.3. (Fig. 36 y 37), pero su análisis de sistemas requiere mayor información sobre las tecnologías que los usarían para evaluar correctamente sus cargas ambientales.

A continuación se evaluaron seis categorías de impactos ambientales: agotamiento abiótico, acidificación, eutroficación, calentamiento global, agotamiento de capa de ozono y oxidación fotoquímica.

El proceso que tuvo la mayor aportación en los impactos ambientales fue la producción de energía en planta de ciclo combinado de la Etapa M, pues tuvo el mayor impacto en acidificación y en calentamiento global (Fig. 38a y 38c).

Los principales compuestos con impacto en la acidificación fueron el dióxido de azufre, ácido sulfhídrico, amoníaco y óxidos de nitrógeno por ser productos de la combustión del metano al 96 % de pureza o como subproductos de la digestión anaerobia. Justamente el proceso con mayor impacto (Fig. 38a) fue la producción de energía en la planta de ciclo combinado. Le siguieron la digestión de SF en la Etapa M y la fermentación de la FORSU en la Etapa H.

En eutroficación, los principales compuestos con mayor impacto fueron el amoníaco, óxidos de nitrógeno, fósforos y compuestos orgánicos. En esta categoría, la

producción y uso de los fosfatos aparece como el tercer proceso con mayor impacto (Fig. 38b). En cuarto lugar aparece la fermentación de la FORSU, ya que en este proceso se produjeron los SF que se ocuparon como sustrato en las demás etapas, y las cargas ambientales de su uso recayeron justamente en su proceso de producción (Tabla 65).

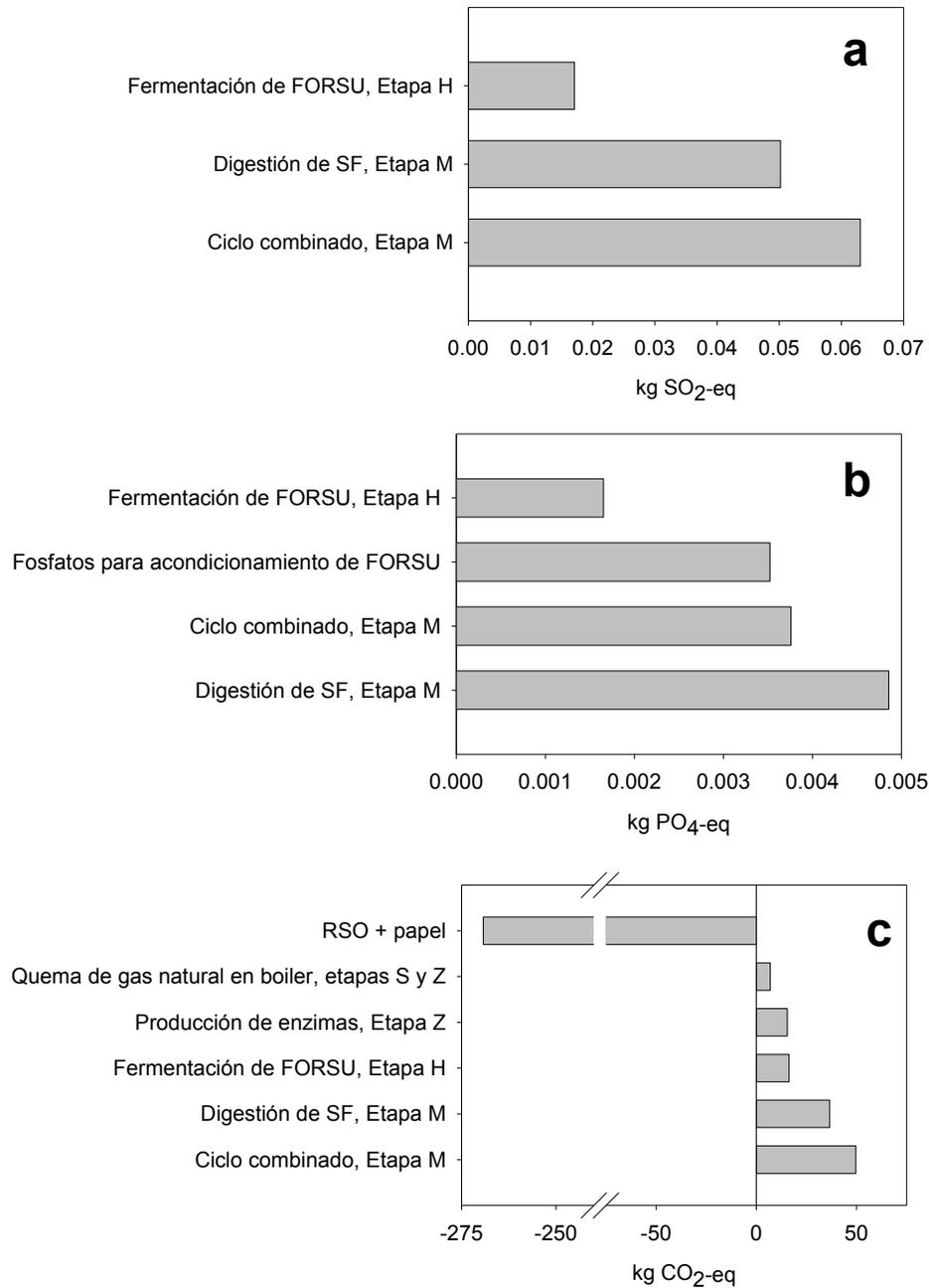


Fig. 38. Principales impactos de la biorrefinería en (a) acidificación (punto de corte 6 %), (b) eutrofización (punto de corte 5 %) y (c) calentamiento global (punto de corte 5 %).

En el calentamiento global, los principales impactos se debieron al dióxido de carbono biogénico, dióxido de carbono fósil, emisiones fugitivas de metano y monóxido de dinitrógeno. El principal proceso contribuyente a este impacto fue la producción de energía en la Etapa M, siguiéndole la digestión de SF y la fermentación de FORSU (Fig. 38c). Las etapas S y Z tuvieron impactos ligeramente menores que las demás etapas principalmente debidos a la quema de gas natural para abastecer su calentamiento. La FORSU, constituida por RSO y papel, proveyó los impactos negativos en forma de CO₂ fijado de la atmósfera.

En la Tabla 68 se muestran los impactos ambientales más significativos para la biorrefinería en base 1 ton de FORSU como unidad funcional, y para la disposición directa de la misma cantidad de FORSU en relleno sanitario como proceso comparativo.

Tabla 68. Impactos totales de la biorrefinería.

Categoría de impacto	Biorrefinería	Relleno sanitario
Agotamiento abiótico (kg Sb-eq.)	0.140	0.082
Acidificación (kg SO ₂ -eq.)	0.202	0.160
Eutroficación (kg PO ₄ -eq.)	0.019	1.43
Calentamiento global 100a (kg CO ₂ -eq.)	-128	50.7
Agotamiento de la capa de ozono 40a (kg CFC ₁₁ -eq.)	2.96 E-06	1.70 E-06
Oxidación fotoquímica (kg C ₂ H ₄ -eq.)	0.009	0.075

La biorrefinería presentó mayores impactos en el agotamiento abiótico, acidificación y agotamiento de la capa de ozono que el relleno sanitario. El agotamiento abiótico fue mayor en la biorrefinería por el uso de gas natural en los procesos de calentamiento de las etapas Z y S, mientras que la acidificación y la eutroficación se vieron influenciadas por los procesos de producción de energía en la planta de ciclo combinado y de digestión anaerobia de la Etapa M (Fig. 38).

En las categorías de eutroficación y calentamiento global, la disposición en relleno sanitario tuvo mayores impactos que la biorrefinería. Esto se pudo deber a que la tecnología de relleno sanitario consideró las emisiones de filtraciones de lixiviados, emisiones a la atmósfera por la incineración del biogás y emisiones fugitivas de gases de efecto invernadero. En el caso de la eutroficación, los compuestos orgánicos como el

amoníaco, nitratos y óxidos de nitrógeno (reportados en base DQO), fueron los principales contribuyentes a este impacto por la vía aire y agua, mientras que el fósforo fue el principal contribuyente a la eutroficación vía suelo.

En la categoría de calentamiento global la biorrefinería demostró un impacto negativo (ahorro de cargas ambientales), mientras que el relleno sanitario tuvo un impacto positivo (daño al ambiente). Este impacto positivo en el relleno sanitario se debió a las considerables emisiones fugitivas de metano biogénico que no pueden ser adecuadamente retenidas para ser quemadas y reducir su impacto ambiental en forma de CO₂.

Con el objetivo de hacer una comparación más sencilla entre la biorrefinería y el relleno sanitario, los impactos se normalizaron al multiplicarse por sus respectivos factores de referencia, de acuerdo al método CML 2001 (V2.04 / World, 1995; Anexo Tabla A17). El resultado nos da un valor normalizado adimensional que puede sumarse entre todos los valores de los impactos evaluados, y así comparar el "impacto" total de una tecnología con respecto a otra. La suma de los impactos normalizados en la biorrefinería fue negativa -1.32×10^{-12} , mientras que la del relleno sanitario fue 1.38×10^{-11} (Fig. 39). Esto señala que esta tecnología es más favorables para el ambiente que el relleno sanitario. La categoría de calentamiento global fue la causante del ahorro de impactos normalizados en la biorrefinería, mientras que la principal categoría con impactos en el relleno sanitario fue la eutroficación seguida del calentamiento global.

En el análisis de ciclo de vida de tres opciones de manejo de bagazo con recuperación de energía usando el método EDIP/UMIP 97, Kiatkittpong *et al.* (2009) determinaron que la digestión anaerobia superaba al relleno sanitario y a la incineración en todos los aspectos ambientales. En el caso de los rellenos sanitarios, su beneficio ambiental depende significativamente de la eficiencia de recolección del biogás y de los lixiviados (Manfredi & Christensen, 2009). Una baja recolección de biogás permite mayores emisiones de metano, el cual tiene un potencial de calentamiento global al menos 25 veces superior al del CO₂. Si bien con la incineración Kiatkittpong *et al.* (2009) obtuvieron mejor desempeño ambiental que con el relleno sanitario con baja eficiencia de recolección de biogás, éstos no mejoraron el desempeño ambiental de la digestión anaerobia principalmente debido a los mayores impactos en oxidación fotoquímica por

parte de la incineración. Una forma de hacer ambientalmente favorables a los rellenos sanitarios es dotándolos de tecnologías adicionales, como la recirculación intensiva de lixiviados o la aireación convectiva después de la extracción exhaustiva de metano tras los primeros 10 años de operación (Manfredi & Christensen, 2009).

Por lo general, se considera que la digestión anaerobia es una mejor opción comparada con el compostaje y la incineración, principalmente por las mayores cantidades de generación de electricidad y los créditos ambientales por emisiones evitadas debido a la sustitución de los combustibles fósiles como energéticos (Hanandeh & El-Zein, 2010). Para poder considerar a la digestión anaerobia además como un sumidero de carbono, los biosólidos producidos deben aplicarse a suelos con material húmico microbiológicamente estable (Peters & Rowley, 2009).

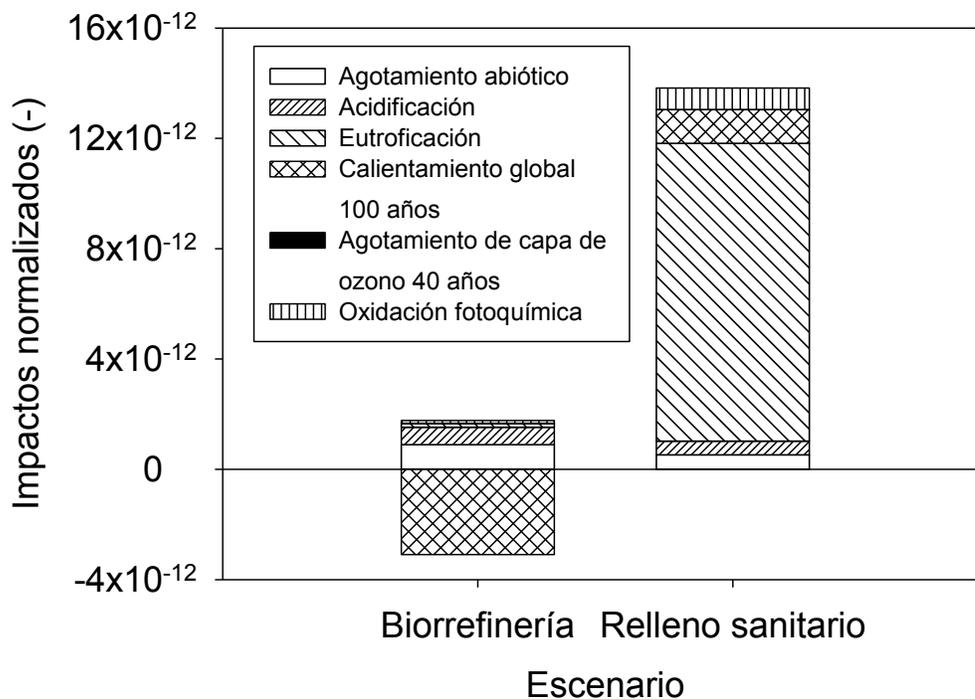


Fig. 39. Impactos normalizados para los escenarios de biorrefinería y relleno sanitario.

Los procesos biológicos de tratamiento de residuos orgánicos pueden tener considerables impactos ambientales de eutroficación o acidificación, sin embargo las principales ventajas se observan en la recuperación de energía en términos de emisiones de calentamiento global evitadas al sustituir la generación de energía mediante

combustibles fósiles (Boldrin *et al.*, 2011). En el caso de la biorrefinería H-M-Z-S, además de darle tratamiento a la FORSU, se tuvo superávit de energía eléctrica y se generaron bioproductos (enzimas y sacarificados). Justamente, se ha señalado que la obtención de bioproductos proveería de beneficios económicos a la biorrefinería (Fahd *et al.*, 2012). Además la biorrefinería tiene la ventaja adicional de ser ambientalmente favorable en comparación con la tecnología de relleno sanitario.

8. CONCLUSIÓN

8.1. Actividad 1a. Producción de hidrógeno por fermentación en sustrato sólido en régimen semi-continuo

- La temperatura y el TRM, tuvieron un efecto significativo sobre la productividad de hidrógeno. La productividad de hidrógeno se vio beneficiada por el TRM más alto (21 d TRM) y por el régimen termofílico (55 °C). A estas condiciones la mayor productividad promedio fue 202 NmL H₂/kg_r/d.
- El proceso mesofílico, aunque tuvo menor producción de hidrógeno que el termofílico, pudo ser operado en forma pseudoestable durante mayor tiempo.
- El principal metabolito producido fue el ácido láctico (> 2 924 mg DQO/kg_{bh}).

8.2. Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno

- El régimen termofílico sin adición de lodos ni sales presentó las mejores producciones de hidrógeno en el sistema FASSH-VI ($P_{H_2} = 1\ 983\ \mu\text{mol H}_2/\text{g SV}$, $R_{H_2} = 68.3\ \mu\text{mol H}_2/\text{g SV/h}$).
- Usando pretratamiento de choque térmico como método de selección de microorganismos hidrogenogénicos se obtuvieron fases de latencia inapreciables (< 14 h).
- La adición de lodos activados sin choque térmico tuvo un efecto negativo de inhibición en la producción de hidrógeno en ambos regímenes térmicos. En régimen mesofílico, la adición de lodos activados presumiblemente permitió el consumo de hidrógeno a partir de las 72 h de operación. Con choque térmico se detuvo este consumo pero no hubo repunte en la producción de hidrógeno.
- Con lodos pretratados térmicamente no se observó inhibición de la producción de hidrógeno en ninguno de los regímenes térmicos. Sin embargo, tampoco se observó un efecto significativo sobre la producción de hidrógeno en comparación con los reactores sin adición de lodos.
- La adición de sales tuvo un efecto negativo para la producción de hidrógeno en ambos regímenes térmicos.

8.3. Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados

- El régimen termofílico (55 °C) influyó positivamente en la productividad de metano, en el rendimiento de metano y en la producción de biogás.
- Los sólidos fermentados SF con el mayor contenido de ácidos orgánicos fueron los provenientes de la Etapa H con el menor TRM de 14 d. Éstos tuvieron un efecto positivo en la productividad de metano y en la producción de biogás.
- La mejor productividad promedio fue 2 023 NmL CH₄/kg_r/d obtenida en régimen termofílico con alimentación de SF provenientes de la hidrogenogénesis a 14 d TRM.
- La alimentación con SF influyó positivamente en la obtención de mayores productividades de la Etapa M con respecto a los controles alimentados con FORSU.
- En el proceso control, el aumento del TRM de 28 a 49 d dio menores productividades de metano pero una mayor eficiencia de remoción de SV. En el caso del régimen termofílico se lograron mayores rendimientos de metano y mejores eficiencias de remoción conforme aumentó el TRM. Esto corrobora una mayor eficiencia metanogénica en régimen termofílico en comparación con el mesofílico.
- El acoplamiento de las etapas de producción de hidrógeno y de producción de metano demostró ser provechosa pues permitió un mayor potencial energético comparado contra un proceso metanogénico de una sola etapa alimentado con FORSU. Además, una fracción importante del \hat{E}_P y E_F del sistema acoplado se obtuvo como combustible limpio (biohidrógeno).

8.4. Actividad 3. Producción enzimática con *T. reesei* MCG 80

- La fermentación en cultivo sumergido mostró mayores actividades enzimáticas que la fermentación en sustrato sólido.
- En fermentación en sustrato sólido (20 %ST), las máximas actividades enzimáticas fueron FPx = 0.25 FPU/mL y CMCx = 0.38 UI/mL.
- Los SF presentaron mayor inducción enzimática que la FORSU y que los SD.

- El control de 1 %SV de papel filtro suplementado con lactosa dio actividades de hasta $FP_x = 2.9$ FPU/mL y $CMC_x = 1.8$ UI/mL.
- En los ensayos en fermentadores, el cambio de régimen de lote a lote alimentado incrementó en 28 – 40 % la FP_x . Las máximas actividades enzimáticas alcanzadas fueron $FP_x = 2.06$ FPU/mL y $CMC_x = 1.23$ UI/mL.

8.6. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80

- El extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80 obtenido en la Actividad 3 fue efectivo en la sacarificación de SF y FORSU. En general, mejoró las sacarificaciones en un 13 – 16 % comparado con el extracto comercial Celluclast.
- Se alcanzaron eficiencias de sacarificación (η_s) cercanas al 50 %_{bSV} para el FORSU, y de hasta 65 %_{bSV} para los SF.
- La sacarificación fue directamente proporcional al incremento de la relación enzima:sustrato o carga enzimática; mientras que el rendimiento de sacarificación fue inversamente proporcional al incremento de la relación enzima:sustrato.
- El máximo rendimiento de sacarificación se observó a 40 FPU/g SV (11.06 mg azúcares/FPU).
- Tras las 72 h de sacarificación, se observaron actividades enzimáticas remanentes del 70 – 86 % de la actividad enzimática al tiempo cero. Esto abre la posibilidad de recuperar y reciclar el extracto enzimático.

8.7. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos

- De los resultados obtenidos experimentalmente en las etapas H, M, Z y S, se estableció que la mejor configuración del modelo de biorrefinería correspondía a un proceso serie-paralelo, donde con FORSU se producían H_2 y SF, y a partir de este último los demás productos (metano, enzimas, sacarificados).
- Las tecnologías de producción de energía seleccionados fueron la celda de combustible de hidrógeno en la Etapa H, y la planta de ciclo combinado en la Etapa M.

- Tomando como unidad funcional 1 ton de FORSU al 20 % ST como alimentación de la biorrefinería, se tuvo un superávit eléctrico del 37 % de la electricidad requerida para la operación de la biorrefinería.
- Hubo déficit de energía calórica del 45 % de la requerida para la operación de la biorrefinería, que fue suplido con quema de gas natural.
- El balance de energía neto considerando la electricidad y calor producidos menos los consumidos fue de cero.
- La biorrefinería presentó impactos negativos (ahorros) en el calentamiento global debido a la fijación de CO₂ atmosférico en la biomasa.
- Por medio de una evaluación de ciclo de vida se compararon las cargas ambientales de la biorrefinería contra las de un relleno sanitario hipotético. Se determinó que el relleno sanitario presentó los mayores impactos, principalmente por efecto del calentamiento global debido a emisiones fugitivas de metano y en la eutroficación del ambiente por los lixiviados.
- La biorrefinería representa una alternativa eléctrica, económica y ambientalmente favorable en comparación con la disposición de FORSU en relleno sanitario.

9. PERSPECTIVAS

1. Considerar a la fermentación hidrogenogénica en sustrato sólido en lote como una posiblemente mejor alternativa a la fermentación semi-continua, en función al mayor flujo energético obtenido en dicho sistema.
2. Realizar el escalado a semi-piloto del sistema H-M para tratar al menos 1 kg_{bh} de FORSU al día.
3. Probar a los sólidos digeridos como mejorador de suelos.
4. Examinar las comunidades microbianas del sistema H-M más afondo durante la operación variable de los biorreactores.
5. Evaluar el potencial de reuso de los sólidos refermentados, de los sólidos hidrolizados y de los filtrados de la Etapa Z en alguna de las etapas de la biorrefinería H-M-Z-S, o incluso en nuevos procesos.
6. Utilizar el extracto enzimático de *T. reesei* para hidrolizar otros sustratos.
7. Ensayar los licores sacarificados como sustrato de otros microorganismos.
8. Profundizar la Evaluación de sistemas: recursos, energía, productos, desechos; con el objetivo de utilizar en lo posible información de las tecnologías regionales.

10. REFERENCIAS

- Acharya, B.K., Mohana, S., Jog, R., Divecha, J. & Madamwar, D. (2010). Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. *J Environ Management*, **91**, 2019-2027.
- Adney, W., Rivard, C., Shiang, M. & Himmel, M.E. (1991). Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes. *Appl Biochem Biotechnol*, **30**, 165-183.
- Ahring, B.K. (1995). Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek*, **67**, 91-102.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A. & Dominguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol*, **22**, 477-485.
- AOAC (1984) Official methods of analysis. 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington, D.C. U.S.A.
- APHA-AWWA-WPCF (1985) Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed. American public health association, Washington, U.S.A.
- Badhan, A.K., Chadha, B.S., Kaur, J., Saini, H.S. & Bhat, M.K. (2007). Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour Technol*, **98**, 504-510.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P. & Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Biomass*, **39**, 1843-1848.
- Ballesteros, M., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Martínez, J.M., Castañeda, R. & Dominguez, J.M.O. (2010). Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste. *Appl Biochem Biotechnol*, **161**, 423-431.
- Battan, B., Sharma, J. & Kuhad, R.C. (2006). High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, **22**, 1281-1287.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**, 326-338.
- Bertin, L., Lampis, S., Todaro, D., Scoma, A., Vallini, G., Marchetti, L., Majone, M. & Fava, F. (2010). Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. *Water Res*, **44**.
- Biely, P., Mislovicová, D. & Rudolf, T. (1988). Remazon brilliant blue-xylan: a soluble chromogenic substrate for xylanases. *Methods enzymol*, **160**, 536-541.
- Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C., Gomes, E. & Silva, R.D. (2002). Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochem*, **38**, 727-731.
- Boldrin, A., Neidel, T.L., Damgaard, A., Bhandar, G.S., Moller, J. & Christensen, T.H. (2011). Modelling of environmental impacts from biological treatment of organic municipal waste in EASEWASTE. *Waste Manage*, **31**, 619-630.
- Brown, A. (1976). Microbial water stress. *Bacteriol Rev*, **40**, 803-846.
- Cammack, R. (1999). Hydrogenase sophistication. *Nature*, **397**, 214-215.
- Cannel, E. & Moo-Young, M. (1980). Solid-State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*.
- Cardinali-Rezende, J., Colturato, L.F.D.B., Colturato, T.D.B., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A. & Sanz, J.L. (2012). Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Biores Technol*, **119**, 373-383.
- Cavinato, C., Bolzonella, D., Fatone, F., Giuliano, A. & Pavan, P. (2011). Two-phase thermophilic anaerobic digestion process for biohythane production treating biowaste: preliminary results. *Wat Sci Technol*, **64**, 715-721.
- Cervantes-Gonzalez, E., Rojas-Avelizapa, N.G., Cruz-Camarillo, R. & García-Mena, J. (2008). Oil removal enhancement in media with keratinous or chitinous wastes by hydrocarbon degrading bacteria isolated from oil polluted soils more options. *Environ Technol*, **29**, 171-182.
- Chahal, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl Environ Microbiol*, **49**, 205-210.

- Chandel, A.K., Chandrasekhar, G., Borges-Silva, M. & da Silva, S.S. (2012). The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol*, **32**, 187-202.
- Chang, J., Chen, W., Shih, S., Yu, S., Lay, J., Wen, F. & Huang, C. (2006). Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Microbiol Biotechnol*, **70**, 598-604.
- Chen, S. & Wayman, M. (1991). Cellulase production induced by carbon sources derived from waste paper. *Process Biochem*, **26**, 93-100.
- Cherubini, F., Bird, N.D., Cowie, A., Jungmeier, G., Schlamadinger, B. & Woess-Gallasch, S. (2009). Energy- and greenhouse gas-based LCA of biofuel and bioenergy systems: Key issues, ranges and recommendations. *Resources, Conservation And Recycling*, **53**, 434-447.
- Cherubini, F. & Ulgiati, S. (2010). Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study. *Appl Energy*, **87**, 47-57.
- Chet, I., Elad, Y. & Zimand, G. (1993) Isolate of *Trichoderma harzianum* I-952 fungicidal compositions containing said isolate and use against *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*, U.S. Pat. No. 5,238,690.
- Chou, C.-J., Jenney Jr., F.E., Adams, M.W.W. & Kelly, R.M. (2008). Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: Implications for biofuels. *Metab Eng*, **10**, 394-404.
- Chu, C.-F., Ebie, Y., Xu, K.-Q., Li, Y.-Y. & Inamori, Y. (2010). Characterization of microbial community in the two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *Int J Hydrogen Energy*, **35**, 8253-8261.
- Chu, C.F., Li, Y.Y., Xu, K.Q., Ebie, Y., Inamori, Y. & Kong, H.N. (2008). A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *Int J Hydrogen Energy*, **33**, 4739-4746.
- Cicerone, R.J. & Oremland, R.S. (1988). Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob Biogeochem Cycles*, **2**, 299–327.
- Clanet, M., Durand, H. & Tiraby, G. (1988). Enzymatic saccharification of municipal wastes. *Biotechnol Bioeng*, **32**, 930-934.
- Coughlan, M.P. (1992). Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Biores Technol*, **39**, 107-115.
- Cuetos, M.J., Gomez, X., Escapa, A. & Moran, A. (2007). Evaluation and simultaneous optimization of biohydrogen production using 3(2) factorial design and the desirability function *J Power sources*, **169**, 131-139.
- Damgaard, A. (2010) Implementation of life cycle assessment models in solid waste management. Department of Environmental Engineering, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.
- De Baere, L. (2000). Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art. *Water Sci Technol*, **41**, 283-290.
- de Beer, D., Huisman, J.W., Van den Heuvel, J.C. & Ottengraf, S.P.P. (1992). The effect of pH profiles in methanogenic aggregates on the kinetics of acetate conversion. *Water Res*, **26**, 1329-1336.
- Dekker, K.C.B. & Richards, G.N. (1976). Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, **21**, 278-352.
- Demirbas, A. (2004). Combustion characteristics of different biomass fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, **30**, 219-230.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, **49**, 2106-2116.
- Demirel, B. & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, **7**, 173-190.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. & Massana, R. (2001). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of Marine Picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2942-2951.
- Domingues, F., Queiroz, J., Cabral, J. & Fonseca, L. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol*, **26**, 394-401.
- Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R.M. & Steinmüller, H. (1987). The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **26**, 485-494.

- Dosoretz, C.G., Chen, H.-C. & Grethlein, H.E. (1990). Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, **56**, 395-400.
- Duangmanee, T., Padmasiri, S.I., Simmons, J.J., Raskin, L. & Sung, S. (2007). Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. *Water Env Res*, **79**, 975-983.
- Duff, S.J.B. & Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol*, **55**, 1-33.
- Effland, M.J. (1977). Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *TAPPI*, **60**, 143-144.
- Escamilla-Alvarado, C. (2009) Proceso integrado para producción de energía y enzimas a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F.
- Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H. & Ponce-Noyola, M.T. (2008). Xylanases and cellulases production from the spent solids of a two-stage anaerobic digestion. *The First International Congress on Biotechnology and Bioengineering*. Mexico City, Mexico.
- Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H.M. & Ponce-Noyola, M.T. (2013). Use of organic waste for the production of added-value holocellulases with *Cellulomonas flavigena* PR-22 and *Trichoderma reesei* MCG 80. *Waste Manage Res*, **31**, 849-858.
- Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E. & Poggi-Varaldo, H.M. (2013). A multivariable evaluation of biohydrogen production by solid substrate fermentation of organic municipal wastes in semi-continuous and batch operation. *Int J Hydrogen Energy*, **38**, 12527-12538.
- Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Rinderknecht-Seijas, N.F. & Poggi-Varaldo, H.M. (2014). Energy analysis of in-series biohydrogen and methane production from organic wastes. *Int J Hydrogen Energy*. **In press**.
- Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T. & Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic-methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *Process Biochem*, **47**, 1572-1587.
- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A. & Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Biores Technol*, **36**, 51-65.
- ETC (2010) Los nuevos amos de la biomasa: biología sintética y el próximo asalto a la biodiversidad, ETC Group.
- Eveleigh, D.E., Mandels, M., Andreotti, R. & Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol Biofuels*, **2**.
- Fahd, S., Fiorentino, G., Mellino, S. & Ulgiati, S. (2012). Cropping bioenergy and biomaterials in marginal land: The added value of the biorefinery concept. *Energy*, 79-93.
- Fang, H.H.P., Zhang, T. & Liu, H. (2002). Microbial diversity of mesophilic hydrogen producing sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 112-118.
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H. & Sawayama, S. (2008). Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *J Biosci Bioeng*, **106**, 115-120.
- Fannin, K. (1987) Start-up, operation, stability and control. In Chynoweth, D.P. and Isaacson, R. (eds). *Anaerobic digestion of biomass*. Elsevier Applied Science. London. pp. 171-196.
- Fatehi, P. (2013). Recent advancements in various steps of ethanol, butanol, and isobutanol productions from woody materials. *Biotechnol Prog*, **29**, 297-310.
- Fischer, S.G. & Lerman, L.S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in twodimensional gel electrophoresis. *Cell*, **16**, 191-200.
- Garibay-Orijel, C. (2006) Caracterización bioquímica y microbiológica de un reactor de lecho fluidizado que trata compuestos fenólicos clorados. Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV- IPN.
- Gessesse, A. & Mamo, G. (1999). High-Level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technol*, **25**, 68-72.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, **59**, 257-268.
- Ghose, T.K. & Bisaria, V.S. (1987). Measurement of hemicellulase activities part 1: xylanases. *Pure Appl Chem*, **59**, 1739-1752.
- Giraud, N. (1987) Les cellulases de *Trichoderma reesei* production et application. Université de Technologie de Compiègne.

- Goedkoop, M., Oele, M., Schryver, A.d. & Vieira, M. (2008) SimaPro Database Manual. Methods library. The Netherlands.
- Gomec, C.Y., Eroglu, V. & Wilderer, P.A. (2008). Identifying acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens in psychrophilic and mesophilic granular sludges treating synthetic sewage by means of fish and cslm. *Environmental Engineering*, **17**, 135-153.
- Gomez, X., Moran, A., Cuetos, M.J. & Sanchez, M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *J Power Sourc*, **157**, 727-732.
- Gorwa, M., Croux, C. & Soucaille, P. (1996). Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, **178**, 2668-2675.
- Grethlein, H.E. (1985). The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Nature Biotechnol*, **3**, 155-160.
- Hafner, S.D. (2006). Biological hydrogen production from nitrogen-deficient substrates. *Biotechnol Bioeng*, **97**, 435-437.
- Hallenbeck, P.C. (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci Technol*, **52**, 21-29.
- Hallenbeck, P.C. & Beneman, J.R. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*, **27**, 1185-1193.
- Han, S.K. & Shin, H.S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int J Hydrogen Energy*, **29**, 569 - 577.
- Hanandeh, A.E. & El-zein, A. (2010). The development and application of multi-criteria decision-making tool with consideration of uncertainty: The selection of a management strategy for the bio-degradable fraction in the municipal solid waste. *Bioresource Technology*, **101**, 555-561.
- Harman, G.E., Taylor, A.G. & Stasz, T.E. (1989). Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Dis*, **73**, 631-637.
- Hartmann, H. & Ahring, B.K. (2006). Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview. *Water Sci Technol*, **53**, 7-22.
- Hendriks, A.T.W.M. & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, **100**, 10-18.
- Hills, D.J. & Roberts, D.W. (1981). Anaerobic digestion of dairy manure and field crop residues. *Agric Wastes*, **3**, 179-189.
- Hogan, C.M. & Mes-Hartree, M. (1990). Recycle of cellulases and the use of lignocellulosic residue for enzyme production after hydrolysis of steam-pretreated aspenwood. *J Ind Microbiol*, **6**, 253-262.
- Holtzapple, M., Jun, J.-H., Ashok, G., Patibandla, S. & Dale, B. (1991). The ammonia freeze explosion (AFEX) process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **28-29**, 59-74.
- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J Biotechnol*, **2**, 602-619.
- Huang, C.-L., Chen, C.-C., Lin, C.-Y. & Liu, W.-T. (2009). Quantitative fluorescent *in-situ* hybridization: a hypothesized competition mode between two dominant bacteria groups in hydrogen-producing anaerobic sludge processes. *Water Sci Technol*, **59**, 1901-1909.
- INEGI (2009) Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Geografía. ISSN 0188-8692 Mexico.
- IPCC (2006) Guidelines for national greenhouse gas inventories, volume 4, Agriculture, forestry and other land use. The Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Islas, J., Manzini, F. & Masera, O. (2007). A prospectiv study of bioenergy in Mexico. *Energy*, **32**, 2306-2320.
- ISO (2006) ISO 1044. Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines. The International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO (2006) ISO 14040. Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework. The International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- James, A.G., Watson-Craik, I.A. & Senior, E. (1998). The effects of organic acids on the methanogenic degradation of the landfill leachate molecules butyrate and valerate. *Water Res*, **32**, 792-800.
- Jen, C.J., Chou, C., Hsu, P., Yu, S., Chen, W., Lay, J., Huang, C. & Wen, F. (2007). Flow-FISH analysis and isolation of clostridial strains in an anaerobic semi-solid bio-hydrogen producing system by hydrogenase gene target. *Appl Microbiol Biotechnol*, **74**, 1126-1134.

- Johnson, E.A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A. & Demain, A.L. (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, **43**, 1125-1132.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M. & Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem*, **40**, 3519-3525.
- Kalia, V.C. & Purohit, H.J. (2008). Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **35**, 403-419.
- Kamm, B. & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 137-145.
- Karadag, D. (2011). Anaerobic H₂ production at elevated temperature (60 °C) by enriched mixed consortia from mesophilic sources. *Int J Hydrogen Energy*, **36**, 458-465.
- Karadag, D., Mäkinen, A.E., Efimova, E. & Puhakka, J.A. (2009). Thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated-hot spring culture. *Bioresour Technol*, **100**, 5790-5795.
- Karlin, S., Theriot, J. & Mrázek, J. (2004). Comparative analysis of gene expression among low G + C gram-positive genomes. *Proc Natl Acad Sci*, **101**, 6182-6187.
- Kaur, U., Oberoi, H.S., Bhargav, V.K., Sharma-Shivappa, R. & Dhaliwal, S.S. (2012). Ethanol production from alkali- and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Industrial Crops and Products*, **37**, 219-226.
- Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. & Takasawa, S. (1986). Production of cellulases from alkali-treated bagasse in *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **24**, 454-458.
- Keshwani, D.R. & Cheng, J.J. (2009). Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Biores Technol*, **100**, 1515-1523.
- Kiatkittipong, W., Wongsuchoto, P. & Pavasant, P. (2009). Life cycle assessment of bagasse waste management options. *Waste management (New York, N.Y.)*, **29**, 1628-1633.
- Kim, S.W., Kang, S.W. & Lee, J.S. (1997). Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresour Technol*, **59**, 63-67.
- Kirk, O., Borchert, T.V. & Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 345-351.
- Kirkeby, J. (2005) Modelling of life cycle assessment of solid waste management systems and technologies. Environmental Department, DTU, Kgs. Lyngby, Denmark.
- Kleerebezem, R. & van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion In Biotechnology*, **18**, 207-212.
- Knowles, J., Lethovaara, P. & Reeri, T.T. (1987). Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol*, **5**, 255-261.
- Koroneos, C., Dompros, A. & Roubas, G. (2008). Hydrogen production via biomass gasification—A life cycle assessment approach. *Chemical Engineering and Processing*, **47**, 1261-1268.
- Krakat, N., Westphal, A., Satke, K., Schmidt, S. & Scherer, P. (2010). The microcosm of a biogas fermenter: Comparison of moderate hyperthermophilic (60°C) with thermophilic (55°C) conditions. *Eng Life Sci*, **10**, 520-527.
- Kumar, N.M., Rani, S.R., Sukumaran, R.K. & Pandey, A. (2008). Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. *Appl Biochem Biotechnol*, **151**, 122-131.
- Kumar, S., Tomura, K. & Nei, M. (1993) MEGA: Molecular Evolution Genetics Analysis, version 1.0., Pennsylvania State University, Philadelphia.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Premier, G.C. & Hawkes, D.L. (2006). Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnol Bioeng*, **97**, 759-770.
- Lay, C.H., Wu, J.H., Hsiao, C.L., Chang, J.J., Chen, C.C. & Lin, C.Y. (2010). Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *Int J Hydrogen Energy*, **35**, 13445-13451.
- Lee, D.Y., Ebie, Y., Xu, K.Q., Li, Y.Y. & Inamori, Y. (2010). Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresour Technol*, **101**, S42-S47.
- Lee, S. (1997) Methane and its derivatives. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

- Levin, D.B., Pitt, L. & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*, **29**, 173-185.
- Li, A., Antizar-Ladislao, B. & Khraisheh, M. (2007). Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **30**, 189-196.
- Lin, C.Y. & Lay, C.H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*, **29**, 41-45.
- Lin, V. & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**, 627-642.
- Linko, M. (1977). An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. *Adv Biochem Eng*, **5**, 25-48.
- Lipinsky, E.S. (1981). Chemicals from Biomass: Petrochemical Substitution Options. *Science*, **212**, 1465-1471.
- Liu, D., Liu, D., Zeng, R.J. & Angelidaki, I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res*, **40**, 2230-2236.
- Lo, C.-M. (2008) Cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. The Graduate Faculty, The University of Akron, Akron, USA.
- Lo, Y.-C., Bai, M.-D., Chen, W.-M. & Chang, J.-S. (2008). Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. *Bioresource Technology*, **99**, 8299-8303.
- Logan, B.E., Oh, S., Kim, I.S. & Ginkel, S.V. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol*, **36**, 2530-2535.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 506-577.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. (2009) Brock Biology of microorganisms. 12th Edition. Pearson Educaion, New York.
- Maintinguer, S.I., Fernandes, B.S., Duarte, I.C.S., Saavedra, N.K., Adorno, M.A.T. & Varesche, M.B. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *Int J Hydrogen Energy*, **33**, 4309-4317.
- Mandels, M., Hontz, L. & Nystrom, J. (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol Bioeng*, **16**, 1471-1493.
- Mandels, M., Parrish, F.W. & Reese, E.T. (1962). Sophorose as inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **83**, 400-408.
- Mandels, M. & Reese, E.T. (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol*, **79**, 816-826.
- Manfredi, S. & Christensen, T.H. (2009). Environmental assessment of solid waste landfilling technologies by means of LCA-modeling. *Waste Manage*, **29**, 32-43.
- Markets-and-Markets (2014) Industrial Enzymes Market by Types (Carbohydrase, Protease, Lipase), Applications (Food & Beverages, Cleaning Agents, Bio-Fuel, Animal Feed), & Geography - Global Trends & Forecasts to 2018.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S. & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresour Technol*, **74**, 3-16.
- Matar, S. & Hatch, L.F. (2000) Chemistry of petrochemical processes. Gluf Publishing Company, Houston, USA.
- Melamu, R. & Blottnitz, H.v. (2011). 2nd Generation biofuels a sure bet? A life cycle assessment of how thngs could go wrong. *J Cleaner Prod*, **19**, 138-144.
- Méndez, E. & Sánchez, E. (2012). Excelsior
- Menon, V. & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**, 522-550.
- Mes-Hartree, M., Dale, B.E. & Craig, W.K. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **29**, 462-468.
- Mesa, L., González, E., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Felissia, F. & Castro, E. (2010). Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2³ experimental design. *Applied Energy*, **87**, 109-114.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, **31**, 426-428.

- Mitchell, D., Stuart, D., Hardin, M. & Krieger, N. (2006) Rotating-Drum and Stirred-Drum Bioreactors. In Mitchell, D., Krieger, N. and Berovic, M. (eds). *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 95-114.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA invitro - The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 263-273.
- Muñoz-Páez, K.M. (2008) Producción de hidrógeno mediante la fermentación de residuos orgánicos procedentes de la producción de jugos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, Mexico, D.F.
- Muñoz-Páez, K.M., García-Mena, J. & Poggi-Varaldo, H. (2008). Biological production of hydrogen: a review. *5th IWA International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops*. Hamdi, M., Cecchi, F. and Mata-Alvarez, J. Tunisia.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 695-700.
- Navia, R. & Mohanty, A.K. (2012). Resources and waste management in a bio-based economy. *Waste Manage Res*, **30**, 215-216.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B. & Klocke, M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J Appl Microbiol*, **105**, 1835-1850.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramscüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Hermann, C. & Klocke, M. (2010). Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 2540-2548.
- Nguyen, Q.A., Keller, F.A., Tucker, M.P., Lombard, C.K., Jenkins, B.M., Yomogida, D.E. & Tiangco, V.M. (1999). Bioconversion of mixed solids waste to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, **77-79**, 455-472.
- Niederl-Schmidinger, A. & Narodoslowsky, M. (2008). Life Cycle Assessment as an engineer's tool? *Journal of Cleaner Production*, **16**.
- Novozymes (2013) The Novozymes report 2012. Bedingfield, J. (ed)Copenhagen.
- O-Thong, S., Prasertsan, P. & Birkeland, N.K. (2009). Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresour Technol*, **100**, 909-918.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G. & Reczey, K. (1997). Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme Microb Technol*, **20**, 286-293.
- Pan, C.-M., Fan, Y.-T., Zhao, P. & Hou, H.-W. (2008). Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *Cell*, **33**, 5383-5391.
- Parawira, W. & Tekere, M. (2011). Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit Rev Biotechnol*, **31**, 20-31.
- Patra, A.K. & Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, **96**, 363-375.
- Pennington, D.W., Potting, J., Finnveden, G., Lindeijer, E., Jolliet, O., Rydberg, T. & Rebitzer, G. (2004). Life cycle assessment Part 2: Current impact assessment practice, a review article. *Environ Int*, **30**, 721-739.
- Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. & Knowles, J. (1986). Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene*, **45**, 253-263.
- Pérez-Avalos, O. & Ponce-Noyola, T. (2002). Synthesis and regulation of D-xylanase from *Cellulomonas flavigena* wild type and a mutant. *Biotechnol Lett*, **24**, 813-817.
- Pérez-Avalos, O., Ponce-Noyola, T., Magana-Plaza, I. & Torre, M.d.I. (1996). Induction of xylanase and b-xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**, 405-409.
- Pérez-Avalos, O., Sanchez-Herrera, L.M., Salgado, L.M. & Ponce-Noyola, T. (2008). A bifunctional endoglucanas/endoxyylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Curr Microbiol*, **57**, 39-44.

- Persson, I., Tjerneld, F. & Hahn-Hägerdal, B. (1991). Fungal cellulolytic enzyme production: a review. *Process Biochem*, **26**, 65-74.
- Peters, G.M. & Rowley, H.V. (2009). Environmental comparison of biosolids management systems using life cycle assessment. *Environ Sci Technol*, **43**, 2674-2679.
- Poggi-Varaldo, H.M., Muñoz-Paez, K.M., Escamilla-Alvarado, C., Robledo-Narváez, P.N., Ponce-Noyola, M.T., Calva-Calva, G., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, J., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, A. & Rinderknecht-Seijas, N.F. (2014). Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review. *Waste Manage Res*, **32**, 353-365.
- Poggi-Varaldo, H.M. & Oleszkiewicz, J.A. (1992). Anaerobic co-composting of municipal solid waste and waste sludge at high total solids levels. *Environ Technol*, **13**, 409-421.
- Poggi-Varaldo, H.M., Rodríguez-Vázquez, R., Fernández-Villagómez, G. & Esparza-García, F. (1997). Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Appl Microbiol Biotechnol*, **47**, 284-291.
- Poggi-Varaldo, H.M., Valdés, L., Esparza-García, F. & Fernández-Villagómez, G. (1997). Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids, and municipal solid waste. *Water Sci Technol*, **35**, 197-204.
- Ponce-Noyola, T. & de la Torre, M. (1995). Isolation of a high-specific growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl Microbiol Biotechnol*, **42**, 709-712.
- Ponce-Noyola, T. & de la Torre, M. (2001). Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse. *Biores biotechnol*, **78**, 285-291.
- Porpatham, E., Ramesh, A. & Nagalingam, B. (2007). Effect of hydrogen addition on the performance of a biogas fuelled spark ignition engine. *Int J Hydrogen Energy*, **32**, 2057-2065.
- Purkharthofer, H., Sinner, M. & Steiner, W. (1993). Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme Microb Technol*, **15**, 677-682.
- Raj, K.C. & Chandra, T.S. (1995). A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspegillus fischeri* Fxn1. *Biotechnol Letters*, **17**, 309-314.
- Reczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R. & Zacchi, G. (1996). Cellulase production by *T. reesei*. *Biores Technol*, **57**, 25-30.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. & Vijai-Kumar, E. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol Adv*, **26**, 22-34.
- Ridder, E.R., Nokes, S.E. & Knutson, B.L. (1998). Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *trichoderma longibrachiatum* on wheat bran. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, **41**, 1453-1459.
- Rittmann, B.E. (2008). Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms. *Biotechnol Bioeng*, **100**, 203-212.
- Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R. & Halden, R.U. (2008). Pre-genomic, genomic and post-genomic. *Nature Rev Microbiol*, **6**, 604-612.
- Robledo-Narváez, P., Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, T. & Poggi-Varaldo, H.M. (2008). Biohydrogen from wastes and combination of biological processes for energy yield improvement: a review *The Third International Meeting in Environmental Biotechnology Engineering* Sastre-Conde, I. Palma de Mallorca, Spain. 130.
- Robledo-Narváez, P.N., Calva-Calva, G., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, J., Olvera-Ramírez, R., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, L.A. & Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Evaluation of batch biohydrogen production at different total solids content and initial pH using solid substrate fermentation of organic waste. *12th World Congress on Anaerobic Digestion*. Guadalajara, Mexico.
- Rojas-Rejón, O.A., Poggi-Varaldo, H.M., Ramos-Valdivia, A.C., Martínez-Jiménez, A., Cristiani-Urbina, E., de la Torre, M. & Ponce-Noyola, M.T. (2011). Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **38**, 257-264.
- Rojas-Rejón, O.A., Ponce-Noyola, T., Poggi-Varaldo, H.M. & de la Torre, M. (2007). Saccharification of cellulosic biomass: Regulation of cellulase and xylanase activities under catabolic repression conditions. Abstract. *J. Biotechnol*, **131S** S28.

- Sablayrolles, C., Gabrielle, B. & Montrejaud-Vignoles, M. (2010). Life cycle assessment of biosolids land application and evaluation of the factors impacting human toxicity through plant uptake. *J Ind Ecol*, **14**, 231-241.
- Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y. & Logan, B.E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res*, **40**, 1167-1172.
- Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylösmäki, E., Ward, M. & Penttilä, M. (2002). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A) *Appl Environ Microbiol*, **68**, 4546-4553.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sander, K. & Murthy, G.S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *Int J Life Cycle Assess*, **15**, 704-714.
- Sanz, J.L. & Kögling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Procces Biochemistry*, **42**, 119-133.
- Satio, N. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Schäfer, T., Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., Pedersen, S., Salmon, S., Olsen, H.S., Deinhammer, R. & Lund, H. (2005) Enzymes for Technical Applications. In. *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Schubert, R., Schellnhuber, H.J., Buchmann, N., Epiney, A., Griesshammer, R., Kulesa, M., Messner, D., Rahmstorf, S. & Schmid, J. (2009) Future Bioenergy and Sustainable Land Use. Eartshcan, Malta.
- Selig, M., Weiss, N. & Ji, Y. (2008) Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass (Laboratory analytical procedure). NREL. U.S. Department of Energy. Colorado, USA.
- Semarnat (2009) Informe de la situación del medio ambiente en México. Edición 2008. Compendio de estadísticas ambientales. México.
- Sener (2008) Balance nacional de energía, México, D.F.
- Senthilkumar, S.R., Ashokkumar, B., Raj, K.C. & Gunasekaran, P. (2005). Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresour Technol*, **96**, 1380-1386.
- Shu-YiiWu, Lin, C.-N., Chang, J.-S. & Chang, J.-S. (2005). Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Int J Hydrogen Energy*, **30**, 1375-1381.
- Singh, A., Kumar, P.K.R. & Schügerl, K. (1991). Adsorption and reuse of cellulases during saccharification of cellulosic materials. *Journal of Biotechnology*, **18**, 205-212.
- Song, M., Shin, S.G. & Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresour Technol*, **101**, S23-S28.
- Speece, R.E. (1987) Nutrient requirements. In Chynoweth, D.P. and Isaacson, R. (eds). *Anaerobic digestion of Biomass*. Elsevier Applied Science Publishers LTD. New York.
- Stackebrandt, E., Schumann, P. & Prauser, H. (2006). The family *Cellulomonadaceae*. *Prokaryotes*, **3**, 983-1001.
- Sternberg, D. & Mandels, G.R. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol*, **139**, 761-769.
- Sumiko-Hirasawa, J., Sarti, A., Aguila, N.K.S.D. & Varesche, M.B.A. (2008). Application of molecular techniques to evaluate the methanogenic archaea and anaerobic bacteria in the presence of oxygen with different COD:Sulfate ratios in a UASB reactor. *Anaerobe*, **14**, 209-218.
- Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, **83**, 1-11.
- Sunna, A. & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, **17**, 39-67.
- Taconi, K.A., Zappi, M.E., French, W.T. & Brown, L.R. (2008). Methanogenesis under acidic pH conditions in a semi-continuous reactor system. *Bioresour Technol*, **99**, 8075-8081.
- Taherzadeh, M., Niklasson, C. & Liden, G. (2000). On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. *Biotechnol Bioeng*, **69**, 330-338.
- Takai, K. & Horikoshi, K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 5066-5072.

- Thauer, R.K. (1998). Biochemistry of methanogenesis : a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiol*, **144**, 2377-2406.
- Thauer, R.K. & Shima, S. (2006). Methane and microbes. *Nature*, **440**, 878-879.
- Ueno, Y., Fukui, H. & Goto, M. (2007). Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environ Sci Technol*, **41**, 1413-1419.
- Updegraff, D.M. (1969). Semi-micro determination of cellulose in biological material. *Anal Biochem*, **32**, 424-428.
- Valdez-Vazquez, I. (2007) Caracterización bioquímica y microbiológica de sistemas en lote y semi-continuo para la producción de H₂ vía fermentativa de residuos sólidos orgánicos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F.
- Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H.M. (2009). Alkalinity and high total solids affecting H₂ production from organic solid waste by anaerobic consortia. *Int J Hydrogen Energy*, **34**, 3639-3646.
- Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H.M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Ren Sust Energy Rev*, **13**, 1000-1013.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F. & Poggi-Varaldo, H.M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrogen Energy*, **30**, 1383-1391.
- Vavouraki, A.I., Angelis, E.M. & Kornaros, M. (2013). Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes. *Waste Manage*, **33**, 740-745.
- Vázquez-Larios, A.L., Solorza-Feria, O., Vázquez-Huerta, G., Esparza-García, F., Rinderknecht-Seijas, N. & Poggi-Varaldo, H.M. (2011). Effects of architectural changes and inoculum type on internal resistance of a microbial fuel cell designed for the treatment of leachates from the dark hydrogenogenic fermentation of organic solid wastes. *Int J Hydrogen Energy*, **36**, 6199-6209.
- Venkata-Mohan, S., Mohanakrishna, G. & Sarma, P.N. (2008). Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy*, **33**, 2156-2166.
- Venturi, P. & Venturi, G. (2003). Analysis of energy comparison for crops in european agricultural systems. *Biomass Bioenergy*, **25**, 235-255.
- Wang, W., Kang, L. & Lee, Y. (2010). Production of Cellulase from Kraft Paper Mill Sludge by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Appl Biochem Biotechnol*, **161**, 382-394.
- Wang, X. & Zhao, Y. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *Int J Hydrogen Energy*, **34**, 245-254.
- Warzywoda, M., Larbre, E. & Pourquié, J. (1992). Production and characterization of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* grown on various carbon sources. *Bioresour Technol*, **39**, 125-130.
- Wen, Z., Liao, W. & Chen, S. (2005). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Biores Technol*, **96**, 491-499.
- Whelan, H.A. & Pembroke, J.T. (1989). The effect of protease on stability of cellulase and xylanase from *Cellulomonas flavigena*. *Biotechnol Lett*, **11**, 891-894.
- Whittaker, R.H. (1978) Classification of plant communities. Kluwer Academic Publishers.
- Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci*, **74**, 5088-5090.
- Wright, J.D. (1988). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chem Eng Prog*, **84**, 62-74.
- Wu, S.-Y., Lin, C.-N., Chang, J.-S. & Chang, J.-S. (2005). Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Int J Hydrogen Energy*, **30**, 1375-1381.
- Xie, B., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. & Cen, K. (2008). Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency. *Appl Microbiol*, **33**, 5006-5011.
- Xin, F. & Geng, A. (2010). Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, **162**, 295-306.
- Xing, W., Dong-jie, N., Xiao-shuang, Y. & You-cai, Z. (2008). Optimization of methane fermentation from effluent of bio-hydrogen fermentation process using response surface methodology. *Bioresour Technol*, **99**, 4292-4299.
- Yokoyama, H., Yamashita, T., Ogino, A., Ishida, M. & Tanaka, Y. (2010). Hydrogen fermentation of cow manure mixed with food waste. *Japan Int Res Cent Agric Sci*, **44**, 399-404.

- Yu, H.Q., Tay, J.H. & Herbert, H.P.F. (2001). The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Res*, **35**, 1052-1060.
- Yu, Y., Kim, J. & Hwang, S. (2005). Use of Real-Time PCR for group specific quantification of aceticlastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnol Bioeng*, **93**, 424-433.
- Zárate-Segura, P., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., García-Mena, J., Sanz, J.L., Zaiat, M. & Poggi-Varaldo, H. (2004). Remoción de percloroetileno en dos tipos de sistemas anaerobios continuos. *Interciencia*, **29**, 10.
- Zeikus, J.G. (1980). Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **34**, 423-464.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E. & Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*, **24**, 452-481.
- Zhu, H., Stadnyk, A., Béland, M. & Seto, P. (2008). Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresour Technol*, **99**, 5078-5084.
- Zhuang, J., Marchant, M.A., Nokes, S.E. & Strobel, H.J. (2007). Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Appl Engineer Agric*, **23**, 679-687.

11. ANEXOS

11.1. Tablas y figuras

11.1.1. Actividad 1a. Producción de hidrógeno en sustrato sólido en régimen semi-continuo

Tabla A1. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre la productividad de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	101917	5	20383	4.09	0.0581
A-Temperatura	39790	1	39790	7.98	0.0302
B-Origen de alim.	45031	2	22515	4.51	0.0636
AB	17096	2	8548	1.71	0.2578
Error	29927	6	4987		
Corr Total	131844	11			

10.1.2. Actividad 1b. Producción de hidrógeno en sustrato sólido por lote con adición de fuente de nitrógeno

Tabla A2. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura, nitrógeno adicionado y sales de fosfato adicionadas sobre la producción acumulada de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	2473557	7	353365	10.16	0.0020
A-Temperatura	1172185	1	1172185	33.71	0.0004
B-Nitrógeno adicionado.	957609	1	957609	27.54	0.0008
C-Sales de fosfato adicionadas	187034	1	187034	5.38	0.0490
AB	11777	1	11777	0.33	0.5766
AC	130519	1	130519	3.75	0.0887
BC	14346	1	14346	0.41	0.5386
ABC	85	1	85	0.002	0.9618
Error	278115	8	34764		
Corr Total	2751672	15			

Tabla A3. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura, nitrógeno adicionado y sales de fosfato adicionadas sobre la productividad inicial de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	5731	7	818	5.79	0.0122
A-Temperatura	2647	1	2647	18.73	0.0025
B-Nitrógeno adicionado.	9	1	9	0.06	0.8009
C-Sales de fosfato adicionadas	473	1	473	3.34	0.1047
AB	635	1	635	4.49	0.0668
AC	336	1	336	2.38	0.1613
BC	275	1	275	1.94	0.2001
ABC	1354	1	1354	9.58	0.0148
Error	1130	8	141		
Corr Total	6861	15			

11.1.2.1. Experimentos complementarios

Tabla A4. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de nitrógeno sobre la producción acumulada de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	88106	3	29369	3.88	0.1116
A-Temperatura	39608	1	39608	5.23	0.0841
B-Adición de nitrógeno	8603	1	8603	1.14	0.3465
AB	39895	1	39895	5.27	0.0833
Error	30280	4	7570		
Corr Total	118386	7			

Tabla A5. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de nitrógeno sobre la productividad inicial de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	525.3	3	175.1	4.44	0.0920
A-Temperatura	460.5	1	460.5	11.68	0.0269
B- Adición de nitrógeno	3.4	1	3.4	0.09	0.7829
AB	61.4	1	61.4	1.56	0.2802
Error	157.8	4	39.4		
Corr Total	683.1	7			

Tabla A6. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de sales sobre la producción acumulada de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	133429	3	44476	3.74	0.1177
A-Temperatura	56219	1	56219	4.72	0.0955
B-Adición de sales	51080	1	51080	4.29	0.1070
AB	26130	1	26130	2.20	0.2126
Error	47613	4	11903		
Corr Total	181042	7			

Tabla A7. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y adición de sales sobre la productividad inicial de hidrógeno

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	436.7128	3	145.5709	4.54283	0.0889
A-Temperatura	185.0484	1	185.0484	5.77480	0.0741
B- Adición de sales	251.6639	1	251.6639	7.85367	0.0487
AB	0.0004	1	0.0004	0.00001	0.9972
Error	128.1765	4	32.0441		
Corr Total	564.8894	7			

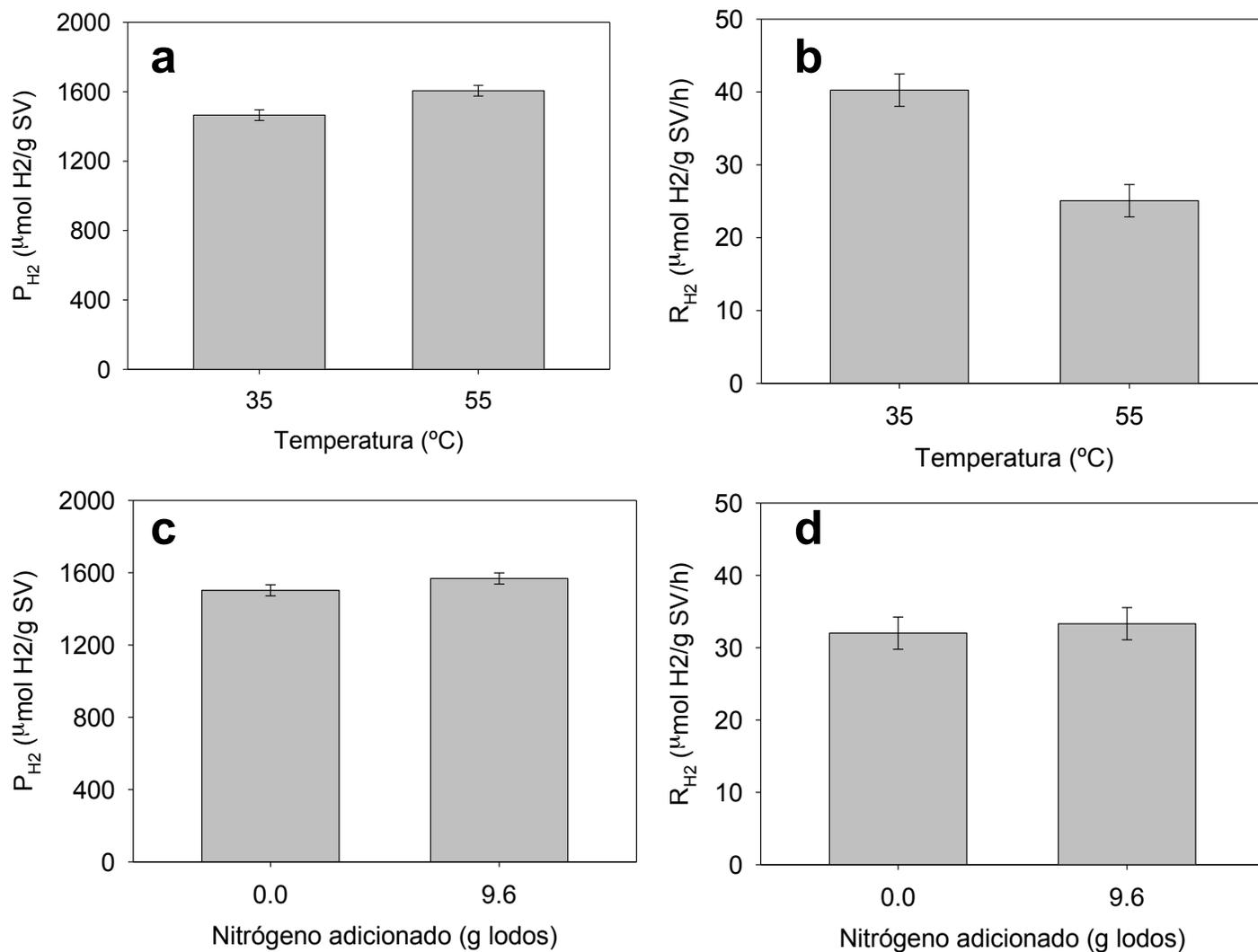


Fig. A1. Efectos de la temperatura sobre la (a) producción acumulada de hidrógeno y (b) productividad inicial de hidrógeno. Efectos de la adición de nitrógeno sobre la (c) producción acumulada de hidrógeno y (d) productividad inicial de hidrógeno.

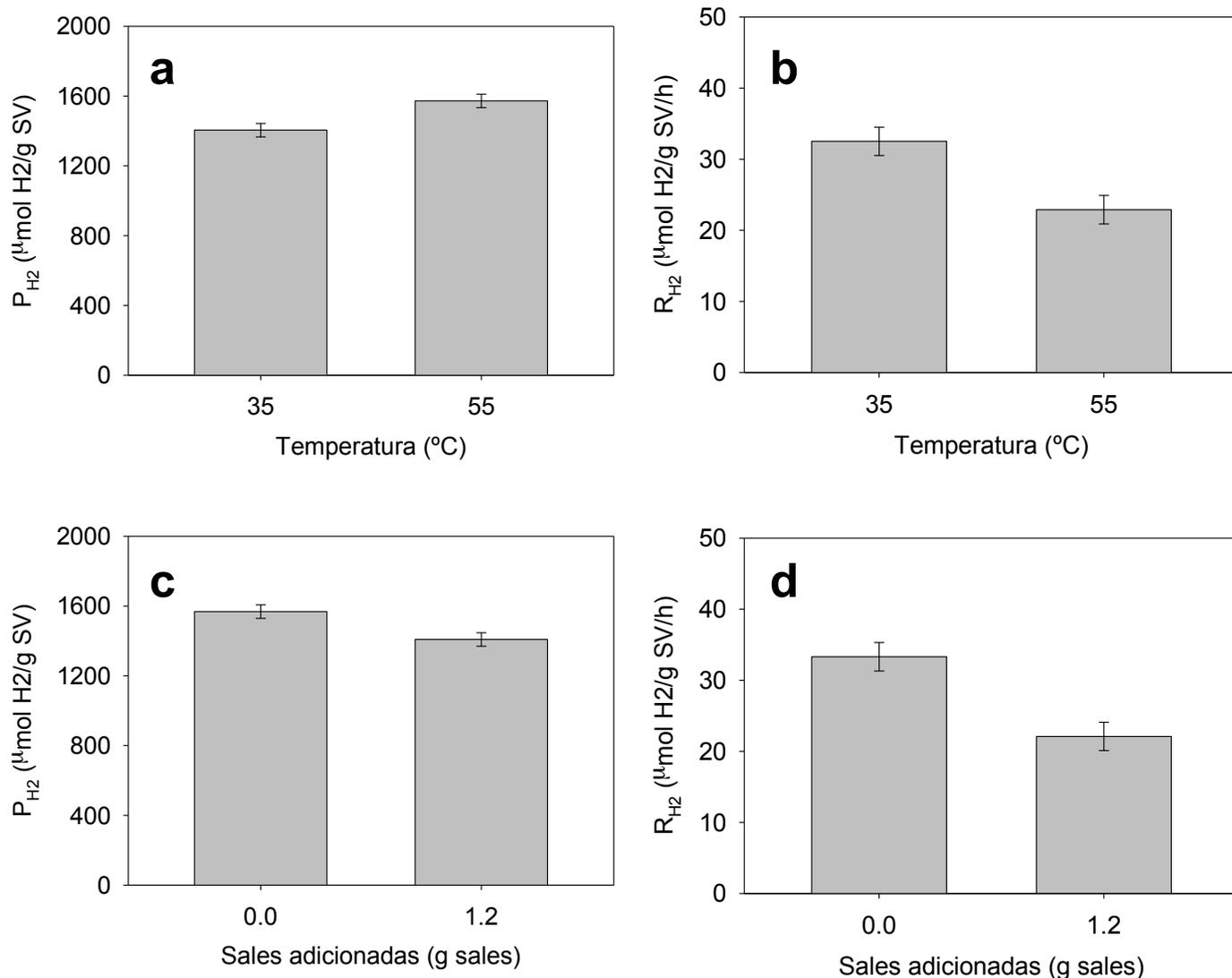


Fig. A2. Efectos de la temperatura sobre la (a) producción acumulada de hidrógeno y (b) productividad inicial de hidrógeno. Efectos de la adición de sales sobre la (c) producción acumulada de hidrógeno y (d) productividad inicial de hidrógeno.

11.1.3. Actividad 2. Producción de metano a partir de sólidos fermentados

Tabla A8. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre la producción de biogás

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	133650.5	3	44550	57.1	0.0010
A-Temperatura	56448	1	56448	72.4	0.0010
B-Origen de alim.	66978	1	66978	85.9	0.0008
AB	10224.5	1	10225	13.1	0.0223
Error	3119	4	780		
Corr Total	136769.5	7			

Tabla A9. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre la productividad de metano

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	414477	3	138159.00	81.91	0.0005
A-Temperatura	291848	1	291848.00	173.02	0.0002
B-Origen de alim.	95484.5	1	95484.50	56.61	0.0017
AB	27144.5	1	27144.50	16.09	0.0160
Error	6747	4	1686.75		
Corr Total	421224	7			

Tabla A10. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre el rendimiento de metano por sustrato alimentado

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	3811.375	3	1270	5.6	0.0644
A-Temperatura	2080.125	1	2080	9.2	0.0387
B-Origen de alim.	300.125	1	300	1.3	0.3135
AB	1431.125	1	1431	6.3	0.0657
Error	904.5	4	226		
Corr Total	4715.875	7			

Tabla A11. Análisis de varianza de los efectos de la temperatura y TRM sobre el rendimiento de metano por sustrato removido

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	10362.5	3	3454	4.8	0.0808
A-Temperatura	4418	1	4418	6.2	0.0676
B- Origen de alim.	5832	1	5832	8.2	0.0460
AB	112.5	1	113	0.2	0.7115
Error	2853	4	713		
Corr Total	13215.5	7			

11.1.4. Actividad 3. Producción enzimática con *T. reesei* MCG 80

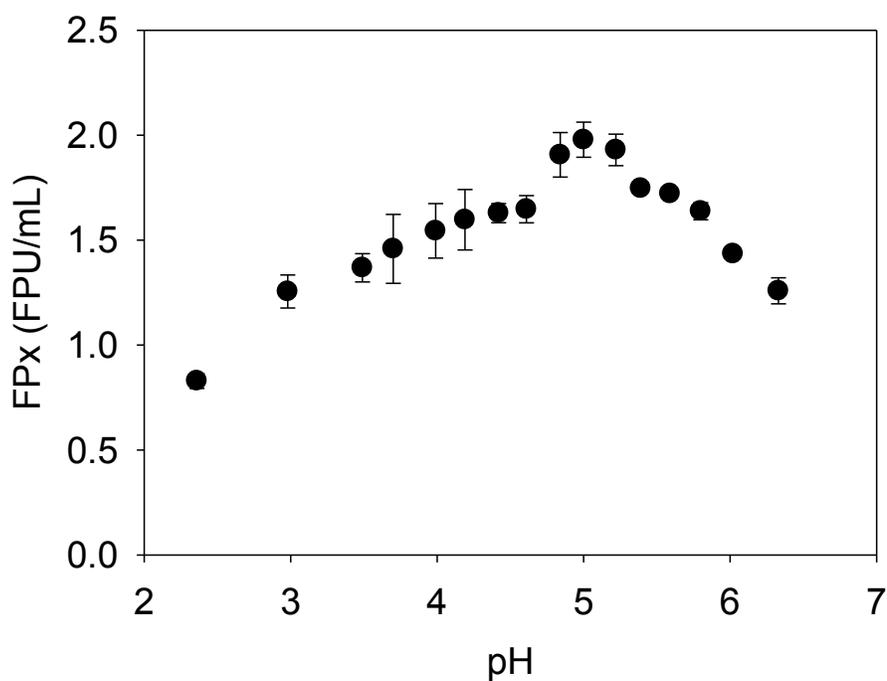


Fig. A3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80.

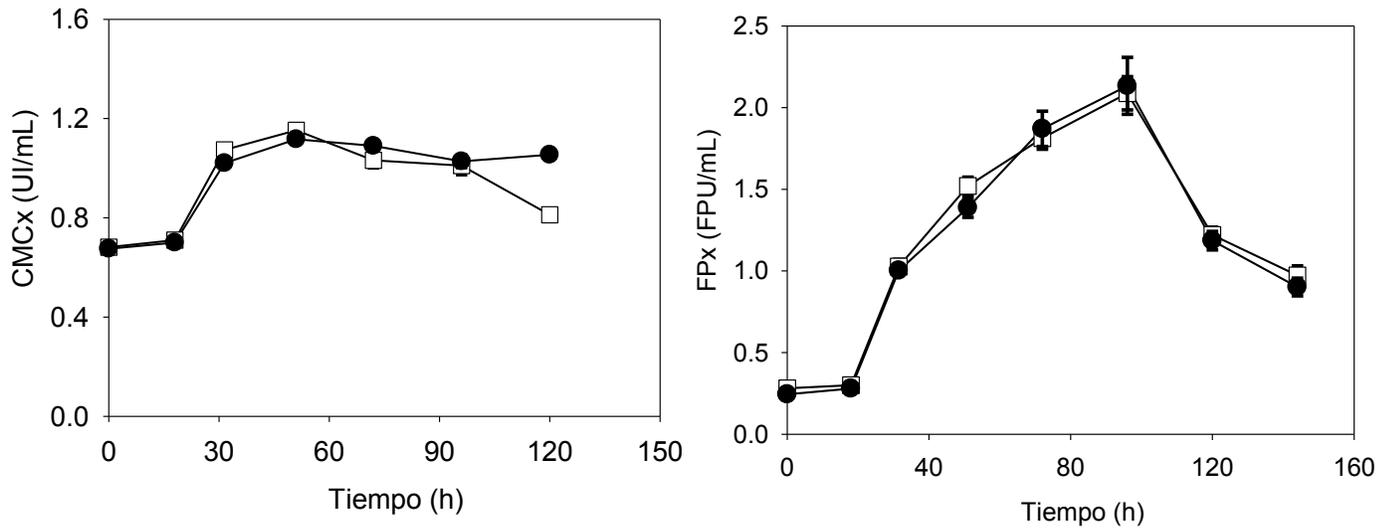


Fig. A4. Cinética de actividad enzimática. (a) actividad de carboximetilcelulasas, (b) actividad de celulasas en papel filtro. (●) Ensayo con inoculación de micelio al 6 % v/v, (□) Ensayo con inoculación de micelio al 10 % v/v.

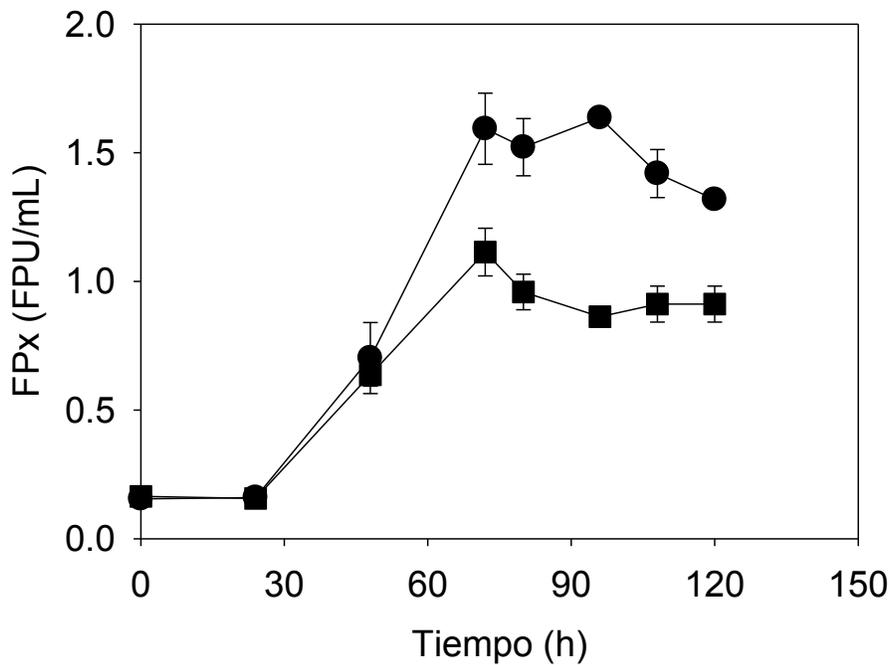


Fig. A5. Cinética de actividad enzimática. (●) Ensayo pH 3.8, (■) Ensayo control pH 4.8.

11.1.5. Actividad 4. Sacarificación de biomasa usando el extracto enzimático de *T. reesei* MCG 80

Tabla A13. Análisis de varianza de los efectos del tipo de sustrato y tipo de enzima sobre la producción de sacarificados

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	151.7	5	30.34	11.42	0.005
A- Sustrato	132.95	2	66.47	25.03	0.0012
B- Enzima	18.08	1	18.08	6.81	0.0402
AB	0.67	2	0.34	0.13	0.8832
Error	15.94	6	2.66		
Corr Total	167.64	11			

Tabla A14. Análisis de varianza del efecto de la relación enzima sustrato sobre la producción de glucosa

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	5.792	4	1.448	7.949	0.0038
Relación enzima sustrato	5.792	4	1.448	7.949	0.0038
Error	1.822	10	0.182		
Corr Total	7.614	14			

Tabla A15. Análisis de varianza del efecto de la relación enzima sustrato sobre el rendimiento de sacarificación

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	91.508	4	22.877	280.448	< 0.0001
Relación enzima sustrato	91.508	4	22.877	280.448	< 0.0001
Error	0.816	10	0.082		
Corr Total	92.324	14			

Tabla A16. Análisis de varianza del efecto de la relación enzima sustrato sobre la actividad enzimática residual después de 72 h de sacarificación de SF

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Prob>F
Significancia del modelo	1.589	4	0.397	60.352	< 0.0001
Relación enzima sustrato	1.589	4	0.397	60.352	< 0.0001
Error	0.066	10	0.007		
Corr Total	1.654	14			

11.1.6. Actividad 5. Evaluación de sistemas: Recursos-Energía-Productos-Desechos

11.1.6.1. Exergía

Al momento de analizar la generación de energía, una comparación directa de energía térmica con energía eléctrica o mecánica puede ocasionar conclusiones erróneas. Aún en condiciones reversibles y sin pérdidas, la energía térmica sólo puede ser parcialmente convertida en energía mecánica o eléctrica, que se pueden generalizar como trabajo. La porción de la energía térmica que puede ser convertida a trabajo es dependiente de la temperatura disponible, y recibe el nombre de exergía (Schubert *et al.*, 2009). Se puede representar mediante la eficiencia térmica del ciclo de Carnot:

$$E_{ex} = E_{térmica} \cdot \eta_{Carnot} = E_{térmica} \left(1 - \frac{T_a}{T_H} \right) \quad [32]$$

donde E_{ex} es la fracción exergética de la energía térmica $E_{térmica}$, T_H es la temperatura del calor en Kelvin y T_a es la temperatura ambiente en Kelvin.

La exergía es una forma de expresar la calidad de la energía de una forma diferente al contenido energético. La energía y la exergía se expresan en MJ, pero la exergía es una medida del trabajo útil que puede ofrecer un portador de energía. Por ejemplo, el gas natural tiene un alto valor de exergía, pues puede ser usado para generar altas temperaturas y vapor de alta presión. Si el gas natural se usa para calentar una casa con una caldera altamente eficiente, muy poco contenido de energía se pierde, pero el

contenido de exergía se pierde casi completamente, ya que hay muy poco trabajo que se puede realizar con agua a 50 – 80 °C (Goedkoop *et al.*, 2009).

11.1.6.2. Tablas

Tabla A17. Factores de normalización para impactos ambientales seleccionados, de acuerdo con el método CML 2001

Categoría de impacto	Factor
Agotamiento abiótico	6.39E-12
Acidificación	3.11E-11
Eutroficación	7.56E-12
Calentamiento global 100a	2.41E-14
Agotamiento de la capa de ozono 40a	2.22E-09
Oxidación fotoquímica	1.04E-11

11.2. Premios

Best Student Paper en Battelle's International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies

Escamilla-Alvarado, C., Vazquez-Barragan, J.A., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Poggi-Varaldo, H.M. (2011) A Novel Biorefinery Approach for Biofuels and Holocelullolytic Enzymes Production from Organic Wastes. In: H.V. Rectanus and R. Sirabian (Editors), *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies—2011*. International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (Reno, NV; June 27–30, 2011). ISBN 978-0-9819730-4-3, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH.

F-44, in: H.V. Rectanus and R. Sirabian (Chairs), *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies—2011*. International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (Reno, NV; June 27–30, 2011). ISBN 978-0-9819730-4-3, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. www.battelle.org/biosymp

A Novel Biorefinery Approach for Biofuels and Holocelullolytic Enzymes Production from Organic Wastes

Carlos Escamilla-Alvarado, Jesús A. Vazquez-Barragán,
María T. Ponce-Noyola, and Héctor M. Poggi-Varaldo* (hectorpoggi2001@gmail.com)
(CINVESTAV del IPN, México D.F., México)

ABSTRACT: The organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) was fed to a two-stage solid substrate anaerobic digestion (2S-SSAD) process evaluated at 54 and 35°C on bioreactors running at 21, 14, and 10 d mass retention time (MRT). The fermented solids from these operational units were fed to corresponding individual methanogenic bioreactors at 28 d MRT. The spent solids from the 2S-SSAD process were evaluated as substrates for cellulase and xylanase production using the mutant eubacterium strain *Cellulomonas flavigena* PR-22 in submerged cultures in flask experiments. Hydrogen productivity in mesophilic bioreactors almost doubled that in thermophilic ones ($p < 0.05$). On the other hand, the effect of MRT of the hydrogenogenic stage (levels 10, 14, 21 d) was not significant ($p = 0.103$). The best performance was at 35°C and 10 d MRT (hydrogen productivity = 13.2 NmL_{H₂}/kg_s/d). In the second (methanogenic) stage, the methanogenic productivity was significantly superior in thermophilic regime. Maximum methane productivity was 341 NmLCH₄/kg_s/d that corresponded to the thermophilic process operated at 42 d total MRT (total MRT defined as hydrogenogenic MRT plus methanogenic MRT). Xylanolytic and cellulolytic activities with spent solids as sole substrate reached up to 5000 and 980 IU/L, respectively. We conclude that integration of enzyme production as an additional stage using spent solids from bioenergy processes is possible, attractive, and properly fits in the *biorefinery* concept, towards which environmental and process biotechnology is focusing. The scale-up from Erlenmeyer flasks to fermenters is strongly suggested to evaluate the possible increase and feasibility of enzyme production.

INTRODUCTION

The generation of solid wastes amounts to thousands of tons per day in megalopolis of developed and underdeveloped countries. In Mexico, 102,000 ton/day are produced (INEGI, 2009) where the organic fraction (OFMSW, paper, and organic wastes) represents up to 60% of the total. The OFMSW is a potential raw material for the production of biofuels, intermediary chemicals, proteins, enzymes, as well as other added-value products (Holtzapple et al., 1992; Silva et al., 1995; Lay et al., 1999; Poggi-Varaldo et al., 2005; Valdez-Vazquez et al., 2005). Bioproducts are actually obtained through biotechnology, but few works have dealt with the problem of highly organic-loaded effluents from these processes. On a biorefinery perspective such problems are to be solved by the maximization of end products (Zeikus, 1980; Kamm and Kamm, 2004).

* Author for correspondence

11.3. Publicaciones emanadas de la Tesis

11.3.1. Artículos en revistas internacionales con arbitraje estricto indizaas en SCI-JCR Thomson Reuters

Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2012) Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic–methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *Process Biochem.* 47: 1572–1587.



Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic–methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste

C. Escamilla-Alvarado^a, E. Ríos-Leal^b, M.T. Ponce-Noyola^c, H.M. Poggi-Varaldo^{a,*}

^a Environmental Biotechnology and Renewable Energies R&D Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City 07000, Mexico

^b Instrumental Analytical Laboratory, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City 07000, Mexico

^c Microbial Genetics Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City 07000, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2011

Received in revised form

17 November 2011

Accepted 12 December 2011

Available online 19 December 2011

Keywords:

Biohydrogen

Biorefinery

Methane

Solid substrate fermentation

Two-stage anaerobic digestion

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the performance of a two-stage hydrogenogenic–methanogenic (H–M) semi-continuous process in terms of mass retention time (MRT) for hydrogenogenic stage (H-stage), feed source for methanogenic stage (M-stage) and thermal regime (35 and 55 °C) for both stages. The substrate was a model organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) at 35% total solids.

In H-stage, mesophilic temperature had a positive significant effect on higher hydrogen productivities and lower amounts of hydrogen sinks compared to thermophilic operation. Calculations based on mass balances and biochemical stoichiometry confirmed that acid fermentation deviation was linked to low biohydrogen yields. The M-stage performance was influenced by both the temperature and feed source. Bioreactors in thermophilic regime performed better than mesophilic ones. Maximum methane productivity was 341 NmL CH₄/(kg_{VS} d) that corresponded to the thermophilic bioreactor fed with fermented solids from H stage at 14 d MRT. The two-stage process showed higher gross energetic potential when compared to an only methanogenic process operated at equivalent MRT (control); this was due to a higher methane productivity in the M-stage of the series process. The main contribution of H-stage seemed to be associated to hydrolysis of the complex substrate thus generating metabolites for the M-stage rather than the hydrogen production itself.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the last 15 years there has been an intensive research in order to improve and foster biohydrogen and methane technologies for biofuel production. From dark fermentation to cyanobacteria and purple non-sulphur bacteria, studies have focused on better hydrogen yields that can compete with H₂ costs from traditional non-renewable fuels [1]. As for biomethane, its exploitation has become an accepted/commercial technology [2–4].

Recently, interest on two-stage processes, hydrogenogenic followed by a methanogenic stage (H–M), has resurrected in the perspective of reclaiming bioenergy from organic wastes [5–9]. Two-stage process has been previously investigated in the way of an acidogenic coupled to a methanogenic bioreactor for waste sludge processing (two-phase anaerobic digestion), particularly during the seventies and eighties decades [10–12], aiming to enhance the methanogenic stage of sludge digestion. The main

objective of such an array was to separate the major microbial populations in different bioreactors according to its biochemical characteristics. Hydrolysis of the organic matter and its conversion to short-chain organic acids would occur in the acidogenic bioreactor, and so, microorganisms in the coupled methanogenic reactor would profit from this and further degrade the substrate and organic metabolites to methane and CO₂. Thus, methane yields have been improved when compared to one-phase process [13].

However, since hydrogen is produced along with organic acids such as acetate or butyrate, the opportunity to obtain biohydrogen as a fuel was then considered [2]. By means of the two-stage process it is possible, in principle, to attain a more thorough use of the substrate associated to the depletion of the organic load (as COD or VS), as well as increased yields of bioenergy and other valuable by-products [5,14–16].

So far, there has been a predominance of studies dealing with hydrogen and methane production using model substrates as sucrose, starch, or liquid wastes in submerged culture [17–19]. Yet, real application is not feasible for pure, expensive substrates. Therefore process success and scale up depends on processing inexpensive and almost inexhaustible substrates, such as organic wastes [20].

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5747 3800x4324; fax: +52 55 5747 3315.
E-mail address: hectorpoggi2001@gmail.com (H.M. Poggi-Varaldo).

Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2013) A multivariable evaluation of biohydrogen production by solid substrate fermentation of organic municipal wastes in semi-continuous and batch operation. *Int J Hydrogen Energy*. 38(28): 12527-12538.

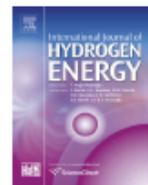
INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY 38 (2013) 12527–12538



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/he



A multivariable evaluation of biohydrogen production by solid substrate fermentation of organic municipal wastes in semi-continuous and batch operation



Carlos Escamilla-Alvarado^a, Teresa Ponce-Noyola^b, Elvira Ríos-Leal^c, Héctor Mario Poggi-Varaldo^{a,*}

^aEnvironmental Biotechnology and Renewable Energies R&D Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 México D.F., Mexico

^bMicrobial Genetic Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 México D.F., Mexico

^cAnalysis Central, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 August 2012

Received in revised form

20 February 2013

Accepted 24 February 2013

Available online 11 May 2013

Keywords:

Biohydrogen

High total solids

Intermittent venting

Municipal organic solid wastes

Nitrogen supplementation

ABSTRACT

This work focused on the hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) in solid substrate fermentation (SSF) with a double purpose: (i) to evaluate the effect of the total solids content (20.9 and 35% TS), temperature (35 and 55 °C) and mass retention time (MRT, 21 and 14 d) on semi-continuous fermentation, and (ii) to test the supplementation of OFMSW with nutrient nitrogen in the form of waste activated sludge in batch mini-reactors.

Firstly, in the semi-continuous fermentation, it was found that factors had significant influence on hydrogen productivity in the order: total solids > temperature. Significant interactions amidst factors were only observed between TS × temperature and TS × MRT. Indeed, best hydrogen productivity averaged up to 123 NmL H₂/kg_{wms}/d in reactors fed with 20.9%TS feedstock. In general, variations and inhibition of hydrogen production were related to low pH and lactic acid and solvent deviation of the fermentation. Therefore these parameters should be followed with particular attention in order to implement correction and recovery techniques.

Secondly, in the batch fermentation, supplementation with nitrogen (adjusted C/N to 30) did not show a significant effect. Highest results were cumulative hydrogen production = 1641 μmol_{H₂}/g VS and initial hydrogen production = 68.3 μmol_{H₂}/g VS/h in the mini-reactors without addition of alkalinity or sludge. No significant lag phase was observed in all the experimental units. Higher specific energetic potential (due to biohydrogen) were obtained for batch fermentation units compared with the semi-continuous process (3-fold higher).

Copyright © 2013, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5747 3800x4324.

E-mail addresses: hectorpoggi2001@gmail.com, mcepe@yahoo.com (H.M. Poggi-Varaldo).

0360-3193/\$ – see front matter Copyright © 2013, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.124>

Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo H.M., Ponce-Noyola M.T. (2013) Use of organic waste for the production of added-value holocellulases with *Cellulomonas flavigena* PR-22 and *Trichoderma reesei* MCG 80. *Waste Manage Res.* 31(8): 849-858.

Original Article



Use of organic waste for the production of added-value holocellulases with *Cellulomonas flavigena* PR-22 and *Trichoderma reesei* MCG 80

Waste Management & Research
31(8) 849-858
© The Author(s) 2013
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0734242X13492841
wmr.sagepub.com
SAGE

Carlos Escamilla-Alvarado¹, Héctor M Poggi-Varaldo¹ and M Teresa Ponce-Noyola²

Abstract

We evaluated the production of holocellulases from the cellulolytic microorganisms *Cellulomonas flavigena* PR-22 and *Trichoderma reesei* MCG 80 using as substrates the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and digestates from a hydrogenogenic-methanogenic bioenergy production process. The first set of experiments (E1) used the mutant actinobacteria *C. flavigena* PR-22 whereas another set (E2) used the mutant filamentous fungi *T. reesei* MCG 80. In E1 with OFMSW as substrate, xylanolytic activities ranged from 1800 to 3900 international units $\text{g}_{\text{holocellulose}}^{-1}$ ($\text{IU g}_{\text{hol}}^{-1}$), whereas the cellulolytic activities ranged from 220 to 420 $\text{IU g}_{\text{cel}}^{-1}$. The variation of agitation speed did not have a significant effect on enzyme activity, whereas the increase of substrate concentration had a significant negative effect on both xylanolytic and cellulolytic activities on a holocellulose feed basis. Regarding E2, the OFMSW was evaluated at 1, 2 and 3 % volatile solids (VS). At 2 % VS the best filter paper activities were 1200 filter paper units (FPU) l^{-1} ; however, in a holocellulase basis the best result was 67 FPU $\text{g}_{\text{hol}}^{-1}$, corresponding to 1 % VS. Next, OFMSW was compared with OFMSW supplemented with lactose, digested solids from hydrogenogenic fermentation (D1) and digested solids from a two-stage process (D2). Against expectations, no positive effect was found in OFMSW due to lactose. The best enzymatic titres were in the order $\text{D1} > \text{OFMSW} \approx \text{OFMSW} + \text{lactose} > \text{D2}$. The use of digestates from hydrogenogenic fermentation for enzyme production holds promise for waste management. It promotes energy and added-value bioproduct generation—a green alternative to common practice of management and disposal of organic wastes.

Keywords

Biorefinery, cellulases, *Cellulomonas flavigena*, digestates, organic waste, *Trichoderma reesei*, xylanases

Introduction

Massive amounts of municipal waste are generated every day, and their collection, handling and disposal is of great concern. When dumped to irregular sites and poorly engineered landfills the waste can contribute to global warming by generating methane (CH_4) from naturally occurring digestion, as well as health and aesthetic nuisances. Municipal solid waste (MSW) is constituted by up to 50–60 % of biodegradable materials (Gentil et al., 2009). These components are known as the organic fraction of MSW (OFMSW). In order to reduce waste, improve management and, at the same time, obtain added-value commercial products, OFMSW, as well as other wastes, can be used in fermentation/digestion processes for bihydrogen and CH_4 generation (Escamilla-Alvarado, 2013; Escamilla-Alvarado et al., 2012). Indeed, anaerobic fermentation of wastes is a biological process considered to have a great potential for producing biofuels and bioproducts (Poggi-Varaldo, 1999; Poggi-Varaldo et al., 1999; Reith et al., 2003; Valdez-Vázquez et al., 2005). A hydrogen (H_2) production stage followed by a methanogenic stage (H–M), is basically an acidogenic stage coupled to a methanogenic bioreactor. By adjusting the pH and organic

loading rates, different microbial communities are favoured, thus enabling H_2 and CH_4 harvesting in separate bioreactors.

The H–M process seems to be an appropriate alternative to biological treatment and biofuel generation from wastes. On the one hand, anaerobic treatment is characterised by the generation of lower amounts of sludge than aerobic processes, as approximately two parts of sludge are produced for every 10 parts of substrate. On the other hand, valuable H_2 and CH_4 are obtained. Although the waste is reduced, the digestate generated must still

¹Environmental Biotechnology and Renewable Energies R&D Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México

²Microbial Genetics Group, *ibidem*, Mexico D.F., México

Corresponding author:

M. Teresa Ponce-Noyola, Microbial Genetics Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, Mexico D.F., 07000, Mexico.

Email: r4cepe@yahoo.com

Robledo-Narváez, P.N., Muñoz-Paez, K.M., Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, T., Calva-Calva, G., Ríos-Leal, E., Poggi-Varaldo, H.M., Galíndez-Mayer, J., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, A., Rinderknecht-Seijas, N.F. (2014) Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: a review. *Waste Manage Res*

Review article

WM&R

Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review

Waste Management & Research
1-13
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0734242X14529178
wmr.sagepub.com
SAGE

Héctor M Poggi-Varaldo¹, Karla M Muñoz-Paez¹, Carlos Escamilla-Alvarado¹, Paula N Robledo-Narváez¹, M Teresa Ponce-Noyola¹, Graciano Calva-Calva¹, Elvira Ríos-Leal¹, Juvencio Galíndez-Mayer², Carlos Estrada-Vázquez³, Alfredo Ortega-Clemente⁴ and Noemí F Rinderknecht-Seijas⁵

Abstract

Biohydrogen is a sustainable form of energy as it can be produced from organic waste through fermentation processes involving dark fermentation and photofermentation. Very often biohydrogen is included as a part of biorefinery approaches, which reclaim organic wastes that are abundant sources of renewable and low cost substrate that can be efficiently fermented by microorganisms. The aim of this work was to critically assess selected bioenergy alternatives from organic solid waste, such as biohydrogen and bioelectricity, to evaluate their relative advantages and disadvantages in the context of biorefineries, and finally to indicate the trends for future research and development. Biorefining is the sustainable processing of biomass into a spectrum of marketable products, which means: energy, materials, chemicals, food and feed. Dark fermentation of organic wastes could be the beach-head of complete biorefineries that generate biohydrogen as a first step and could significantly influence the future of solid waste management. Series systems show a better efficiency than one-stage process regarding substrate conversion to hydrogen and bioenergy. The dark fermentation also produces fermented by-products (fatty acids and solvents), so there is an opportunity for further combining with other processes that yield more bioenergy. Photoheterotrophic fermentation is one of them: photosynthetic heterotrophs, such as non-sulfur purple bacteria, can thrive on the simple organic substances produced in dark fermentation and light, to give more H₂. Effluents from photoheterotrophic fermentation and digestates can be processed in microbial fuel cells for bioelectricity production and methanogenic digestion for methane generation, thus integrating a diverse block of bioenergies. Several digestates from bioenergies could be used for bioproducts generation, such as cellulolytic enzymes and saccharification processes, leading to ethanol fermentation (another bioenergy), thus completing the inverse cascade. Finally, biohydrogen, biomethane and bioelectricity could contribute to significant improvements for solid organic waste management in agricultural regions, as well as in urban areas.

Keywords

Agricultural wastes, batch dark fermentation, bioelectricity, biohydrogen, biorefinery, biomethane, municipal wastes, microbial fuel cell

Introduction

In the last 15 years, research interest on bioH₂ has resurrected, particularly from the dark fermentation (DF) of solid wastes (Kovács et al., 2006; Muñoz-Páez et al., 2012) as a way to contribute to solve the crisis of fossil fuels occurring since the late 20th and early 21st centuries. From DF to the use of cyanobacteria and purple non-sulfur bacteria (PNSB), studies have focused on achieving higher bioH₂ yields that can compete with H₂ costs from traditional non-renewable fuels (Das and Veziroglu, 2008). In bioH₂ production by DF of organic wastes, several microbial groups that consume bioH₂ coexist with the H₂-producing microbes (Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo, 2009a). So, it is paramount to process feasibility to find techniques to inhibit the H₂-consuming microorganisms, such as the methanogenic

archaea to cite one of the most important groups. A variety of methanogenesis inhibitors have been reported: acetylene,

¹CINVESTAV-IPN, D.F., México

²ENCB-IPN, D.F., México

³UMAR, Puerto Angel, México

⁴ITBoca, Boca del Río, México

⁵ESIQIE-IPN, D.F., México

Corresponding author:

Héctor M Poggi-Varaldo, Environmental Biotechnology and Renewable Energies R and D Group, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., PO Box 14-740, México D.F. 07000, México.
Email: r4cepeg@yahoo.com

Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Rinderknecht-Seijas, N.F., Poggi-Varaldo, H.M. (2014) Energy analysis of in-series biohydrogen and methane production from organic wastes. Int J Hydrogen Energy. In press.

ARTICLE IN PRESS HE14186_proof ■ 30 June 2014 ■ 1/8

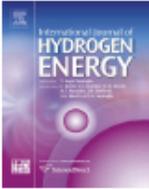
INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY XXX (2014) 1–8



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/he



Energy analysis of in-series biohydrogen and methane production from organic wastes

³ Carlos Escamilla-Alvarado^a, María Teresa Ponce-Noyola^b,
Héctor Mario Poggi-Varaldo^{d,*}, Elvira Ríos-Leal^c, Jaime García-Mena^d,
Noemí Rinderknecht-Seijas^e

^a Environmental Biotechnology and Renewable Energies R&D Group, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 Mexico D.F., Mexico

^b Microbial Genetics Group, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 Mexico D.F., Mexico

¹ ^c Analysis Central, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 Mexico D.F., Mexico

^d Dept. of Genetics and Molecular Biology, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, P.O. Box 14-740, 07000 Mexico D.F., Mexico

^e Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN, Mexico D.F., Mexico

ABSTRACT

Keywords:
Biohydrogen
Energetic analysis
Methane
Municipal organic solid wastes

Biohydrogen production has been coupled in some cases to other energy production technologies in order to overcome its modest energy gains. Anaerobic digestion, when used for methane recovery, has long been regarded as an energy recovery technology. We determined the energy potential from the coupling of either semi-continuous or batch hydrogen lab-scale bioreactors to a methanogenic stage. All processes were performed in solid substrate fermentation mode using the organic fraction of municipal solid wastes as first fed.

Semi-continuous reactors for hydrogen production, operated at 20.9% total solids, 21 d mass retention time and 55 °C, averaged 202 NmL H₂/kg_{swm}/d. In the batch hydrogen stage at 20.9% total solids, 50 h fermentation time and 55 °C, the hydrogen yield was 1200 mmol H₂/kg_{swm} and initial hydrogenogenesis rate was 68.3 mmol_{lit}/kg_{swm}/h. The methanogenic stage in semi-continuous performance at 18.4% total solids, 28 d mass retention time and 55 °C produced 2023 NmL CH₄/kg_{swm}/d.

Resultant energetic potentials (\dot{E}_p) were calculated from the theoretical combustion of the total hydrogen or methane produced by all the substrate fed to the process. \dot{E}_p for semi-continuous and batch hydrogenogenesis were 256 and 271 kJ/kg_{swm}, whereas for the methanogenic stage was 11,889 kJ/kg_{swm}. Correspondingly, energetic fluxes (E_p) were calculated from the theoretical combustion of the hydrogen or methane productivities. The E_p for semi-continuous and batch hydrogenogenesis were 2.55 and 24.1 kJ/kg_{swm}/d, whereas for the methanogenic stage was 80.3 kJ/kg_{swm}/d. Indeed, coupling of the methanogenic stage to either semi-continuous or batch hydrogenogenesis increased

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5747 3800x4324.

E-mail addresses: r4cepe@yahoo.com, hectorpoggi2001@gmail.com (H.M. Poggi-Varaldo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.077>

0360-3199/Copyright © 2014, Hydrogen Energy Publications, LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

11.3.2. Capítulos en libros

1. Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2013) Advances in biorefinery of organic wastes for the production of biofuels and holocellulolytic enzymes. In: R.R. Sirabian and R. Darlington (Editors), *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies-2013*, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. ISBN 978-0-9819730-7-4.
2. Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2013) Biohydrogen, an alternative energy from solid substrate batch fermentation of organic wastes: effects of temperature and nitrogen/alkalinity supplementation. In: R.R. Sirabian and R. Darlington (Editors), *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies-2013*, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. ISBN 978-0-9819730-7-4.
3. Escamilla-Alvarado, C., Vazquez-Barragan, J.A., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Poggi-Varaldo, H.M. (2011) A Novel Biorefinery Approach for Biofuels and Holocellulolytic Enzymes Production from Organic Wastes. In: H.V. Rectanus and R. Sirabian (Editors), *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies—2011*. International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (Reno, NV; June 27–30, 2011). ISBN 978-0-9819730-4-3, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. **Trabajo premiado como Best Student Paper.**
4. Muñoz-Páez, K.M., Robledo-Narváez, P., Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Poggi-Varaldo, H.M., Rinderknecht-Seijas, N., De Philippis, R. (2011) A review on biohydrogen from heterotrophic photofermentation. In: H.V. Rectanus and R. Sirabian (Editors), *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies—2011*. International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (Reno, NV; June 27–30, 2011). ISBN 978-0-9819730-4-3, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH.
5. Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2010) Capítulo 5, Incremento del rendimiento bioenergético de residuos sólidos urbanos con procesos acoplados H-M. In: E. Ríos-Leal, O. Solorza-Feria, H.M. Poggi-Varaldo (Editores), *Energías Renovables Biológicas – Hidrógeno – Pilas de combustible – II*. pp. 54 – 73. ISBN 978-607-00-3608-8, CINVESTAV, México, D.F.
6. Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2010) Capítulo 6, Evaluación del potencial de producción de enzimas usando sustratos provenientes de procesos bioenergéticos. In: E. Ríos-Leal, O. Solorza-Feria, H.M. Poggi-Varaldo (Editores), *Energías Renovables Biológicas – Hidrógeno – Pilas de combustible – II*. pp. 74 – 83. ISBN 978-607-00-3608-8, CINVESTAV, México, D.F.

11.3.3. Publicaciones en Congresos Internacionales

1. Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2013) Increased Energetic Potential of Biohydrogen Production from Organic Municipal Wastes through Coupled Methane Generation. XIII International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Julio 29 - Agosto 2, Aguascalientes, México. p. 458-468.
2. Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Barrera-Cortes, J., Esparza-García, F., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2013) Hydrogen production from organic wastes and re-use of fermented solids to produce holocellulases: a crucial combination for biorefinery of organic wastes. XIII International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Julio 29 - Agosto 2, Aguascalientes, México. p. 467-480.
3. Poggi-Varaldo, H.M., Robledo-Narváez, P.N., Muñoz-Paez, K.M., Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, T., Calva-Calva, G., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, Rinderknecht-Seijas, N.F., J., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, A. (2013) An overview of hydrogen fermentation, methane and bioelectricity as key contributions to biorefineries of organic wastes. XIII International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Julio 29 - Agosto 2, Aguascalientes, México. p. 505-526.
4. Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2012) Biohydrogen production through solid substrate fermentation of organic municipal wastes: a multivariable evaluation. 9th International Symposium on New Materials and Nano-

- Materials for Electrochemical Systems. XII International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Julio 9-13, Merida, México. p. 145 – 160.
5. Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2010) Effect of Mass Retention Times and Thermal Regime on the Performance of Series Hydrogenogenic-Methanogenic Process for Biofuels Production. *12th World Congress on Anaerobic Digestion*. Noviembre 1-4, Guadalajara, México.
 6. Escamilla-Alvarado, C., Esparza-García, F., Ríos-Leal, E., Hernandez-Vera, R., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2010) Gas Biofuels from Solid Substrate Hydrogenogenic-Methanogenic Fermentation of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *14th International Biotechnology Symposium*. Septiembre 14-18, Rimini, Italia.
 7. Escamilla-Alvarado, C., Esparza-García, F., Ríos-Leal, E., Perez-Avalos, O., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H. (2010) A contribution to biorefinery concept: Integration of enzyme production as a third stage after bioenergy production from two-stage anaerobic treatment of organic solid wastes. *14th International Biotechnology Symposium*. Septiembre 14-18, Rimini, Italia.
 8. Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2010) Energetic potential of two-stage hydrogenesis-methanogenesis fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *14th International Biotechnology Symposium*. Septiembre 14-18, Rimini, Italia.