



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Aplicación del principio de cascada a la corriente residual de la producción de
holocelulasas, dentro de un proceso de biorrefinería de sólidos urbanos, para
la obtención de bioenergía, enzimas y sacarificados”**

Tesis que presenta:

I.B.Q. Leticia Romero Cedillo

Para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directores de Tesis: **Dr. Héctor M. Poggi Varaldo y Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola**

México D.F. a 4 de Diciembre de 2015

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
AGRADECIMIENTOS.....	viii
RESUMEN.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Panorama del sector energético actual y de los residuos municipales en el mundo	10
1.2 Potencial de los residuos como fuente de energía renovable	10
1.3 Concepto de biorrefinería.....	12
1.3.1. Clasificación de las biorrefinerías	13
1.3.2. Los principios de una biorrefinería	14
1.3.3. Principio de sustentabilidad y amigable con el medio ambiente.....	15
1.3.4. Principio de cascada	15
1.4. Producción de biohidrógeno a partir de la FORSU.....	16
1.5. Importancia de la integración de los pretratamientos en biorrefinería.....	20
1.5.1 Clasificación de los pretratamientos	20
1.5.1.1. Pretratamiento alcalino.....	20
1.5.1.2. Pretratamiento ácido diluido.....	22
1.5.1.3. Pretratamiento organosolv	23
1.5.1.5. Pretratamientos físico-químicos.....	25
1.5.1.6. Pretratamiento mecánico	26
1.5.1.7. Pretratamiento por explosión con vapor	28
1.6. Perspectivas de los pretratamientos aplicados a una biorrefinería a partir de la FORSU	32
1.7. Biorrefinería H-M-Z-S a partir de residuos sólidos urbanos.....	33
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	35
3.1 Hipótesis particulares	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivos particulares.....	36
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	37
5.1. Plan de trabajo	37
5.2. Descripción de actividades.....	38

5.2.1. Actividad 1. Arranque y operación de reactor inoculadores.	38
5.2.1.1. Propósito	38
5.2.1.2. Diseño experimental.....	38
Obtención de inóculo metanogénico	38
5.2.1.3. Análisis y seguimiento	39
5.2.1.4. Métodos y procedimientos	40
Montaje de reactores metanogénicos	40
Recolección y preparación del inóculo metanogénico	40
Recolección y preparación de la FORSU	41
Medición de pH y alcalinidad.....	41
Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y ceniza.....	42
Cuantificación de ácidos orgánicos volátiles.....	42
Determinación de nitrógeno total	43
Desplazamiento de biogás	43
Cuantificación de metano por cromatografía de gas	44
Determinación de celulosa	44
5.2.2. Actividad 2. Producción de hidrógeno por sistema en lote a partir de FORSU.	45
5.2.2.1. Propósito	45
5.2.2.2. Diseño experimental.....	45
5.2.2.3. Análisis y seguimiento.....	46
5.2.2.4. Métodos y procedimientos	47
5.2.3. Actividad 3. Obtención de holocelulasas empleando la cepa <i>Trichoderma reesei</i> MCG 80 y sólidos fermentados residuales de la producción de hidrógeno.	47
5.2.3.1. Propósito	47
5.2.3.2. Diseño experimental.....	48
5.2.3.3. Análisis y seguimiento.....	48
5.2.3.4. Métodos y procedimientos	49
Propagación de inóculo.....	49
Producción de holocelulasas con sólidos fermentados	50
5.2.4. Actividad 4. Pretratamiento de la corriente residual Xz para la selección del mejor método en función de la degradabilidad de celulosa y contenido de lignina.	51
5.2.4.1. Propósito	51
5.2.4.2. Diseño experimental.....	51
5.2.4.3. Análisis y seguimiento.....	52
5.2.4.4. Métodos y procedimientos	52
5.2.5. Actividad 5. Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de los sólidos residuales pretratados de la corriente Xz.	53
5.2.5.1. Propósito	53
5.2.5.2. Diseño experimental.....	53

5.2.5.3. Análisis y seguimiento.....	54
5.2.5.4. Métodos y procedimientos	55
5.2.6. Actividad 6. Producción de sacarificados empleando sólidos residuales pre-tratados de Xz como sustrato.....	55
5.2.6.1. Propósito	55
5.2.6.2. Diseño experimental.....	56
5.2.6.3. Análisis y seguimiento.....	56
5.2.6.4. Métodos y procedimientos	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
6.1. Actividad 1. Arranque y operación de digestores anaerobios metanogénicos inoculadores	57
.....	58
6.1.1. Evolución del pH y alcalinidad	59
.....	59
6.1.2. Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y ceniza.....	60
6.1.3. Cuantificación de ácidos orgánicos volátiles en reactor inoculador termofílico.....	60
6.1.4. Determinación de nitrógeno total	61
6.1.5. Cuantificación de metano por cromatografía de gas	63
6.2. Actividad 2. Producción de hidrógeno por sistema en lote a partir de FORSU.....	64
6.3. Actividad 3. Obtención de holocelulasas empleando la cepa <i>Trichoderma reesei</i> MCG 80 y sólidos fermentados residuales de la producción de hidrógeno.	65
6.4. Actividad 4. Pretratamiento de la corriente residual Xz para la selección del mejor método en función de la degradabilidad de celulosa y contenido de lignina.....	68
6.5. Actividad 5. Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de los sólidos residuales pretratados de la corriente Xz.	71
6.6. Actividad 6. Producción de sacarificados empleando sólidos residuales pretratados de Xz como sustrato.....	73
7. CONCLUSIÓN.....	74
8. Referencias	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las biorrefinerías con base al tipo de tecnología	14
Tabla 2. Clasificación de las biorrefinerías con base en el tipo de materia prima utilizada.....	14
Tabla 3. Pretratamientos termoquímicos aplicados a distintos residuos, efecto sobre la producción de biohidrógeno y biometano.	24
Tabla 4. Resultados de pretratamientos fisicoquímicos evaluados en varios sustratos, y su efecto sobre la fermentación oscura.	27
Tabla 5. Pretratamientos enzimáticos evaluados en diferentes residuos orgánicos, y efecto sobre la producción de biocombustibles.....	31
Tabla 6. Programa de seguimiento y análisis de reactores inoculadores metanogénicos.	38
Tabla 7. Frecuencia de análisis y seguimiento durante la operación hidrogenogénica	46
Tabla 8. Condiciones para las determinaciones enzimáticas	48
Tabla 9. Composición del medio mineral para <i>Trichoderma reesei</i> MCG 80	49
Tabla 10. Composición del medio Mandels (5x)	50
Tabla 11. Pretratamientos aplicados a la FORSU y a la corriente Xz	51
Tabla 12. Programa de análisis y seguimiento de las muestras pretratadas.	52
Tabla 13. Composición para cada reactor hidrogenogénico, empleando distinta carga de alimentación con FORSU y sólidos Xz pretratados con NaOH 1M.....	54
Tabla 14. Frecuencia de análisis y seguimiento para la producción de hidrógeno en reactores por lote tipo FASSH-VI utilizando los sólidos pretratados como carga inicial.....	54
Tabla 15. Condiciones de operación y parámetros a evaluar durante la sacarificación del residuo Xz pretratado, utilizando holocelulasas de <i>T. reesei</i> MCG 80.	55
Tabla 16. Cuantificación de azúcares liberados durante la sacarificación enzimática a partir de holocelulasas de <i>T. reesei</i> MCG 80.	55
Tabla 17. Análisis proximal de sólidos en el reactor inoculador termofílico.	60
Tabla 18. Valores obtenidos a partir de la cinética de crecimiento y producción de celulasas con <i>T. reesei</i> MCG 80 y sólidos fermentados como sustrato.	67
Tabla 19. Análisis proximal a partir de muestras de sólidos de cada tratamiento en la etapa inicial de la producción de hidrógeno en reactor por lote FASSH-VI.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición global de los residuos sólidos	11
Figura 2. Pasos de biodegradación de la materia orgánica, formación de metabolitos y rutas microbiológicas involucradas en la fermentación de residuos	19
Figura 3. Productos de degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina, por efecto de la hidrólisis térmica.....	28
Figura 4. Diagrama de corrientes de la biorrefinería H-M-Z-S.....	34
Figura 5. Plan de trabajo	37
Figura 6. Resumen de operación metanogénica y obtención de inóculo	39
Figura 7. Resumen de la operación hidrogenogénica	46
Figura 8. Preparación del inóculo mixto y digestores anaerobios metanogénicos.....	58
Figura 9. Evolución de la alcalinidad y pH en el reactor inoculador metanogénico.....	59
Figura 10. Contenido de ácidos orgánicos volátiles en el reactor inoculador operado en régimen termofílico.	61
Figura 11. Evolución del contenido de Nitrógeno total Kjeldhal en el reactor inoculador.....	62
Figura 12. Desplazamiento de biogás promedio en el reactor metanogénico operado a 55°C hasta un TRM 50d.....	63
Figura 13. Producción de metano con respecto al tiempo en el reactor metanogénico bajo régimen termofílico 55°C con alimentación semi-continua hasta un TRM 50 d.	64
Figura 14. Producción de ácidos orgánicos volátiles en fermentación oscura por lote a partir de FORSU	65
Figura 15. Actividad enzimática específica de celulasas (mediante ensayo en papel filtro) obtenidas en cultivo sumergido utilizando <i>Trichoderma reesei</i> MCG 80, empleando distintos sustratos como fuente de carbono.....	66
Figura 16. Actividad xilanasa de <i>T. reesei</i> MCG 80, a partir de cultivos sumergidos con distinta fuente de carbono.....	66

Figura 17. a) Actividad volumétrica de FPasa, a partir de cultivos sumergidos con <i>T. reesei</i> MCG 80, utilizando sólidos fermentados 3% (p/v). b) Actividad específica de FPasa, obtenida bajo las condiciones antes descritas.	67
Figura 18. Contenido de celulosa en FORSU y otras corrientes derivadas de la biorrefinería. SF: Sólidos fermentados; Xz: residuos sólidos de etapa Z, así como esta fracción sometida a pretratamientos.	68
Figura 19. Efecto del tipo de pretratamiento sobre la remoción de lignina, en muestras de Xz.	69
Figura 20. Imágenes de SEM (Microscopía electrónica de barrido), a las fibras del residuo Xz antes de ser pretratadas.	69
Figura 21. Imágenes correspondiente a la fracción Xz después del pretratamiento con NaOH 1M.	70
Figura 22. Fibras de Xz vistas desde el microscopio electrónico de barrido, después de ser pretratadas con Na ₂ CO ₃ 1M.	70
Figura 23. Imágenes de las muestras de Xz después de ser sometidas a un pretratamiento ácido diluido con HCl 1.5%.	71
Figura 24. Producción de hidrógeno en lote tipo FASSH-VI, empleando sólidos Xz pretratados con NaOH 1M como sustrato.	736
Figura 25. Efecto de la concentración de enzima (FPasa (U/mL) y de sustrato Xz, pretratado con NaOH 1M, durante 48 h de sacarificación a 50 °C, empleando el extracto concentrado de celulasas de <i>T. reesei</i> MCG 80.	73

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Leticia y Ricardo por su apoyo, confianza y amor incondicional a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Cecy y Ricky, por su cariño, complicidad y los ánimos a pesar de la distancia.

A mi familia, por el abrigo que siempre me han brindado y sus palabras de aliento.

A mis amigos Javier, Luz, Karla, Enrique, Carlos, Lili y Perla, por su cariño sincero, apoyo constante y por compartir momentos buenos y difíciles que le dan sentido a los días.

A mis amigos de generación Sara, Fer, Laura, Pool, Citla, Andrés, Moni, Fanny, Azu, Anamarel, Anlui y Jesús, por estar unidos a pesar de no vernos a diario.

Al Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo, por la oportunidad de ingresar al GBAER, compartir a diario sus conocimientos y experiencias de vida, y por hacer siempre un esfuerzo más del necesario con cada alumno.

A la Dra. Ma. Teresa Ponce-Noyola, por su apoyo académico, consejos profesionales y personales, y por su capacidad de organización.

A la maestra Elvira Ríos Leal, por su cariño y apoyo invaluable durante el trabajo.

A mi comité tutorial por su buena disposición y asesoría académica a lo largo del tiempo.

A los alumnos de estancia (Maryori, Jaqueline, Ernesto y Martín), por su ayuda con las mediciones y análisis, en parte del trabajo experimental.

Al CINVESTAV por darme la oportunidad de iniciar una nueva etapa.

Al CONACYT por otorgarme la beca #369317, para la realización de estudios de posgrado.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de pretratamientos alcalinos y ácidos, sobre la corriente residual Xz, para aumentar la disponibilidad de celulosa y la remoción de lignina. En este sentido, El tratamiento alcalino con NaOH 1M, resultó el más favorable al remover la mayor cantidad de lignina y mejorar la disponibilidad de celulosa, en los sólidos pretratados Xz. Hubo una disminución, en el contenido de lignina al pasar de 17% al 6%, posterior al pretratamiento. Lo anterior está relacionado, a un mayor desempeño en una fermentación oscura, en la que se generaron 3 ciclos de producción de hidrógeno, con una parte de los sólidos pretratados Xz. De igual forma, se determinó que esta fracción Xz al ser utilizada como sustrato en una sacarificación, produce xilosa misma que puede ser fermentada o utilizada como sustrato para un tipo de microorganismos que puedan asimilar pentosas. Aunque se presentó una cantidad ligera de azúcares reductores (1.4 g/L), vale la pena evaluar con más detalle, la obtención de xilosa y otros oligosacáridos, para implementar nuevas etapas funcionales dentro de la biorrefinería H-M-Z-S.

ABSTRACT

In the present work, it was evaluated the effect of alkaline and dilute acid pretreatments on the residual stream Xz, with the aim to increase the availability of cellulose and the removal of lignin. In this sense, the alkaline pretreatment was more effective in the removal of lignin and the improved of cellulose content. Lignin was decreased, from 17% to 6%, after the pretreatment. The above is related to a better performance on dark fermentation, in what generated up to 3 cycles of hydrogen production, using a percentage of Xz pretreated. Furthermore, it was determined that this fraction Xz, used as a substrate in saccharification, produced xylose which could be fermented or added as a feedstock combined with microorganisms that can assimilate pentoses. Although, it was a low concentration of reducing sugars (1.4 g/L), it worth to evaluate the production of xylose and other oligosaccharides, to implement new functional stages inside the H-M-Z-S biorefinery.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama del sector energético actual y de los residuos municipales en el mundo

En los países miembros de la OCDE, el biogás ocupa el tercer lugar dentro de las fuentes renovables de mayor crecimiento para la generación de energía eléctrica. Ésta pasó de 13.1 TWh en el año 2000 a 47.6 TWh en 2011, con una tasa de crecimiento medio anual del 13%. Del total de electricidad que se genera en el mundo (43.6 TWh en 2010), Alemania es el país que tuvo una mayor participación (37.3%) en el uso de biogás como fuente de generación para la energía eléctrica, produciendo 16.2 TWh, siendo el mayor productor de la OCDE; seguido por Estados Unidos con el 22.4%, es decir, 9.8 TWh del total generado a nivel mundial. En tercer lugar está Reino Unido, con el 13.1% (5.7 TWh), e Italia en el cuarto, con 4.6% (2 TWh).

Durante el año 2011, los rellenos sanitarios para captura de metano en los Estados Unidos produjeron 14.3 TWh de electricidad, suficiente para suministrar a más de 1 millón de hogares. Además, las plantas comerciales de biogás a partir de explotaciones ganaderas generaron más de 0.5 TWh eléctricos en ese mismo año. En México, se generan alrededor de 28.2 millones de toneladas por año en los rellenos sanitarios y el 53% de su composición, corresponden a residuos orgánicos (SENER, 2012).

1.2 Potencial de los residuos como fuente de energía renovable

La biomasa es considerada una de las principales fuentes de energía renovable ya que está en gran disponibilidad al provenir de desechos agrícolas, residuos forestales, de la industria del papel, estiércol de animales, materia orgánica municipal y subproductos de alimentos procesados. Se estima que para el año 2050, la biomasa puede proveer hasta en un 38% la demanda de combustibles en el mundo, y hasta un

17% de la electricidad (Demirbas, 2010).

Con respecto al potencial energético, la biomasa total del planeta se estima que generaría 65 TW, y apenas se aprovecha un 6.32%. Este último dato corresponden a 1.33 TW que se derivan del aprovechamiento de desechos de alimento y 1.28 TW empleando biomasa de residuos de madera. Se espera que la eficiencia en su uso, alcance el 12.3% para el año 2050 (Zhang, 2013). En un proceso de biorrefinería, se emplean distintos tipos de biomasa y se consideran además factores como como las condiciones climáticas, la ubicación, entorno socioeconómico y hasta las políticas del gobierno (Ghatak, 2011).

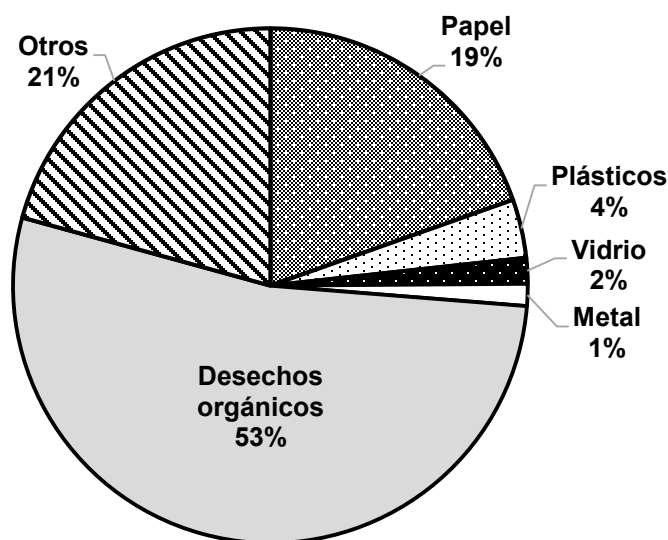


Figura 1. Composición global de los residuos sólidos (Darieh et al., 2011).

Algunos ejemplos de biomasa empleados en biorrefinería son los residuos agrícolas, recursos forestales, desechos urbanos e industriales y algas. Otros estudios incluyen: algas verde azules, *Chlorella vulgaris*, residuos de cítricos, desechos lácteos, desechos de alimentos, cultivos energéticos, glycerol, *jatropha*, lignin, microalgas,

Miscanthus, residuos municipales, residuos orgánicos, arroz, algas, bagazo de caña, pastos de rápido crecimiento y trigo. Una gran ventaja es que la disponibilidad de estos recursos no representa un problema, pues se estiman 1.3×10^9 ton/año de material lignocelulósico (Kajaste *et al.*, 2014). Un aspecto importante a considerar son las propiedades químicas y físicas de la biomasa que dependen de su estructura molecular, misma que determinará hasta cierto punto el tipo de proceso en el que se puede utilizar para determinado biocombustible o subproductos. La biomasa se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina y una pequeña cantidad de extractivos, que varían dependiendo de su origen (Bridgewater, 1999). La celulosa es un polímero de moléculas de glucosa que constituyen el principal componente de la biomasa (40-50% de su peso), así como la hemicelulosa (20-40%). Esta última se une a la celulosa y existe en la pared celular de plantas; éste polisacárido se compone de glucosa, manosa, xilosa, arabinosa y ácido galacturónico. Por su parte la lignina es un polímero aromático que se encuentra en forma ramificada y con mayor presencia en residuos de madera; está adyacente a las fibras de celulosa y forma un complejo ligninocelulósico. Un ejemplo de residuo rico en celulosa es el bagazo de caña, cuyo contenido de celulosa fluctúa entre el 40-50%, hemicelulosa del 20-30%, la lignina 20-30% y un contenido de cenizas del 1.5-3% (Saxena, 2009). Los desechos agroindustriales así como la fracción orgánica de residuos sólidos municipales (principal desecho en los rellenos sanitarios), son materia prima disponible con un gran potencial para ser transformados a productos de valor agregado mediante un esquema de biorrefinería.

1.3 Concepto de biorrefinería

Una biorrefinería es un proceso paralelo al de una refinería de petróleo, en el sentido

de que se pueden obtener productos químicos, biocombustibles y precursores de otros compuestos a partir de la misma materia prima, dentro de un proceso integrado. En años recientes, la investigación en este campo se ha enfocado en desarrollar biocombustibles, sin embargo ha tomado importancia la obtención de otro tipo de productos de valor agregado como enzimas, aminoácidos, solventes, ácidos orgánicos y otros compuestos de interés industrial (Ekman *et al.*, 2013). En un proceso de biorrefinería, se generan al mismo tiempo biocombustibles, químicos de valor agregado, calor y electricidad; es importante señalar que para que la eficiencia de un proceso sea mayor, es necesario reducir las etapas de refinamiento de los productos y reutilizar el calor que se libera para integrarlo nuevamente al sistema (Demirbas, 2010).

1.3.1. Clasificación de las biorrefinerías

Las biorrefinerías pueden clasificarse en base a su forma de producción como de primera, segunda, tercera (estas dos llamadas también biorrefinerías avanzadas) y las de cuarta generación (Tabla 1). Las biorrefinerías de primera generación, se refieren a aquellas que producen biocombustibles a partir de azúcares, almidón, vegetales, o grasas animales utilizando tecnología convencional.

Las biorrefinerías de segunda generación, emplean en sus procesos materia prima que no procede de un cultivo destinado a alimentación; por ejemplo, utilizan paja de trigo, rastrojo de maíz o madera. Los azúcares y vegetales son convertidos a alcoholes y biodiesel en una biorrefinería de primera generación. A diferencia de esta, en las biorrefinerías avanzadas, se emplean residuos como el bagazo de caña y la paja de arroz. (Demirbas, 2010).

Tabla1. Clasificación de las biorrefinerías con base al tipo de tecnología

Generación	Materias primas	Ejemplos
Primera generación	Azúcar, almidón, aceites vegetales, grasas animales	Bio-alcoholes, aceite vegetal, biodiesel, biogás
Segunda generación	Paja de trigo, rastrojo de maíz, residuos sólidos, cultivos energéticos	Bio-alcoholes, bio-aceites, biohidrógeno, diésel
Tercera generación	Algas	Aceites vegetales, biodiesel
Cuarta generación	Aceite vegetal, biodiesel	Bio-gasolina

También pueden agruparse de acuerdo a las características o la naturaleza de la materia prima que utilizan en sus procesos, en la Tabla 2, se muestra ejemplos de acuerdo a este esquema de clasificación.

Tabla 2. Clasificación de las biorrefinerías con base en el tipo de materia prima utilizada

Tipo de biorrefinería	Materia prima	Productos
Biorrefinería verde	Hierbas y plantas verdes	Etanol
Biorrefinería de cereales	Cultivos ricos en almidón, cultivos de azúcar y granos	Bioetanol
Biorrefinería de aceites	Cultivos y plantas oleaginosas	Aceites vegetales y biodiesel
Biorrefinería de bosques	Residuos de cosecha forestal, cortezas, aserrín, licores negros y fibras	Combustibles, energía, químicos y materiales
Biorrefinería de lignocelulosa	Desechos agrícolas, residuos de cosechas, residuos de madera, desechos orgánicos industriales	Etanol lignocelulósico, bio-aceites y productos gaseosos.

1.3.2. Los principios de una biorrefinería

Básicamente, se fundamentan en dos principios, el de sustentabilidad y el principio de cascada. Existen otros principios que respaldan los aspectos ambientales y de ética, como son el de huella de carbono neutral y el principio de no conflicto entre bioenergía-alimentos, respectivamente (Poggi-Varaldo *et al.*, 2014). En esta sección se abordan los principios elementales de sustentabilidad y el principio de cascada.

1.3.3. Principio de sustentabilidad y amigable con el medio ambiente

Estos conceptos están relacionados a las actividades antropogénicas actuales, su desarrollo y progreso. La sustentabilidad se refiere a la capacidad que se tiene para cubrir las demandas actuales de la población, sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para cubrir sus necesidades. Por otro lado, se dice que un proceso es amigable ecológicamente cuando tiene el menor impacto posible sobre el medio ambiente, para lo cual es necesario hacer una valoración del mismo; una herramienta comúnmente utilizada es el análisis de ciclo de vida (LCA, Life Cycle Assessment), que sirve para evaluar la relación costo-beneficio de los procesos en términos ambientales.

1.3.4. Principio de cascada

Consiste en el uso de residuos orgánicos como materia prima de inicio en procesos secuenciales para maximizar el rendimiento de los productos y ganancias. Son dos vertientes que se distinguen: el principio de cascada tradicional directo y el principio de cascada inverso.

En el primer caso, los residuos orgánicos son primero utilizados para generar bio-productos de valor agregado. Después de esto, los residuos remanentes de los procesos son sometidos a una etapa posterior donde se genera bioenergía.

Cuando se sigue el principio de cascada inverso, los residuos orgánicos son empleados para producir bioenergía, posteriormente se generan productos de valor agregado y finalmente se canalizan los sólidos remanentes hacia la obtención de más bioenergía.

1.4. Producción de biohidrógeno a partir de la FORSU

En años pasados, la investigación en energías renovables ha estado orientada en el desarrollo de nuevas tecnologías involucradas en la digestión anaerobia de los residuos orgánicos. Dentro de las posibles alternativas energéticas, el hidrógeno es el combustible más limpio pues es libre de carbono, al generar solo agua como producto final de su combustión (Kotay & Das, 2008). Su utilización podría ayudar a direccionar la problemática del calentamiento global y contribuir a disminuir la problemática de la contaminación. Además, es preferido como biocombustible a diferencia del metano, debido a sus amplias aplicaciones industriales, por ejemplo es utilizado en la síntesis de amoníaco, la hidrogenación de aceites comestibles, petróleo y carbón (Kothari *et al.*, 2012). Resulta atractivo también el hecho de poder utilizarse de forma directa en motores de combustión, debido a su alta energía, por ejemplo 143 GJ/Ton, y también puede generar electricidad por medio de sistemas de celdas de combustible (Alves *et al.*, 2013). Uno de los principales retos para la aplicación de este biocombustible, es la implementación de un proceso sustentable para su producción y almacenamiento, pues actualmente se emplea energía fósil para poder obtenerla mediante procesos de electrólisis o reformación por vapor (Balat *et al.*, 2008). Por lo anterior, el uso de energía intensiva los convierte en procesos poco atractivos y sustentables desde el punto de vista ambiental; es por esto que los sistemas de producción de hidrógeno, deben minimizar las emisiones de CO₂. Una de las alternativas más viables, es por medio de métodos biológicos requieren de menor energía intensiva, por lo que resultan más amigables con el entorno; además este tipo de procesos, se basan en el aprovechamiento de la biomasa de bajo costo, como son los residuos agrícolas, municipales y el agua residual (Kotay & Das, 2008). El biohidrógeno puede producirse

mediante microorganismos autótrofos o heterótrofos, en el primer caso, las reacciones son mediadas por microorganismos fotosintéticos, por ejemplo las microalgas, algunos protistas y bacterias fotosintéticas (Li *et al.*, 2007). Bajo condiciones heterotróficas, los sustratos orgánicos son transformados a compuestos orgánicos simples, con la generación simultánea de hidrógeno. Existen dos tipos de conversión heterotrófica, la fotofermentación, realizada por bacterias fotosintéticas, y la fermentación oscura, en la que las bacterias anaerobias convierten los carbohidratos en biohidrógeno (Das, 2008).

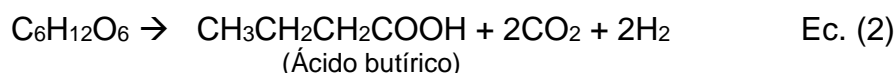
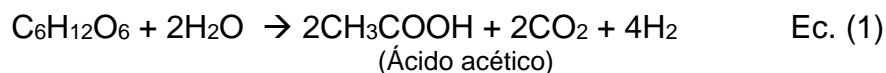
En la fermentación oscura, los carbohidratos son hidrolizados de forma anaerobia por los microorganismos anaerobios facultativos. El H₂ molecular es producido debido al exceso de electrones mediante la actividad de la hidrogenasa. Bajo ambientes anaerobios, los protones pueden actuar como aceptores de electrones y neutralizar a su vez los electrones generados por la oxidación de sustratos orgánicos, con la consecuente producción de H₂ en contraste con la respiración aerobia, en donde el oxígeno es reducido y se obtiene agua como producto final (Wang *et al.*, 2009).

En la fermentación oscura de la glucosa, como sustrato modelo, las bacterias productoras de hidrógeno inicialmente convierten la glucosa a piruvato, mediante la ruta metabólica de la glucólisis, produciendo ATP (adenosin trifosfato) a partir de adenosin difosfato (ADP) y del NADH (Dinucleótido de nicotinamida reducido). El piruvato es oxidado más adelante a acetil coenzima A (acetyl-CoA), dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno, por la enzima ferredoxin oxidoreductasa e hidrogenasa. Dependiendo del tipo de microorganismo y las condiciones ambientales, el piruvato además puede convertirse a acetil-CoA y formato, que más adelante es convertido en H₂ y CO₂. Además, el acetil-CoA puede ser convertido a acetato, butirato y etanol (Li

et al., 2007). La fermentación oscura de carbohidratos complejos mediante la microbiota anaerobia, puede derivar en un amplio rango de intermediarios y bio-productos dependiendo de los parámetros operacionales, como son el tipo y la carga de sustrato, pH, temperatura y otras condiciones ambientales que pueden llegar a influenciar la estructura de la comunidad microbiana en los biorreactores. En la figura 2, se esquematizan los pasos que ocurren para la degradación de los compuestos orgánicos que conforman a la biomasa.

Las rutas bioquímicas (Figura 2), pueden ser llevadas a cabo por los anaerobios estrictos (*Clostridia*, metilótrofos, bacterias del rumen, bacterias metanogénicas, archaeas), anaerobios facultativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), e incluso algunos aerobios como (*Alcaligenes* y *Bacillus*).

El acetato y butirato son los productos más comunes de la fermentación oscura. Las reacciones bioquímicas que realizan los anaerobios facultativos son:



Cuando en la ruta metabólica se favorece la formación de ácido acético, la relación estequiométrica por cada mol de H_2 es de 4 moles por cada mol de glucosa, por ejemplo 544 mL de H_2/g de hexosa, de acuerdo a la ecuación 1. Mientras que el rendimiento de H_2 es de 2 mol por cada mol de glucosa (por ejemplo, 272 mL H_2/g de hexosa), cuando el producto final es ácido butírico, según la ecuación 2 (Ghimire et al., 2015).

Algunos microorganismos afectan los rendimientos de hidrógeno por lo que son indeseables en el proceso de fermentación oscura, pues algunos consuen hidrógeno

o bien generan desviaciones en la ruta metabólica. Entre los principales consumidores de hidrógeno se encuentran los metanógenos, bacterias homoacetogénicas y las bacterias sulfatoreductoras (BSR). La actividad de estos microorganismos consumidores de H_2 puede reducirse mediante el pretratamiento del inoculo o controlando las condiciones de operación del biorreactor (Guo *et al.*, 2010). Otra forma de disminuir la actividad de metanógenos y consumidores de hidrógeno, es mediante el mantenimiento a pH cercano a 6, además del tiempo de retención hidráulico; sin embargo, debido a la complejidad de los consorcios microbianos, la fermentación oscura se puede ver afectada de igual forma por otros factores como son el tipo de sustrato, el pretratamiento del mismo, el tipo de inóculo, el método de enriquecimiento del inóculo, así como el diseño y la operación del reactor (Zhang *et al.*, 2007).

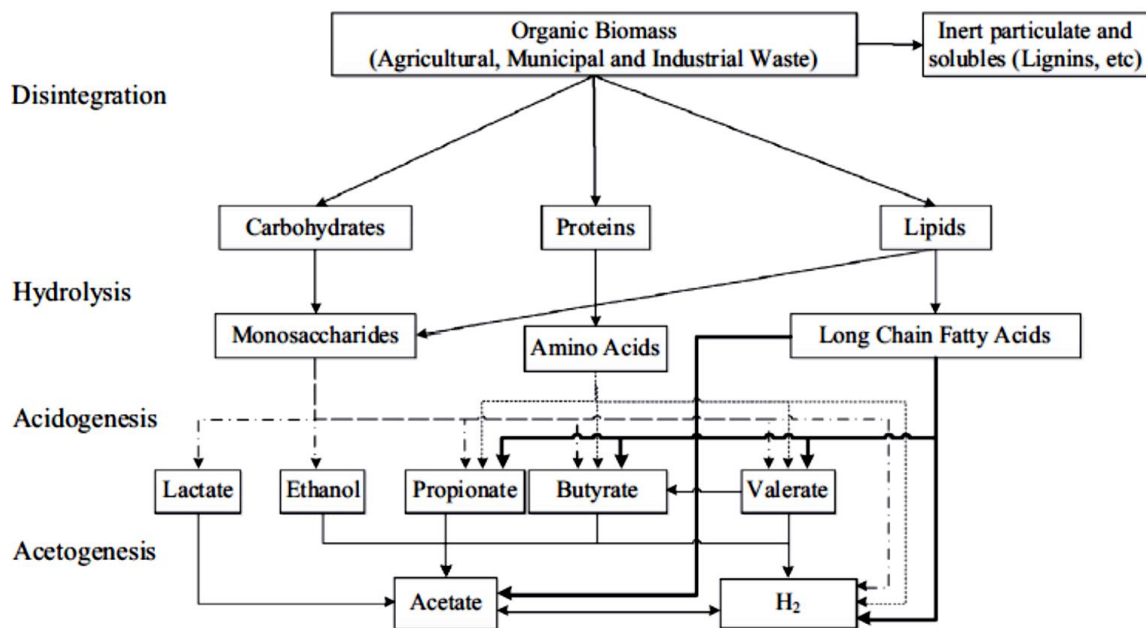


Figura 2. Pasos de biodegradación de la materia orgánica, formación de metabolitos y rutas microbiológicas involucradas en la fermentación de residuos (Tomado de Ghimire *et al.*, 2015).

1.5. Importancia de la integración de los pretratamientos en biorrefinería

Uno de los factores con mayor efecto sobre el rendimiento de hidrógeno, durante la fermentación oscura es el sustrato, el alto contenido de carbohidratos y su disponibilidad, están relacionadas con la tasa de degradación de la materia prima (Ren *et al.*, 2011). Las investigaciones en esta área han explorado una variedad de sustratos o biomasa de distinta composición, a fin de evaluar y obtener mejores rendimientos tanto en glucosa, como en otros productos de valor agregado. Otras vertientes, se han enfocado en mejorar la disponibilidad de la biomasa por medio de pretratamientos que principalmente, favorecen la degradación de residuos lignocelulósicos (Mussoline *et al.*, 2012). En la siguiente sección, se describen pretratamientos convencionalmente utilizados para este propósito y que han mejorado los rendimientos tanto en la producción de hidrógeno y metano, así como otros compuestos de interés comercial y biotecnológico.

1.5.1 Clasificación de los pretratamientos

Los pretratamientos, convencionalmente se clasifican en tres grupos: termoquímicos, físicoquímicos y biológico o enzimáticos. En los párrafos siguientes se describen los métodos que son más utilizados para el acondicionamiento de distintos residuos o biomasa diversa.

1.5.1.1. Pretratamiento alcalino

Algunos pretratamientos son relativamente efectivos para la solubilización de residuos, con respecto a su eficiencia, los mejores resultados obtenidos se han presentado con tratamientos a base de NaOH, KOH y posteriormente los tratamientos que emplean álcalis como $Mg(OH)_2$ y $Ca(OH)_2$. Sin embargo, las altas concentraciones de sodio y

potasio, pueden promover la inhibición de metano, durante la digestión anaerobia. Este tratamiento es por lo general, combinado con un pretratamiento térmico; en trabajos anteriores, se ha reportado que hay un aumento considerable de metano durante procesos en lote, en los que se han llegado a obtener hasta 310 L/Kg SV_{in}, lo cual representa un aumento del 88% si se compara con el proceso control, en el que solo se generan 165 L/KgSV_{in} (Liu *et al.*, 2012). En otros estudios, se ha encontrado que la aplicación de un pretratamiento alcalino a los lodos activados, mejoraron la solubilización de la materia orgánica y favoreció el potencial bioquímico del metano, para la co-digestión de desechos orgánicos municipales durante la digestión anaerobia; Heo *et al.*, 2003, determinaron que la adición de 45 meq NaOH/L, bajo condiciones termofílicas (55 °C), incrementó en un 88% la producción de metano, al obtener 310 mLCH₄/g SV durante 20 días de operación. Una de las ventajas de los tratamientos alcalinos, es la remoción del ácido urónico, el cual actúa como inhibidor enzimático de celulasas durante la sacarificación; otro punto favorable, es el aumento en la biodegradabilidad de la pared celular de las plantas, debido al rompimiento de los enlaces entre la lignina unida a la celulosa y hemicelulosa (Gupta *et al.*, 2011). Aunque resulta ser un pretratamiento económico, los métodos alcalinos presentan algunas desventajas como la difícil separación y la remoción de sales que se forman en el proceso, además se requieren de tiempos de operación largos y un mezclado constante. En algunos casos, es necesario un paso adicional para neutralizar y remover la lignina y compuestos inhibidores (Menon *et al.*, 2012).

1.5.1.2. Pretratamiento ácido diluido

Aunque la aplicación de ácidos concentrados ha resultado altamente efectiva sobre la hidrólisis de celulosa, también es extremadamente corrosiva, tóxica y peligrosa. Además, después de su pretratamiento, se requiere de una recuperación de ácido por lo que el proceso se vuelve más costoso. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de operación, el pretratamiento ácido diluido llega a hidrolizar del 85% hasta el 100% de la hemicelulosa y se obtienen azúcares como la xilosa, galactosa y arabinosa, por lo que resulta atractivo (Zheng *et al.*, 2014) (Vasconcelos *et al.*, 2013). Uno de los obstáculos que se presentan en estos tipos de pretratamientos, es que al aumentar la concentración de ácido o elevar la temperatura, hay incremento de los compuestos inhibidores, por ejemplo furanos y compuestos fenólicos, que dañan a los microorganismos fermentativos (Lin *et al.*, 2015). Los ácidos más evaluados en pretratamientos, son el ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico, ambos presentan una buena eficiencia de hidrólisis y por consiguiente una alta actividad catabólica. A pesar del efecto negativo que causan, debido a la formación de sustancias tóxicas, se han encontrado resultados interesantes durante la fermentación oscura para producción de biohidrógeno, por ejemplo, los desechos de comida que han sido sometidos al pretratamiento ácido a un pH de 1.0, produjeron 20 veces más hidrógeno (89.5 mL H₂/gSV contra 4.4 mL de H₂/gSV) con respecto a los residuos sin pretratar (Kim *et al.*, 2009). Es así como el pretratamiento permite hidrolizar la celulosa y hemicelulosa, para liberar azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos solubles, haciendo más eficiente la digestión anaerobia al acortar periodos (Cheng *et al.*, 2015). Con respecto a otros pretratamientos, como por ejemplo los biológicos, el tratamiento ácido diluido

es más atractivo al no requerir de un complejo enzimático que lleve a cabo la degradación completa de oligosacáridos, pues necesitan de varias enzimas, entre ellas las endoxilanasas, exosilanasas y β -xilosidasas, para poder atacar la estructura compleja de la hemicelulosa. Es interesante señalar que se han obtenido mejores rendimientos de hidrógeno al utilizar residuos orgánicos pretratados con HCl 1N, para la producción de este gas, en los que se ha mejorado hasta en un 615%, al obtener hasta 86 mL H₂/gSV, comparado con 6.99 mL H₂/gSV que se producen en residuos orgánicos sin pretratar (Ruggeri & Tommasi, 2012). Otros productos que resultan de la degradación de monosacáridos son el furfural, generado a partir de la hidrólisis de pentosas, y el HMF (Hidroximetil furfural), que se derivan de la ruptura de hexosas, el HMF es convertido finalmente a ácido fórmico o ácido levulínico; sin embargo, para tener una eficiente recuperación de azúcares, es necesario un proceso de optimización, por lo que las condiciones operacionales deben ser evaluadas de acuerdo a la composición de la materia prima y concentración del catalizador (Duarte *et al.*, 2009).

1.5.1.3. Pretratamiento organosolv

En este proceso, originalmente los solventes orgánicos han sido empleados para disolver y degradar lignina en biomasa lignocelulósica, además se han diseñado tratamientos específicos para su aplicación en la industria papelera. Recientemente, han ganado atención debido a que la pulpa de papel pretratada, ha tenido buena respuesta a la hidrólisis enzimática en procesos posteriores. Existe un amplio rango de solventes orgánicos que han sido aplicados en este tipo de pretratamientos, por ejemplo: metanol, etanol, ácido acético, ácido fórmico, aminas y cetonas (Kautto *et al.*,

2013). Debido al alto costo de los solventes, el etanol y el metanol son alcoholes deseables sobre otros alcoholes como el etilenglicol, que tiene altos puntos de ebullición. Sin embargo, el etanol es un inhibidor para el proceso hidrolítico, así que es necesario remover o eliminar las trazas de alcohol (Chiaramonti *et al*, 2012). Entre las principales ventajas en el uso de éste tratamiento, están la fácil recuperación de solventes orgánicos mediante destilación o bien el reciclaje de los mismos para integrarlos nuevamente al pretratamiento. Un punto interesante, es que la recuperación de la lignina después del pretratamiento tiene características deseables que pueden servir para la elaboración de otros productos o derivados. Este método puede mejorar el acondicionamiento de la biomasa mediante la adición de catalizadores como el ácido sulfúrico (Hallac *et al.*, 2010).

Tabla 3. Pretratamientos termoquímicos aplicados a distintos residuos, **efecto sobre la producción de biohidrógeno y biometano.**

Pretratamiento	Condiciones de pretratamiento	Sustrato	Condiciones del proceso	Rendimiento	Referencia
Ácido diluído	10g sustrato seco en 50 mL de HCl 0.25% (v/v), 24 h, 37 °C	Residuos de frutas y vegetales	Lote, 300 mL, 37 °C	10.11 mLH ₂ /h (0.16 mLH ₂ /h)	(Jia <i>et al.</i> , 2014)
Alcalino	8g NaOH/100g ST lodos	Pulpa y lodos de papel	Lote , 37 °C, 700 mL, 42 d	0.32 m ³ CH ₄ /Kg SV removido (0.12 m ³ CH ₄ /Kg SV removido)	(Lin <i>et al.</i> , 2009)
Alcalino y térmico	3% NaOH, 121 °C por 2 h y 5 FPU de celulasas, 50 °C, pH 4.8 por 24 h	Lodos y desechos de papel	Continuo, 1.2 L, 4 meses, 12 h (TRH)	129.93 mL H ₂ /g TSV (2.59 mL H ₂ /g TSV)	(Chairattanamanokorn <i>et al.</i> , 2012)
SDS	0.1 g/g, 21 °C	Lodos activados	Lote, MEC, 25 °C, 0.8 V	8.5 mgH ₂ /gSSV (3.4 mgH ₂ /gSSV)	(Wang <i>et al.</i> , 2014)

1.5.1.4. Líquidos iónicos

Este pretratamiento es novedoso, pues ha ganado interés en la conversión de lignocelulosa a compuestos más pequeños. Los LI se encuentran en forma líquida a temperatura ambiente, además de ser termoestables. Actúan sobre los enlaces que unen a la celulosa, hemicelulosa y lignina, por lo que disuelven estas macromoléculas, pero a diferencia de otros tratamientos, no generan compuestos tóxicos. El efecto de los LI, aun no ha sido estudiado a profundidad, hasta el momento sólo ha sido evaluado el efecto de los LI sobre la celulosa pura, sin embargo hay algunos estudios con paja en los que se ha tenido éxito (Galbe, 2012).

El principal problema en el uso de este pretratamiento es su alto costo, por lo que en estudios recientes, los esfuerzos en esta área se han enfocado en mejorar la estabilidad de los LI por medio de la combinación de ácidos económicos como el H_2SO_4 y aminas simples, que ayudan a reducir la degradación del solvente, el cual ayuda a tener una mayor recuperación de la biomasa pretratada por medio de filtración o centrifugación, sin la adición de un anto-solvente para su precipitación. Consecuentemente, el costo de la biomasa pretratada con LI ha sido optimizado, pues disminuye de \$50 a \$1.25/Kg de biomasa pretratada bajo estas condiciones (George *et al.*, 2015)

1.5.1.5. Pretratamientos físico-químicos

Entre los métodos convencionales encontramos los mecánicos y los térmicos. Ambos han sido implementados a nivel industrial, integrando en sus procesos de pretratamiento, máquinas de alta presión, ultrasonificadores y microondas. En la Tabla

4 se presentan resultados sobre la digestión anaerobia y fermentación oscura, en sustratos pretratados por métodos fisicoquímicos. Estos tratamientos, tuvieron efecto positivo sobre la producción de biometano, al aumentar 40% del biogás total en un sistema continuo, utilizando la FORSU como alimentación (Cesaro & Velgiorno, 2014). Para aumentar la efectividad de estos pretratamientos, se han acoplado en firma simultánea tecnologías de métodos químicos y físicos; sin embargo, el potencial de estos varía de acuerdo del tipo de biomasa. Es así como la optimización de estos procedimientos, se continúa investigando.

1.5.1.6. Pretratamiento mecánico

El pretratamiento mecánico es utilizado con el objetivo de minimizar el tamaño de partícula de la biomasa y además para reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentando de esta forma la tasa de hidrólisis (Ntaikou *et al.*, 2010). Este pretratamiento tiene entre sus ventajas, que requiere de poca energía para comenzar el proceso, a diferencia de otros pretratamientos. En estudios previos, Kopp *et al.*, combinaron el efecto de la molienda y temperatura, mediante el uso de perlas de 0.25 mm, a una velocidad de 10 m s^{-1} , durante 6 min a $60 \text{ }^\circ\text{C}$; en este trabajo encontraron un aumento en la producción de biogás debido al pretratamiento de los lodos utilizados en la digestión anaerobia (Kopp *et al.*, 1997). En la Tabla 4 se resumen algunos resultados correspondientes a los pretratamientos fisicoquímicos que han sido aplicados a distintos residuos.

Tabla 4. Resultados de pretratamientos fisicoquímicos evaluados en varios sustratos, y su efecto sobre la fermentación oscura.

Pretratamiento	Condiciones del pretratamiento	Sustrato	Condiciones del proceso	Rendimiento	Referencia
Burbujeo con CO ₂	Flujo: 30 mL CO ₂ /min, 20 min	<i>FORSU</i>	Lote, 35 °C, 3.5 L, pH 5.5	69.9 mLH ₂ /gSV (56.1 mLH ₂ /gSV)	(Bru <i>et al.</i> , 2012)
Ozonización	1-5 mg O ₃ /mL sludge	Aceite de palma y efluentes	Lote, 37 °C, 60 mL, pH 5.5	146 mL H ₂ /g DQO (48.6 mL H ₂ /g DQO)	(Wimonsong <i>et al.</i> , 2009)
Ultrasonificación	Amplitud 60% por 45 min	Efluentes de pulpa y papel	Foto Fermentación, 30 °C, 7 k lux intensidad luz	5.77 mL H ₂ /mL medio (1.10 mL H ₂ /mL medio)	(Hay <i>et al.</i> , 2015)

1.5.1.7. Explosión de fibra amoniaco

En el pretratamiento AFEX (por sus siglas en inglés, Ammonia fiber explosion) no se generan lodos que puedan ser recuperados de la fracción líquida, a diferencia de otros pretratamientos como el tratamiento de explosion por vapor. Los parámetros principales que deben ser considerados son: la carga de amoniaco y agua, temperature, presión y tiempo (Carrasco *et al.*, 1994). La biomasa es expuesta a elevadas temperaturas, por lo general entre 90-100 °C, por un período de 30 min, seguido de una inmediata reducción en la presión. Se debe señalar que las condiciones óptimas para el pretratamiento AFEX, dependen de la composición de biomasa lignocelulósica (Alizadeh *et al.*, 2005). Por ejemplo, los mejores parámetros operacionales para pretratar el pasto de rápido crecimiento, son a 100 °C, con una relación 1:1 de amoniaco y biomasa seca, por 5 min de tiempo de retención. La principal ventaja del pretratamiento AFEX, es que no hay formación de productos indeseables, como los furanos que se generan durante el pretratamiento ácido diluido o el de explosion por

vapor. Sin embargo resulta un método apropiado para acondicionar biomasa con menor contenido de lignina (Taherzadeh & Karimi, 2008).

1.5.1.7. Pretratamiento por explosión con vapor

Los pretratamientos hidrotérmicos promueven la hidrólisis enzimática en algunos residuos agrícolas y maderas (Heitz *et al.*, 1991). A diferencia de los pretratamientos químicos, éste método no requiere de ácido o álcali, pero es necesario operar a elevadas temperaturas (entre 190-210 °C) y una presión mayor, alrededor de 4.12 MPa. Las elevadas temperaturas favorecen la degradación de los azúcares liberados durante el tratamiento y se producen compuestos derivados como los furanos y el 5-HMF a partir de las hexosas (Negro *et al.*, 2003). En la figura 2, se presentan los productos de degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

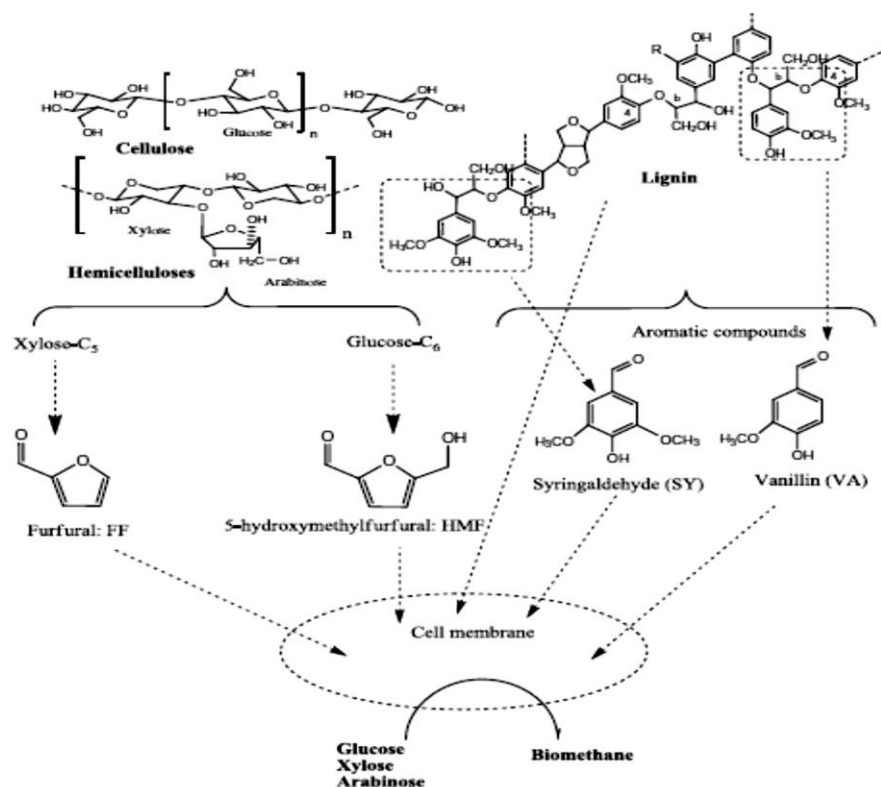


Figura 3. Productos de degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina, por efecto de la hidrólisis térmica (Fuente: Barakat *et al.*, 2012).

1.5.1.8. Pretratamiento enzimático

Este tratamiento puede resultar superior a los pretratamientos químicos, debido a que es menos contaminante al ambiente y requiere de menor energía para el proceso, pues la mayoría de los biocatalizadores operan casi a temperatura ambiente. Las enzimas pueden ser de origen bacteriano o fúngico, por ejemplo los hongos de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Liu *et al.*, 2014).

El pretratamiento biológico mediado por microorganismos, puede aplicarse a sustratos lignocelulósicos y aumentar el proceso de digestión anaerobia. En algunos casos, las enzimas son aplicadas a una sola etapa de la digestión anaerobia, para pretratar la materia prima antes del proceso. En ocasiones, la hidrólisis enzimática de lignocelulosa, no es efectiva debido a la alta estabilidad del polímero (Parawira, 2012). En la Tabla 5, se resumen algunos trabajos sobre pretratamientos enzimáticos a distintos residuos, sus condiciones de operación y el efecto en la producción de bioenergía. A pesar de que la notable degradación de lignina es eficiente, ésta depende de las enzimas que por lo general son producidas por los Basidiomicetos (Sindhu *et al.*, 2015). Algunas especies representativas que pertenecen a los hongos de pudrición blanca son: *Pleurotus ostreatus*, el cual ha sido utilizado de forma exitosa para el pretratamiento de paja de arroz y de maíz, para mejorar la degradación de lignina mediante la acción de lacasas y peroxidas. En este caso, se ha observado que hay un incremento en la accesibilidad a las enzimas celulolíticas que favorecen la liberación de azúcares (Liu *et al.*, 2013). Adicionalmente, especies de hongos de pudrición blanca, pueden reducir la cantidad de compuestos fenólicos (Schroyen *et al.*, 2015); esto último resulta interesante ya que se ha determinado que estos actúan

como inhibidores y disminuyen la producción de biogas hasta en un 50%, al haber una concentración entre 120 a 594 mg de compuestos fenólicos/g SV (Hernández & Edyvean, 2008).

Otros estudios, han evaluado el potencial de los pretratamientos enzimáticos para aumentar la producción de biohidrógeno. Por ejemplo, mediante el pretratamiento de agua residual de yucca, con concentraciones de 0.05%, 0.1% y 0.2% de la enzima α -amilasa, se han obtenido aumentos en el rendimiento de biohidrógeno, que van desde los 2.08 mol H₂ g⁻¹ DQO a los 5.02 mol g⁻¹ DQO (Leaño & Babel, 2012). Además, otro aspecto interesante en el uso de tratamientos biológicos, es la abundancia de especies microbianas, las cuales pueden ser utilizadas una amplia gama de procesos. Por ejemplo, algunos géneros de bacterias son utilizadas por su capacidad para producir celulasas, entre ellos destacan *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* y, *Ruminococcus*, y algunos actinomicetos como *Streptomyces* (Nanda *et al.*, 2014).

El pretratamiento biológico, es uno de los métodos más limpios, ya que no libera compuestos tóxicos al ambiente. Por ejemplo, existen hongos de pudrición café, blanca y de madera suave, que se han empleado para degradar lignina y hemicelulosa de la biomasa. Además, algunas investigaciones han hipotetizado que estas clase de hongos puede polimerizar y degradar lignin (Saritha *et al.*, 2012). En estudios posteriores, Saritha *et al.*, asumen que hay una modificación importante de los grupos metoxil y carbonilo, en el polímero de lignina; de forma paralela, elucidaron unidades de guayacil durante el proceso de deslignificación, y además encontraron 5 veces más el rendimiento de azúcares liberados después de la sacarificación de paja de arroz, cuando emplearon la cepa *Streptomyces griseorubens* (Saritha *et al.*, 2013).

Tabla 5. Pretratamientos enzimáticos evaluados en diferentes residuos orgánicos, y efecto sobre la producción de biocomsbutibles.

Pretratamiento	Condiciones de pretratamiento	Sustrato	Condiciones del proceso	Rendimiento	Referencias
Celulasas	40 ^a FPU g/SV, 72 h, 50 °C	^b RSF	Semi-continuo, 55 °C	43 LH ₂ /Kg _{base seca} (21 LH ₂ /Kg _{base seca})	(Escamilla-Alvarado <i>et al.</i> , 2015)
Lodos de hongo (glucoamilasa)	10U ^c /g seco RA ^d , 60 °C, 100 rpm, 24 h	RA	Lote, 35 °C, 30 mL, 150 rpm, 30 d	468.2 mLCH ₄ /gSV (197.9 mLCH ₄ /gSV)	(Kiran <i>et al.</i> , 2015)
Lipasa	Enzima 0.08% (v/v)	Queso cottage	Lote, 100 ml mesofílico, 60 d	450 mLCH ₄ /gSV (320 mLCH ₄ /gSV)	(Prabudessai <i>et al.</i> , 2014)
Proteasa	Enzima 0.06% (v/v)	Queso cottage	Lote, 100 ml mesofílico, 60 d	396 mLCH ₄ /gSV (328 mLCH ₄ /gSV)	(Prabudessai <i>et al.</i> , 2014)
Lacasa	2U/g biomasa, 30 °C, 24 h	Rastrojo de maíz	Lote, 30 d, 30 °C	344 LCH ₄ /Kg SV (277 LCH ₄ /Kg SV)	(Schroyen <i>et al.</i> , 2014)
MnP ^e +VP ^f	5U/g biomasa 30 °C, 6 h	Rastrojo de maíz	Lote, 30 d, 30 °C	309 LCH ₄ /Kg SV (263 LCH ₄ /Kg SV)	(Schroyen <i>et al.</i> , 2014)

^a FPU: Unidades de papel filtro ^b; RSF: Residuos sólidos fermentados; ^c U: Unidades de enzima; ^d RA: Residuos de alimentos; ^e MnP: Manganese peroxidasa; ^f VP: Versátil peroxidasa.

La gran diversidad de reacciones bioquímicas mediadas por la variedad de microorganismos, permite la obtención de una amplia gama de bioproductos, entre los que destaca el bioethanol; este biocombustible se produce principalmente por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y otras como *Pichia stipitis* y *Candida shehatae*, que pueden asimilar xilosa como fuente de carbono (Bisaria *et al.*, 1991).

La bacteria *Ruminococcus albus*, presente por lo general en el rumen anaerobio, puede producir enzimas celulolíticas con alta actividad, de las cuales la β-glucosidasa cataliza la hidrólisis de celobiosa y celo-oligosacáridos, durante la degradación final del material celulósico (Prasad *et al.*, 2007). Sus características

metabólicas y su habilidad para degradar este dímero, la convierten en una especie atractiva para evaluar su comportamiento en procesos anaerobios como la fermentación oscura. Sin embargo, los consorcios microbianos o cultivos mixtos son energéticamente más adecuados cuando se trabaja con sustratos complejos, debido a las distintas características metabólicas de cada microorganismo y su riqueza enzimática específica. Por lo anterior, el acondicionamiento del sustrato mediante pretratamientos, resulta una opción más viable para un proceso de biorrefinería, pues no se limita el aprovechamiento del sustrato debido a la falta de alguna enzima que lleve a cabo la degradación.

1.6. Perspectivas de los pretratamientos aplicados a una biorrefinería a partir de la FORSU

Existe una gran variedad de pretratamientos que han sido empleados con éxito, para aumentar la producción de biohidrógeno o biometano. Sin embargo, su efectividad depende principalmente del tipo de alimentación o sustrato empleado. Debido a la naturaleza química de la biomasa y las reacciones que se presentan durante los pretratamientos, en la mayoría de los casos se forman compuestos que pueden inhibir el proceso biológico durante la fermentación oscura. Una opción interesante es la aplicación de pretratamientos enzimáticos para eliminar HMF o furanos, mediante hongos que producen lacasas o MnP. Recientemente, este pretratamiento, ha mejorado la producción de biometano de 277 LCH₄/KgSV a 344 LCH₄/KgSV (Schroyen *et al.*, 2014), por lo que es importante la evaluación del efecto de la remoción de los compuestos tóxicos arriba mencionados, para optimizar el desempeño de los digestores. La complejidad de los residuos, así como su estructura química, se relacionan con la afinidad de la enzima, por ejemplo, en el grupo de trabajo

se han empleado celulasas para la degradación de residuos sólidos fermentados (RSF) que se producen en una etapa del proceso de biorrefinería de sólidos urbanos (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013); en este contexto, teóricamente se podría incrementar los rendimientos en la producción de hidrógeno acumulada, casi 2 veces en un reactor semi-continuo, si se considera la utilización de los hidrolizados que se producen después de una sacarificación (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2015). Por todo lo anterior, se puede concluir que el pretratamiento de desechos, son un grupo de procesos que indudablemente contribuyen a aumentar los rendimientos de bioenergía que se obtienen mediante una bioerrefinería.

1.7. Biorrefinería H-M-Z-S a partir de residuos sólidos urbanos

En el grupo de trabajo, se han realizado estudios con distintos residuos de la industria lechera (Muñoz-Páez, 2012), así como con residuos agrícolas (Robledo-Narváez, 2013) para la generación de hidrógeno y ácidos orgánicos, residuos sólidos urbanos (Escamilla Alvarado, 2009; Valdez Vázquez, 2007) para producción de biogás en reactores semi-continuos, residuos agroindustriales para la generación de hidrógeno (Robledo Narváez, 2014) y además se han implementado procesos de producción enzimáticos y de sacarificación bajo el esquema de biorrefinería de sólidos urbanos (Escamilla Alvarado, 2014).

En la biorrefinería H-M-Z-S, se ha operado en reactores en sistema de alimentación semi-continuo para la generación de hidrógeno y metano, utilizando la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Estos residuos se someten a una hidrólisis por medio de la digestión anaerobia y se genera metano; en una etapa posterior, el hidrógeno es generado y las purgas de sólidos remanentes se emplearon como

sustrato para la producción de celulasas con el hongo *Trichoderma reesei* MCG 80. Estas enzimas una vez separadas en el sobrenadante del medio de cultivo, se concentran y son utilizadas para sacarificar materia orgánica rica en celulosa y liberar glucosa que puede ser empleada en etapas alternas como por ejemplo la fermentación y producir bioetanol. En la figura 4, se muestra el diagrama general de la biorrefinería así como las etapas y corrientes que la integran.

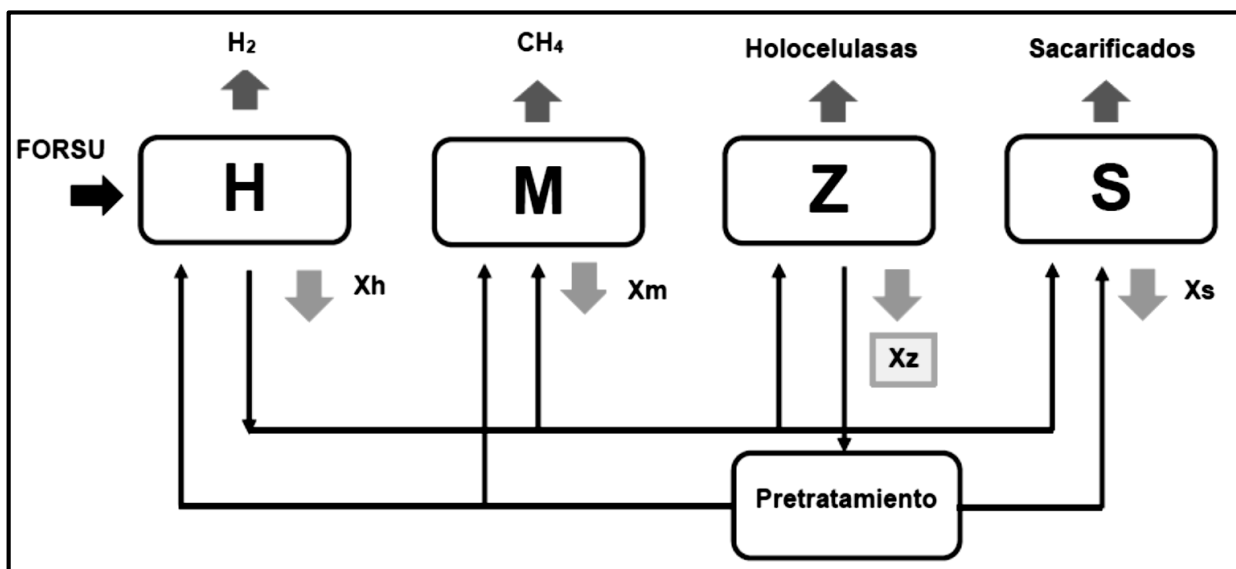


Figura 4. Diagrama de corrientes de la biorrefinería H-M-Z-S

****Nota:** Xm: purgas de sólidos de la etapa metanogénica; Xh: purgas de sólidos de la etapa hidrogenogénica; Xz: residuos sólidos de la etapa de producción enzimática; Xs: residuos sólidos de la etapa de sacarificación

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales objetivos de una biorrefinería es reducir al máximo la cantidad de desechos sólidos mediante el aprovechamiento de las corrientes que se generan a lo largo del proceso, así y obtener más productos de valor agregado.

En la biorrefinería H-M-Z-S, la corriente de sólidos residuales de la etapa de producción enzimática (X_z) es un residuo que presenta alto contenido de celulosa, y por ello es factible su acondicionamiento para utilizarla en alguno de sus etapas.

Por lo anterior, la aplicación del principio de cascada mediante el pretratamiento de estos sólidos residuales producirá un rendimiento mayor de la biorrefinería.

3. HIPÓTESIS

El pretratamiento y posterior utilización de la corriente residual X_z , que se genera en la etapa Z de la biorrefinería H-M-Z-S, mejorarán el desempeño de la biorrefinería H-M-Z-S.

3.1 Hipótesis particulares

- 1) El pretratamiento alcalino de la corriente residual X_z será el más efectivo al aumentar la degradabilidad de celulosa y reducir el contenido de lignina.
- 2) La producción de hidrógeno será mayor al utilizar los sólidos pretratados de la corriente residual X_z en una fermentación anaerobia por Lote tipo FASSH-VI.
- 3) Se obtendrá un mayor desempeño en la etapa de sacarificación al utilizar sólidos residuales pretratados de X_z como sustrato.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es mejorar el desempeño en la biorrefinería H-M-Z-S para la obtención de bioenergía y sacarificados a partir del pretratamiento y reúso de la corriente residual Xz que se genera de la producción de holocelulasas.

4.1 Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto del pretratamiento de la corriente residual Xz, sobre la degradabilidad de celulosa y reducción en el contenido de lignina.
- 2) Incrementar la producción de hidrógeno al reusar los sólidos pretratados de la corriente Xz que se generan al final de la producción de holocelulasas.
- 3) Aumentar la producción de azúcares fermentables en la sacarificación, mediante la adición de sólidos residuales pretratados de Xz como sustrato.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Plan de trabajo

El proyecto consistió de 3 etapas y seis actividades, que se describen en la figura 5.

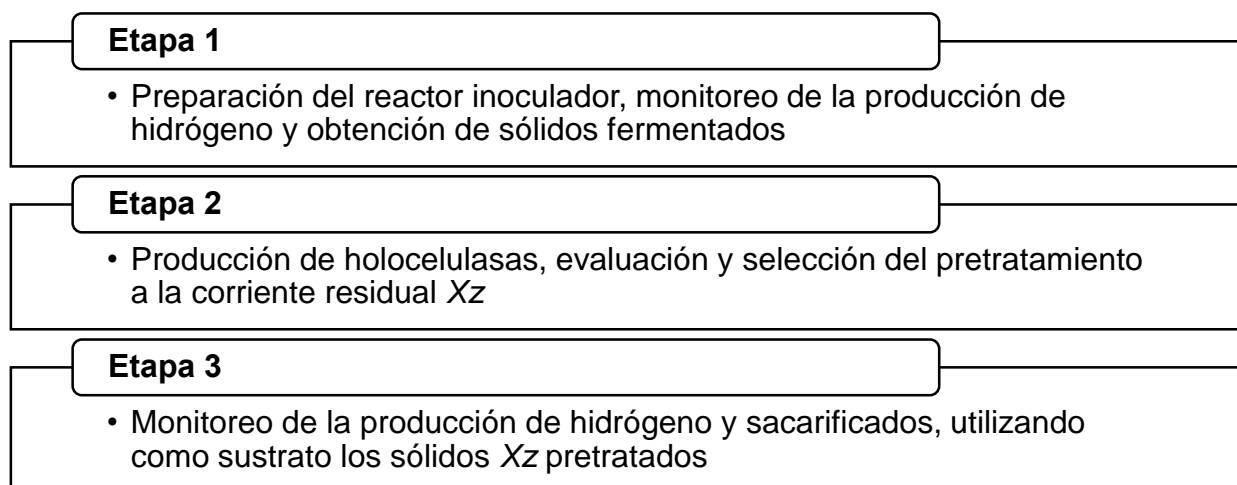


Figura 5. Etapas principales del proyecto

ACTIVIDADES

En la siguiente lista se presentan las actividades que integran el proyecto

Actividad 1. Arranque y operación de reactor inoculadores.

Actividad 2. Producción de hidrógeno en lote a partir de FORSU.

Actividad 3. Obtención de holocelulasas empleando la cepa *Trichoderma reesei* MCG 80 y sólidos fermentados residuales de la producción de hidrógeno.

Actividad 4. Pretratamiento alcalino y ácido diluido, de la corriente residual Xz, para evaluar el efecto sobre la remoción de lignina y disponibilidad de celulosa.

Actividad 5. Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de los sólidos pretratados Xz, mediante un proceso en lote tipo FASSH-VI.

Actividad 6. Producción de sacarificados utilizando sólidos pretratados Xz como sustrato.

5.2. Descripción de actividades

A continuación se describen las actividades que integran cada etapa, así como el propósito y metodología experimental.

ETAPA 1

5.2.1. Actividad 1. Arranque y operación de reactor inoculadores.

5.2.1.1. Propósito

Conseguir un inóculo aclimatado metanogénico, que servirá para iniciar la primer fase hidrogenogénica, así como la segunda fase hidrogenogénica en reactores por lote tipo FASSH-VI (suplementados con sólidos Xz pretatados) y para la inoculación de reactores metanogénicos en lote (utilizando sólidos Xz pretratados como carga).

5.2.1.2. Diseño experimental

Obtención de inóculo metanogénico

Se montaron dos digestores anaerobios que contenían la misma proporción de excreta de vaca, lodos activados y suelo de jardín, generando un inóculo mixto. Este inóculo se arrancó con un licor de sacarosa a una concentración de 333 g/L y una solución amortiguadora de bicarbonato que contenía 31.6 g de NaHCO_3 y 63.3 g de K_2HPO_4 por litro para un pH de 8.5, con el propósito de reactivar la actividad biológica de los microorganismos. El inóculo se mantuvo bajo régimen termofílico a 55°C hasta alcanzar una producción de metano del 60% y se utilizó la estrategia de operación semi-continua alimentando los reactores metanogénicos dos veces por semana con FORSU hasta llegar a un TRM de 50 d. hidrogenogénicos. En la figura 6, se esquematizan las condiciones de operación para la obtención del inóculo y su acondicionamiento posterior para la etapa de producción de hidrógeno.

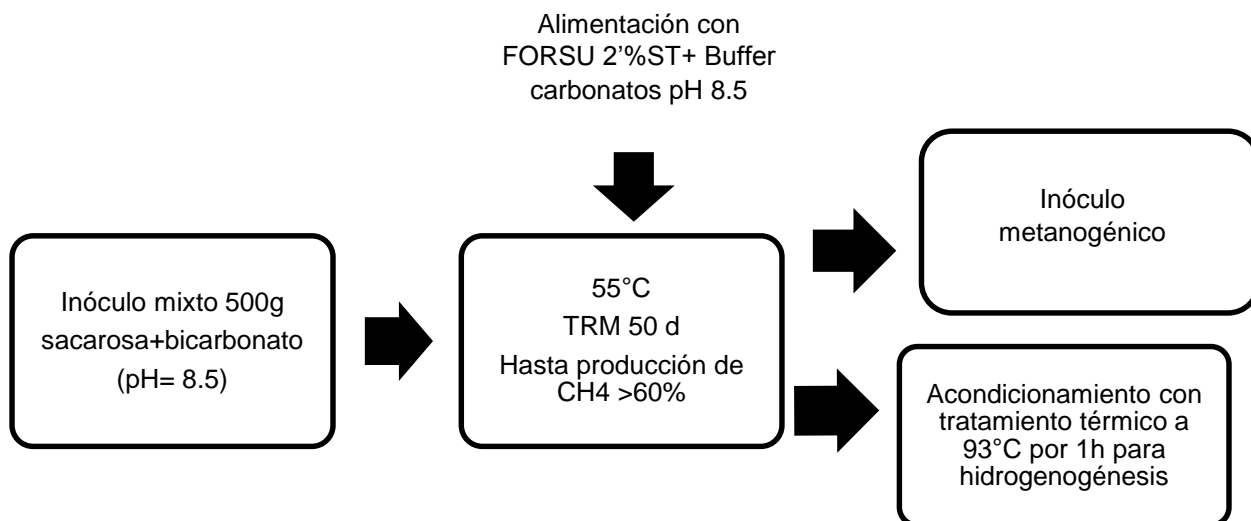


Figura 6. Resumen de operación metanogénica y obtención de inóculo

5.2.1.3. Análisis y seguimiento

Para evaluar el desempeño de los reactores metanogénicos, se realizaron los análisis descritos en la tabla 6.

Tabla 6. Programa de seguimiento y análisis de reactores inoculadores metanogénicos.

Parámetro	Alimentación	Purga	Biogás
Sólidos totales	1/lote	2/sem	N/A
Sólidos volátiles	1/lote	2/sem	N/A
Cenizas	1/lote	2/sem	N/A
pH	1/lote	2/sem	N/A
Alcalinidad	1/lote	2/sem	N/A
Ácidos orgánicos volátiles	1/lote	2/mes MC	N/A
Nitrógeno total Kjeldhal	1/lote	2/mes MC	N/A
Celulosa (Carb. totales)	1/lote	2/mes MC	N/A
Desplazamiento de biogás	N/A	N/A	1/día
Metano (%)	N/A	N/A	2/sem

*MC: muestras compuestas

5.2.1.4. Métodos y procedimientos

Montaje de reactores metanogénicos

Para la elaboración de los digestores anaerobios, se utilizaron frascos de vidrios de boca ancha con capacidad de 1L, sellados con tapones de goma que contenían una perforación para el paso del biogás a través de una manguera Tygon de 1 cm de diámetro. Este frasco fue conectado a un salmuerómetro, que se compone de un frasco de vidrio de boca ancha con capacidad de 2L, que permite medir el volumen del líquido desplazado por acción del biogás acumulado. La conexión con el digestor presenta un frasco de vidrio de 100 mL sellado herméticamente y que sirve para la recolección del biogás; de aquí se tomó 1 mL de muestra para realizar la medición en el cromatógrafo de gases.

Recolección y preparación del inóculo metanogénico

El inóculo metanogénico mixto se compone de excreta de vaca, lodos activados y suelo de jardín por partes iguales, para una masa total de 500g. La excreta de vaca fue proporcionada por el Rancho La Villa de la Delegación Gustavo A. Madero; se recolectaron 10L de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales de San Juan Ixhuatepec, mientras que el suelo se obtuvo del jardín del Cinvestav de la parte trasera del departamento de biotecnología. Los lodos activados se dejaron sedimentar en conos Imhoff por espacio de 6 horas y una vez separados se adicionaron 166 ml a cada reactor. El suelo de jardín seco se cribó con un tamiz de malla #35 y se agregaron 0.166 kg al frasco que contenía 0.166 kg de excreta de vaca. Todo el contenido se mezcló hasta tomar una consistencia uniforme bajo atmósfera de nitrógeno de grado industrial.

Durante una semana se adicionó 1ml de sacarosa a una concentración de 333 g/L que sirvió para reactivar a los microorganismos presentes. La alimentación con FORSU

comenzó periódicamente una vez que se alcanzó un 60% de la producción de metano considerando un TRM de 100 d al inicio, hasta llegar a un TRM de 50 d. La humedad de la FORSU se ajustó a un 20% p/p de sólidos totales (ST) con una solución amortiguadora de carbonatos que contenía 31.6 g de NaHCO_3 y 63.3 g de K_2HPO_4 por litro para un pH de 8.5. La alimentación de los reactores se realizó dos veces por semana bajo una atmósfera de nitrógeno de grado industrial, gaseando el espacio aéreo del reactor durante 5 min. Después se agitaron manualmente los reactores durante un minuto.

Recolección y preparación de la FORSU

La FORSU se preparó con restos de comida de la cafetería del CINVESTAV y residuos de papel de oficina. Los desechos de comida fueron en su mayoría cáscaras de residuos vegetales como papa, chayote, zanahoria, hojas de lechuga, melón, piña, y cáscaras de huevo. Estos desechos se secaron a la intemperie durante una semana hasta que se redujeron y sentían secos al tacto. Después los restos se pasaron a un horno a 103°C por 6 horas. Posteriormente se trituraron en un molino de martillos y se conservaron en refrigeración hasta su uso. La proporción de FORSU es 60% de residuos de alimentos y un 40% de desechos de papel; esta mezcla se ajustó para tener un contenido de sólidos del 20% y se adicionó una solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{HCO}_3/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 8.5) para mantener la humedad y alcalinidad.

Medición de pH y alcalinidad

Se solubilizaron 4 g de muestra húmeda en 40 ml de agua destilada a 4°C . Después se agitó la suspensión con una varilla de vidrio y se reposó por 10 minutos en refrigeración a 5°C . La solución se agitó nuevamente y se midió el pH en el

potenciómetro. Después de la medición, la muestra se centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 20 ml y se determinó la alcalinidad titulando con una solución de H_2SO_4 al 0.3 N. Los cálculos de alcalinidad se realizaron de acuerdo a la metodología reportada en trabajos anteriores (Escamilla-Alvarado, 2009).

Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y ceniza

Se utilizó 1g de muestra húmeda en una cápsula de porcelana previamente llevada a peso constante. Para esta determinación, se siguió el protocolo empleado con anterioridad en trabajos previos (Escamilla-Alvarado, 2009).

Cuantificación de ácidos orgánicos volátiles

De la muestra anterior a la que se determinó la alcalinidad, se tomaron 2mL del sobrenadante y se filtraron por medio de un filtro de acetato (0.45μ), la muestra se congeló a -20°C hasta su análisis. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Star 3800, equipado con un detector de ionización de flama (FID). Se inyectó una alícuota de la solución filtrada y congelada ($2\mu\text{L}$). Las temperaturas de inyección y detección fueron de 250 y 280°C , respectivamente. La temperatura del horno fue de 80°C , con un flujo de 7min e incrementos de $8^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a los 240°C y se mantuvo a ésta última por 5 minutos.

Se empleó una columna Agilent Technologies 19091N-133 de una longitud de 30 m y un diámetro interno de 0.250 mm, que contiene una película de recubrimiento de 0.25 μm de HP-INNOWAX. Como gas acarreador se empleó nitrógeno a un flujo de 20

mL/min. Los estándares para los metabolitos volátiles fueron acetato, ácido butírico y ácido propiónico.

Para determinar las concentraciones de los compuestos volátiles, se compararon las áreas de los cromatogramas de las muestras contra la curva de los estándares de calibración.

Determinación de nitrógeno total

Se analizaron las purgas del reactor metanogénico a partir de 0.3 g de muestra y se colocaron en un matraz Kjeldhal, a éste se le añadieron 2 g de catalizador (1.9 g de K_2SO_4 + 40 mg de HgO mezclados de forma homogénea con perlas de vidrio); a cada muestra se adicionó 4mL de H_2SO_4 y se pusieron a digerir hasta eliminar los restos de vapores de ácido. Después de la digestión, se disolvió el precipitado con agua (5 mL de agua destilada) y su contenido se vació al matraz de destilación, para obtener 100 mL usando NaOH al 32%. Las muestras de NH_3 disueltas se recuperaron en H_3BO_3 (5 mL) al 5% que contenían 3 gotas de indicador Kjeldhal (100 mL de etanol a 95%+ 200 mg de rojo de metilo, esta solución se mezcla con 50 mL de etanol al 95% + 200 mg de azul de metileno). El destilado toma un color verde al mezclarse con el ácido bórico que contiene indicador, éste se tituló con HCl al 0.01 N hasta tomar un color lila.

Desplazamiento de biogás

Se utilizaron frascos de vidrio de 2 L que contenían un líquido de salmuera, el cual fue desplazado por el volumen de biogás y es equivalente al volumen gaseoso producido. El volumen gaseoso desplazado se normalizó a condiciones TPN (273 K, 760 mmHg) a partir de las condiciones de la Ciudad de México (585 mmHg) y de la temperatura de

operación (Top) de acuerdo a la ley de los gases ideales. El volumen gaseoso normalizado se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$VN = V_{\text{desp}} \cdot \frac{273}{273 + T_{\text{op}}} \cdot \frac{585 \text{ mmHg}^a}{760 \text{ mmHg}} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

VN = volumen de desplazamiento normalizado (NL)

Vol. desplazado = volumen de salmuera desplazado (L)

Top = temperatura de operación (°C)

^a: Se tomó 585 mmHg como la presión en la ciudad de México

Cuantificación de metano por cromatografía de gas

La producción de metano en el biogás se cuantificó en un cromatógrafo de gases GOW-MAC modelo 350 con un detector de conductividad térmica. La temperatura del inyector, columna y detector fueron 25, 25 y 100°C respectivamente, usando argón como gas acarreador. Se utilizó una columna empacada de sílice gel 60/80 de diámetro. Para obtener las concentraciones de cada gas, se realizaron curvas de calibración con estándares de metano, hidrógeno y nitrógeno grado industrial. El volumen de inyección de cada muestra fue de 1 mL.

Determinación de celulosa

Se pesaron 0.5 g de muestra seca en un matraz de fondo plano al que se le adicionaron 7.5 mL de ácido acético al 80% y 0.75 mL de ácido nítrico concentrado; se sometió a reflujó por 20 minutos a 200°C. El residuo se recuperó por filtración en crisoles que

contenían fibra de vidrio y aplicando vacío. Se realizó un lavado de los sólidos con etanol concentrado y los crisoles se llevaron a 105 °C por 2 h hasta obtener el peso seco (P1).

Después se calcinaron las muestras a 550 °C y se obtuvo su peso (P2). El contenido de celulosa se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Celulosa = \frac{P1-P2}{Peso\ muestra\ base\ seca\ (g)} * 100 \quad Ec. (4)$$

5.2.2. Actividad 2. Producción de hidrógeno por sistema en lote a partir de FORSU.

5.2.2.1. Propósito

Obtener sólidos digeridos residuales de la fermentación oscura que servirán como fuente de carbono para la producción de holocelulasas.

5.2.2.2. Diseño experimental

Para el montaje de los reactores hidrogenogénicos se utilizó FORSU como sustrato ajustada a un 20% de ST con una solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.21. La relación de sustrato e inóculo fue de 80% y 20%, respectivamente. El inóculo procede de un acondicionamiento previo con un tratamiento térmico a 93°C por una hora, con el fin de inhibir las arqueas metanogénicas consumidoras de hidrógeno. Los reactores por lote se incubaron en régimen mesofílico a 36°C por un periodo de 30 días. Al inicio y final de la fermentación se realizó la cuantificación de hidrógeno, el análisis de la composición de los sólidos y diversos metabolitos. En la figura 7, se describe el arranque y operación para la etapa hidrogenogénica.

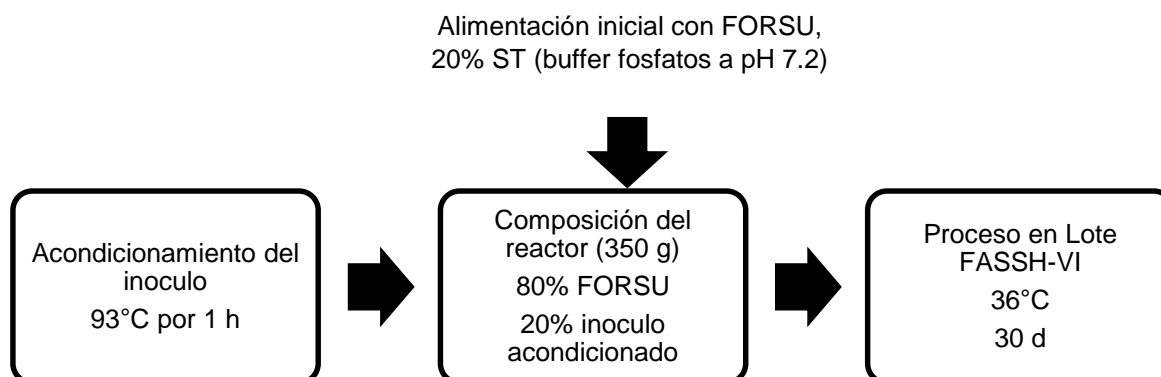


Figura 7. Resumen de la operación hidrogenogénica

5.2.2.3. Análisis y seguimiento

Para monitorear el desempeño de los reactores hidrogenogénicos, se realizaron los análisis que se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Frecuencia de análisis y seguimiento durante la operación hidrogenogénica

Parámetro	Alimentación	Purga	Biogás	Método
Sólidos totales	1/lote	1/lote	N/A	Poggi-Varaldo, 1999
Sólidos volátiles	1/lote	1/lote	N/A	Poggi-Varaldo, 1999
pH	1/lote	2	N/A	Escamilla-Alvarado, 2009
AOV	1/lote	2/mes	N/A	Escamilla-Alvarado, 2009
Solventes	1/lote	2/mes	N/A	Sotelo-Navarro, 2015
Nitrógeno total Kjeldhal	1/lote	Inicial-final	N/A	Muñoz-Páez, 2014
Celulosa	1/lote	Inicial-final	N/A	Van Soest & Wine, 1968
H ₂ (%)	N/A	N/A	2/sem	Muñoz-Páez, 2014

5.2.2.4. Métodos y procedimientos

Operación hidrogenogénica por lote tipo FASSH-VI

El inóculo metanogénico se inhibió mediante un tratamiento térmico a 93°C por espacio de una hora en baño maría, de acuerdo a la metodología de Valdez-Vázquez *et al.*, 2005. Se utilizaron dos frascos de vidrio de 1L de capacidad con una masa de 357g cada uno. Ambos reactores se prepararon con una relación de 80% de sustrato y 20% de inóculo; por lo anterior, se emplearon 286 g de FORSU ajustado a un 20% de ST con buffer de fosfatos a un pH de 7.2 (K_2HPO_4/KH_2PO_4) y 71.5 g de inóculo. Después se gaseó el espacio aéreo de cada reactor con Nitrógeno grado industrial durante 10 min. Los reactores se incubaron a 36°C y se realizó el venteo intermitente con nitrógeno para estimular la producción de hidrógeno. Para generar la mayor cantidad de sólidos fermentados, se montaron tres reactores más con una masa de 750 g y otro de 1500 g. La preparación de los mismos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en este apartado y se incubaron bajo las mismas condiciones. La cuantificación de hidrógeno se realizó mediante un cromatógrafo de gases GOW-MAC con detector de conductividad térmica.

ETAPA 2

5.2.3. Actividad 3. Obtención de holocelulasas empleando la cepa *Trichoderma reesei* MCG 80 y sólidos fermentados residuales de la producción de hidrógeno.

5.2.3.1. Propósito

Evaluar la producción de holocelulasas utilizando como sustrato los sólidos fermentados residuales de la producción de hidrógeno. Obtener un lote de sólidos residuales (Xz) que serán acondicionados para su reutilización en las etapas H-M-S de la biorrefinería.

5.2.3.2. Diseño experimental

Para la producción de holocelulasas inicial, se realizaron fermentaciones en cultivo sumergido por medio de reactores con tanque agitado (Sixfors) con capacidad de 600 mL y un volumen operacional de 500 mL. El inóculo (10%v/v) procedía de cultivos en medio líquido de la cepa *Trichoderma reesei* MCG 80, crecido en medio mineral Mandels. Posteriormente se prepararon los cultivos en matraces Erlenmeyer de 3L con un volumen de operación de 1 L, se utilizó la relación de inóculo anterior y una concentración de sustrato de 30 g/L (sólidos fermentados secos y tamizados), para tener una concentración de celulosa aproximada del 1% (%p/v). Para el caso del control, se utilizó solka floc a una concentración de 10 g/L. Los matraces se incubaron a 30°C durante 5 días con una agitación de 200 rpm.

5.2.3.3. Análisis y seguimiento

Para este propósito se tomaron 5 ml de muestra cada 24 h a partir del tiempo cero durante cada fermentación. A partir de esta se hicieron los ensayos enzimáticos para actividad en papel filtro (Ghose, 1989); también se cuantificó la actividad de carboximetilcelulasa (CMCasa), Xilanasa y β -glucosidasa, así como el contenido de proteína soluble (Lowry, 1951); las condiciones para los ensayos enzimáticos se describen en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones para las determinaciones enzimáticas.

Enzima	Tiempo de reacción	Temperatura
FPasa	60 min	50°C
CMCasa	30 min	30°C
Xilanasa	10 min	40°C
B-glucosidasa	30 min	50°C

*Los ensayos enzimáticos se realizaron utilizando un buffer citratos-fosfatos 0.05 M a un pH de 4.8

5.2.3.4. Métodos y procedimientos

Propagación de inóculo

La cepa *Trichoderma reesei* MCG 80 se propagó a partir de 200 μ L de una suspensión con una concentración de $1 \cdot 10^6$ esporas/mL, éste volumen se sembró en placas de agar PDA por la técnica de extensión en placa. Después se incubaron a 30°C durante 5 días hasta observar crecimiento radial. Se tomaron 3 cm² de cada placa utilizando una pipeta Pasteur estéril para perforar el agar y obtener muestra de micelio. Éstas últimas sirvieron para inocular matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 150 mL de medio mineral y solka flocc al 1% (p/v) o bien sólidos fermentados al 3% (%p/v) de celulosa (30 g/L). De ambos cultivos se realizó una réplica.

Tabla 9. Composición del medio mineral para *Trichoderma reesei* MCG 80

Componente	Cantidad (mL)
Medio Mandels 5x	10 ml
Metales traza 1000x	0.05 ml
Peptona de soya	0.05 g
Buffer citratos 0.1M	25 ml
Tween 80 al 10%	0.5 ml
Agua destilada	9.5 ml
^a Sustrato (solka flocc o Sólidos fermentados)	1% (%p/v)
^b Volumen final	45ml

^a Para sólidos fermentados: se utilizaron 30g/L de sólidos en base seca

^b El volumen final contando el 10% de inóculo (5 ml), es de 50 ml

Tabla 10. Composición del medio Mandels (5x)

Componente	Cantidad (g/L)
Urea	1.5
NH ₄ SO ₄	7
KH ₂ PO ₄	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.025
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.005
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.005
CoCl ₂	0.01
Peptona	5
Tween 80	5 ml

Al terminar este periodo, se inocularon nuevos medios de cultivo mineral Mandels estériles con 100 mL de cultivo provenientes del paso anterior. Los cultivos de 1L ya inoculados se incubaron por 5 días bajo las condiciones antes mencionadas. Para medir la viabilidad del inóculo, se realizaron determinaciones de la actividad celulolítica utilizando como sustrato papel filtro Whatman No.1. Al término de los 5 días los cultivos restantes se conservaron a 4°C por unas horas para enseguida inocular cultivos de 1L con medio mineral Mandels y sólidos fermentados como sustrato.

Producción de holocelulasas con sólidos fermentados

Para el sustrato se utilizó una concentración de 30g/L de sólidos fermentados y un inóculo del 10% (%v/v) que se obtuvo en la sección. Las condiciones de operación fueron los siguientes: agitación 150 rpm, temperatura 30°C, pH 4.8, durante 5 días.

Para la producción de holocelulasas con sólidos fermentados (H), se requiere de un lavado previo para eliminar el exceso de ácidos orgánicos. Estos se lavaron con agua destilada hirviendo y se filtraron con una gasa de algodón. Después se agregó un volumen de etanol al 50%, nuevamente se filtraron los sólidos y finalmente se hizo un

segundo lavado con agua destilada hirviendo. El volumen recuperado de las filtraciones se almacenó en frascos para su análisis posterior. Los sólidos obtenidos se secan en un horno a 60°C por 24 h, después son tamizados con una malla #40 y se almacenan en frascos hasta su uso.

5.2.4. Actividad 4. Pretratamiento de la corriente residual Xz para la selección del mejor método en función de la degradabilidad de celulosa y contenido de lignina.

5.2.4.1. Propósito

Evaluar el efecto de los pretratamientos alcalinos y ácido diluido, sobre la corriente sólida Xz y seleccionar aquel que favorezca la disponibilidad de celulosa y su degradabilidad, así como la reducción de lignina.

5.2.4.2. Diseño experimental

Se evaluaron tres pretratamientos, dos métodos alcalinos y un tratamiento ácido diluido descritos en la tabla 6. Se utilizaron muestras de sólidos Xz en base húmeda y se ajustó a una relación 1:10 (masa: volumen) de solución alcalina o ácida.

Tabla 11. Pretratamientos aplicados a la FORSU y a la corriente Xz

Muestra	Pretratamiento	Temperatura	Tiempo
Sólidos Xz	Na ₂ CO ₃ 1M	60 °C	1 h
	NaOH 1M		
	HCl 1.5% (%v/v)		

5.2.4.3. Análisis y seguimiento

Se determinó el contenido de celulosa antes y después de cada pretratamiento, con el propósito de conocer el efecto sobre su disponibilidad; de forma paralela se realizó la determinación de lignina y evaluar la remoción de la misma. De igual forma se evaluó antes y después el contenido de azúcares reductores, ya que permite medir la degradación del polímero de celulosa. En la tabla 12 se presentan los análisis realizados durante esta actividad.

Tabla 12. Programa de análisis y seguimiento de las muestras pretratadas.

Análisis	Método
Celulosa	Van Soest y Wine, 1967
Lignina	Escamilla-Alvarado, 2009
Azúcares reductores	Miller, 1959
Sólidos volátiles	Poggi-Varaldo, 1999

Posteriormente, las muestras pretratadas fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido (MEB), para obtener mayor información morfológica y el efecto de los pretratamientos sobre la topografía superficial de las fibras de celulosa.

5.2.4.4. Métodos y procedimientos

La corriente residual sólida Xz que se genera durante la producción de holocelulasas, fue recuperada por centrifugación a 7,000 rpm por 20 minutos. La biomasa se lavó dos veces con agua destilada para eliminar los restos de medio de cultivo. Estos sólidos se almacenaron en tubos Falcon de 50 ml y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para realizar los pretratamientos, se pesaron 10g en base húmeda de Xz y se agregaron 100 ml de cada solución alcalina (Na_2CO_3 1M y NaOH 1M) o de ácido clorhídrico diluido al

1.5% (%v/v). Cada mezcla se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se llevaron a 60 °C por espacio de una hora. Después de este tiempo, se dejaron enfriar los matraces y los sólidos se recuperaron por centrifugación a 7,000 rpm por 20 min. Se hicieron lavados con agua destilada para eliminar restos de ácido o álcali, hasta obtener un pH de 7.0 en cada muestra.

Posteriormente cada sólido recuperado, se colocó en cápsulas de porcelana y se llevaron a sequedad a 100°C por 24 h. Una vez secas las muestras, se pulverizaron con ayuda de un mortero y se almacenaron en tubos de plástico a 4 °C hasta su uso.

ETAPA 3

5.2.5. Actividad 5. Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de los sólidos residuales pretratados de la corriente Xz.

5.2.5.1. Propósito

El objetivo de esta actividad, fue evaluar el potencial de los sólidos residuales Xz sometidos al pretratamiento alcalino, para ser utilizados como sustrato durante la fermentación hidrogenogénica.

5.2.5.2. Diseño experimental

Los sólidos residuales (Xz) fueron pretratados alcalinamente con NaOH 1M de acuerdo a la sección anterior, posteriormente acondicionados fueron agregados con distinta proporción y composición a reactores por lote con una masa operacional de 40 g. Se utilizaron reactores tipo FASSH-VI, que contenían una cantidad variable de sólidos pretratados Xz y de FORSU sin pretratar, así como sus respectivos controles. En la tabla 13 se presentan los tratamientos evaluados experimental para la producción de hidrógeno por sistema en lote tió FASSH-VI, de esta actividad.

Tabla 13. Composición para cada reactor hidrogenogénico, empleando distinta carga de alimentación con FORSU y sólidos Xz pretratados con NaOH 1M.

U.E.	Tratamiento	Réplicas
1	FORSU 100%	A,B,C
2	Xz PL 100%	A,B,C
3	Xz SP 100%	A,B,C
4	Xz PL 40% + FORSU 60%	A,B,C
5	Xz SP 40% + FORSU 60%	A,B,C
6	Inóculo 100%	A,B,C

*U.E.: Unidades experimentales; S.P.: Sin pretratamiento

5.2.5.3. Análisis y seguimiento.

Para determinar el plató durante la producción de hidrógeno, se realizó la medición del gas en forma diaria. Una vez identificada la fase estacionaria, y que no hubo un aumento sustancial en la producción de hidrógeno, se estimuló un nuevo ciclo de producción por medio del venteo con nitrógeno grado industrial en el espacio de cabeza de los reactores. El venteo se realizó por 2 minutos y se utilizó un sello de agua para evitar la salida de gas de los reactores y mantener el sistema cerrado. Para evaluar el desempeño de los reactores a lo largo del tiempo, se consideraron dos muestreos, inicial y final, en los que se consideraron las variables de respuesta de la tabla 14.

Tabla 14. Frecuencia de análisis y seguimiento para la producción de hidrógeno en reactores por lote tipo FASSH-VI utilizando los sólidos pretratados como carga inicial.

Parámetro	Frecuencia análisis	Referencia
Sólidos totales	I/F	Poggi-Varaldo, 1999
Sólidos volátiles	I/F	Poggi-Varaldo, 1999
Alcalinidad	I/F	Escamilla-Alvarado, 2009
pH	I/F	Escamilla-Alvarado, 2009
Ácidos orgánicos	I/F	Sotelo-Navarro, 2015
Solventes	I/F	Sotelo-Navarro, 2015
Ácido láctico	I/F	Sotelo-Navarro, 2015
Nitrógeno Total Kjeldhal	I/F	Poggi-Varaldo, 1999
Celulosa	I/F	Van Soest & Wine, 1968
H ₂ (%)	Diario	Muñoz-Páez, 2014

*Nota: *I*, corresponde a la muestra inicial de sólidos en cada reactor; *F*, representa a las muestras de sólidos al término de la producción de hidrógeno

5.2.5.4. Métodos y procedimientos

Los sólidos pretratados Xz, una vez acondicionados y secos, se agregaron de acuerdo a la composición de la tabla 13. La cantidad de sólidos totales en todas las unidades experimentales, se ajustó a un 20%, utilizando un buffer de carbonatos-fosfatos (32.6 g/L de NaHCO₃ y 63.3 g/L de KH₂PO₄ a un pH de 7.0). Se utilizaron frascos serológicos de vidrio como reactores, con un volumen de operación de 120 mL y una masa total de 40 g. El inóculo se aclimató por medio de shock térmico a 95°C por 1h y se utilizaron 8 g de éste para inocular 32 g de sustrato en cada reactor; se mezcló vigorosamente cada unidad utilizando una varilla de vidrio. Una vez inoculado cada reactor, se gaseo el espacio aéreo con nitrógeno grado industrial durante 2 minutos. Cada frasco fue sellado y se mantuvieron en incubación a 35 °C; la medición de hidrógeno se realizó diariamente, para determinar la fase estacionaria producción. Paralelamente se realizó el análisis proximal de los sustratos empleados en cada tratamiento y el resto de las determinaciones con el propósito de evaluar el desempeño de los reactores. Una vez alcanzada la máxima producción de hidrógeno y se llegó a la fase estacionaria, se realizó un venteo intermitente con nitrógeno para estimular un nuevo ciclo de producción.

5.2.6. Actividad 6. Producción de sacarificados empleando sólidos residuales pre-tratados de Xz como sustrato.

5.2.6.1. Propósito

Determinar el potencial de la corriente Xz sometida a un pretratamiento alcalino, al ser utilizada como sustrato en un proceso de sacarificación y evaluar la liberación de azúcares a partir de esta corriente.

5.2.6.2. Diseño experimental

Se utilizó el extracto crudo enzimático obtenido de la producción de holocelulasas a partir de *Trichoderma reesei* MCG 80. Este se compone de las siguientes enzimas: FPasas, Xilanasas, Carboximetilcelulasas y β -glucosidasas. Como sustrato se utilizó el residuo Xz pretratado con NaOH1M. En la tabla 15 se muestra el diseño experimental que corresponde a esta actividad.

Tabla 15. Condiciones de operación y parámetros a evaluar durante la sacarificación del residuo Xz pretratado, utilizando holocelulasas de *T. reesei* MCG 80.

Parámetro	Condiciones de operación
Temperatura	50 °C
Agitación	150 rpm
Tiempo	48 h
Sustrato [%p/v]	1%, 3%, 5%
Enzima [U/mg]	3 FPU, 5 FPU, 7 FPU

5.2.6.3. Análisis y seguimiento

La toma de muestras durante la sacarificación se realizó al inicio de la sacarificación y al final (48 h). Se tomó un volumen de 1ml por cada unidad experimental. En la tabla 16 se describen las variables de respuesta correspondientes al experimento

Tabla 16. Cuantificación de azúcares liberados durante la sacarificación enzimática a partir de holocelulasas de *T. reesei* MCG 80.

Producto	Métodos
Glucosa	DNS, YSI
Xilosa	YSI
Celobiosa	HPLC
Celotriosa	HPLC
Celotetraosa	HPLC
Celopentosa	HPLC
Xilotriosa	HPLC
Xilotetraosa	HPLC
Xilopentosa	HPLC

5.2.6.4. Métodos y procedimientos

Las reacciones se llevaron a cabo en frascos serológicos de 120 mL y se utilizó un volumen operacional de 20 mL; en estos frascos se mezcló el sustrato (Xz pretratado con NaOH 1M) en un buffer citratos-fosfatos al 0.05 M a un pH de 4.8. Los matraces con la mezcla de reacción, se mantuvieron en agitación a 150 rpm a una temperatura de 50 °C durante 48 h. La cuantificación de azúcares reductores se realizó de acuerdo a la técnica de Miller, 1959.

Para la identificación específica de pentosas y hexosas, se utilizó el análisis mediante HPLC, las muestras de la sacarificación se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y posteriormente se filtraron con un disco de 0.45 micras de tamaño de poro. Se inyectó un volumen de 20 µL a un flujo de 0.6 mL/min usando agua como fase móvil.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1

6.1. Actividad 1. Arranque y operación de digestores anaerobios metanogénicos inoculadores

Se preparó un reactor metanogénico por duplicado utilizando la composición descrita en la sección 5.1 y diariamente se realizó la medición de biogás desplazado. Se llevó a cabo la alimentación gradual con FORSU hasta llegar a un TRM de 50 d y en este periodo la producción de metano se cuantificó dos veces por semana mediante cromatografía de gases. Las purgas de sólidos digeridos que se obtuvieron en el transcurso de cada alimentación se analizaron para determinar la composición de sólidos totales, volátiles, ceniza, alcalinidad, pH, ácidos orgánicos volátiles y nitrógeno total.



Figura 8. Preparación del inóculo mixto y digestores anaerobios metanogénicos.

El inóculo se preparó con 0.332 kg de excreta de vaca, 0.332 kg de lodos activados (sedimentos) y 0.332 kg de suelo de jardín (cribada con una malla # 35 para un diámetro de partícula de 0.5 mm). Se mezcló hasta obtener una consistencia homogénea y se pesaron 500 g por separado para las 2 unidades experimentales.

6.1.1. Evolución del pH y alcalinidad

Durante el transcurso de la metanogénesis se observó un intervalo de pH promedio de 8.9 en el reacto. Al final de la operación metanogénica, se presentaron los valores mayores de alcalinidad con 570 mg CaCO₃/Kg B.h., con respecto a trabajos anteriores s son altos, pues se ha considerado que 110 mg CaCO₃/g sólido de alcalinidad, es favorable para la metanogénesis (Valdész-Vazquez, 2009). Sin embargo, a pesar de la alta alcalinidad presentada en el reactor inoculador, no se observó unefecto negativo en la producción de metano. Por el contrario, se observó que la baja alcalinidad está relacionada con una menor producción de metano. En la figura 6, se muestra la variación del pH y la alcalinidad alo largo del tiempo de aclimiatación del inóculo.

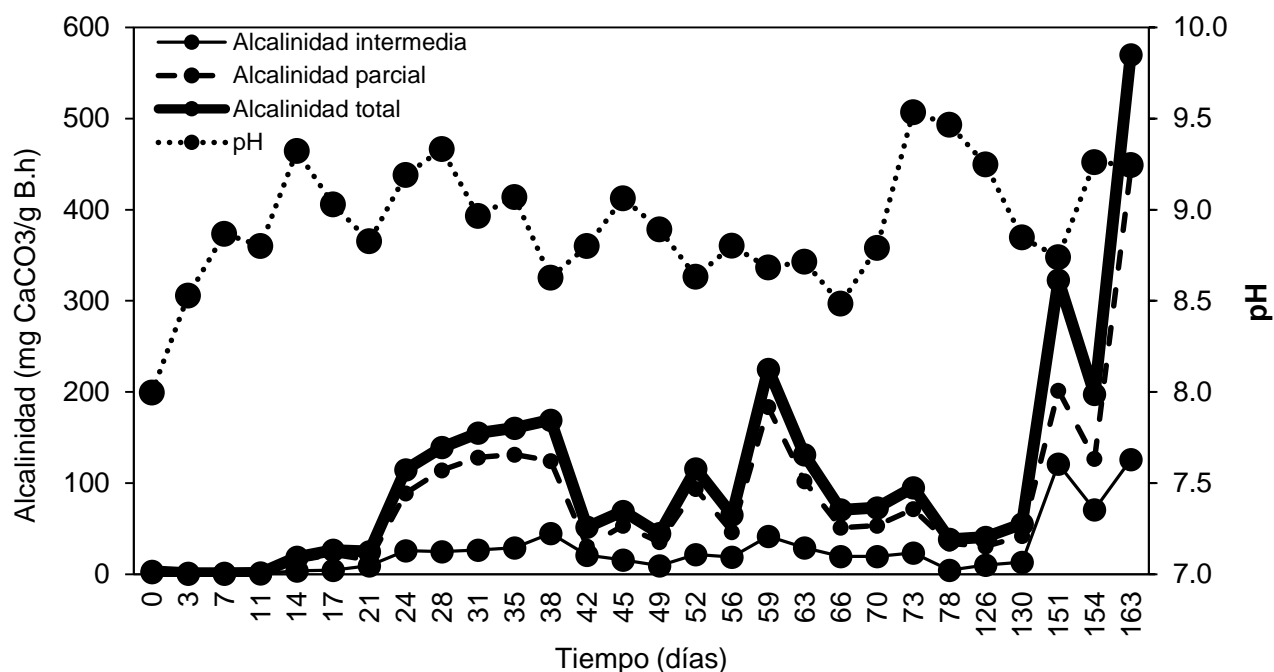


Figura 9. Evolución de la alcalinidad y pH en el reactor inoculador metanogénico.

6.1.2. Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y ceniza

Se realizó la determinación de sólidos totales, volátiles, ceniza y humedad, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, para este fin, se emplearon las purgas metanogénicas que se generaron antes de la alimentación periódica del reactor termofílico. En la tabla 17 se muestra el análisis de sólidos correspondiente, y su variación con respecto al tiempo de aclimatación del inóculo.

Tabla 17. Análisis proximal de sólidos en el reactor inoculador termofílico.

MES	ST	DS	SV	DS	HUM	DS	CENIZA	DS
1	34	2.33	20	2.31	66.20	2.28	80.31	2.35
2	30	6.04	24	5.69	69.60	6.04	76.74	5.69
3	21	2.92	30	7.18	78.79	2.92	69.58	7.18
4	8	2.01	42	11.79	92.33	2.01	58.33	11.79
5	10	5.01	31	14.23	90.22	5.01	68.75	14.23
6	12	3.01	26	5.53	88.26	3.01	74.17	5.53
7	15.00	4.00	24.00	3.70	85.00	2.90	76.00	4.8

6.1.3. Cuantificación de ácidos orgánicos volátiles en reactor inoculador termofílico

Se utilizó el sobrenadante de las purgas metanogénicas para hacer la cuantificación de ácidos orgánicos volátiles (acético, propiónico y butírico). En la figura 10, se observa la producción de ácidos orgánicos volátiles en el reactor inoculador con respecto al tiempo.

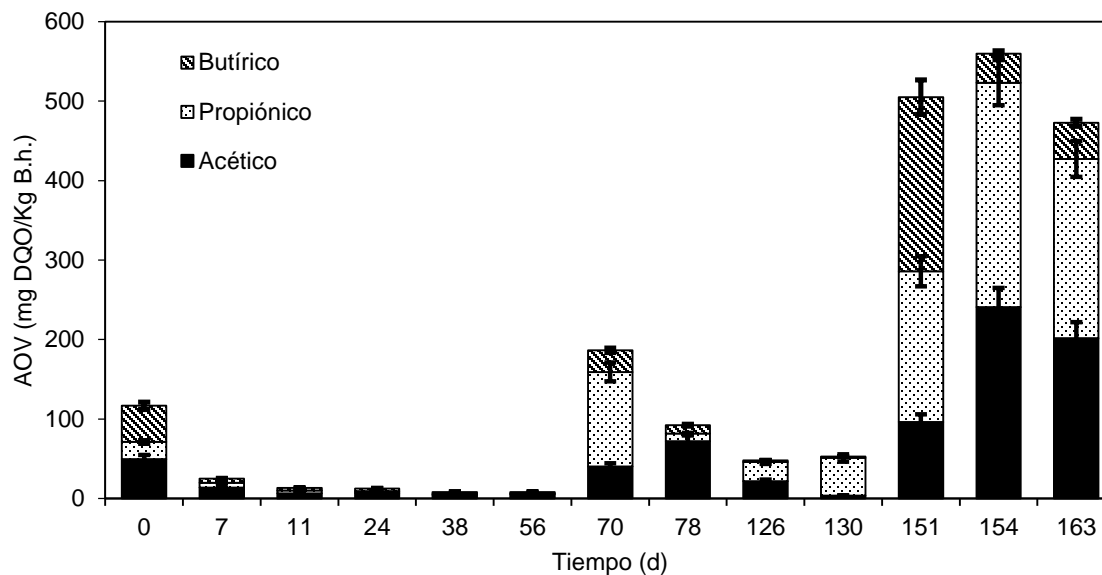


Figura 10. Contenido de ácidos orgánicos volátiles en el reactor inoculador operado en régimen termofílico.

Con el paso del tiempo, la acumulación de ácidos orgánicos estuvo en aumento considerable (>500 mg DQO/KgB.h), siendo el ácido propiónico, el mayor metabolito presente seguido del ácido acético. Esta acumulación de AOV's está relacionada con una mayor tasa de hidrólisis de las macromoléculas, por lo que se forman compuestos intermediarios de menor peso molecular, que llegan a ser reducidos hasta formar metano.

6.1.4. Determinación de nitrógeno total

El contenido inicial de nitrógeno total para el primer mes, fue de 9 mgN/gS en ambos reactores. Con el paso del tiempo la concentración de nitrógeno total aumentó hasta llegar arriba de los 30 mgN/gS. De acuerdo a Valdez-Vázquez et al., 2005, encontraron cerca de 2 mgN/gS en sólidos fermentados en reactores acidogénicos, sin embargo en este trabajo se obtuvieron concentraciones tres veces más altas aunque en

metanogénesis, por lo que no pueden compararse. En la figura 11 se presenta el contenido de nitrógeno total evaluado en el reactor metanogénico.

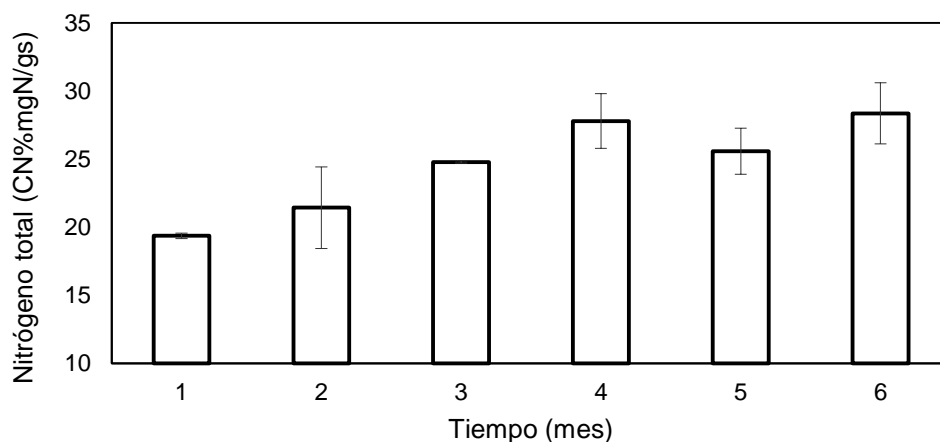


Figura 11. Evolución del contenido de Nitrógeno total Kjeldhal en el reactor inoculador

A lo largo de la operación termofílica a 55°C, el reactor presentó su mayor desplazamiento de gas a los 90 días, con 1089 NmL/. Sin embargo, se continuó en fase de mantenimiento para conseguir una estabilización de la producción de metano en forma continua. Al cabo de 7 meses, considerando el tiempo desde la fase de arranque, este reactor se sometió a inhibición por choque térmico a 93°C por espacio de 1 hora para lisar a las arqueas metanogénicas y hacer una presión selectiva de bacterias esporuladoras, que actúan en la fermentación y producen hidrógeno. En la figura 12 se observa la gráfica que corresponde a desplazamiento diario de biogás.

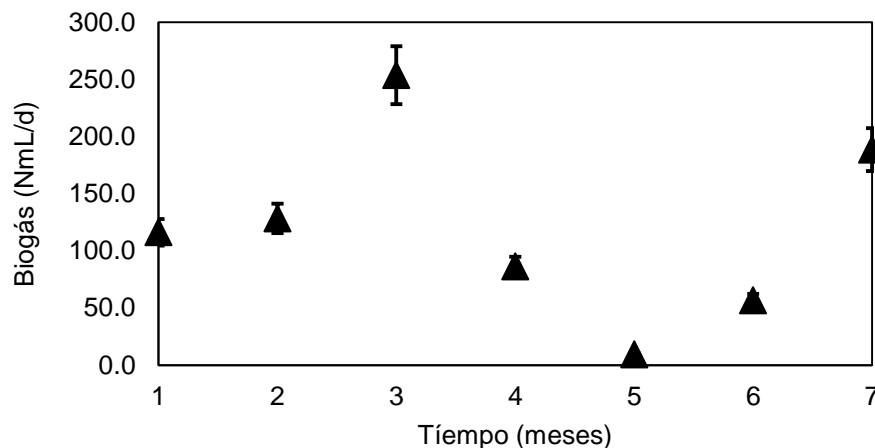


Figura 12. Desplazamiento de biogás promedio en el reactor metanogénico operado a 55°C hasta un TRM 50d.

6.1.5. Cuantificación de metano por cromatografía de gas

Se realizaron dos mediciones por semana, antes de cada alimentación al reactor. Al inicio de la operación se presentó una tendencia positiva ascendente en la producción de metano, sin embargo hubo una caída a los 35 días de producción, por lo que se continuó la alimentación con un TRM de 60 d, hasta estabilizar al reactor y alcanzar un mayor contenido de metano (> al 60%). En la figura 13, se muestra la gráfica del comportamiento del reactor inoculador metanogénico operado a 55°C. Después de 80 días de operación, se mantuvo estable la producción de metano, por un período de 40 días más.

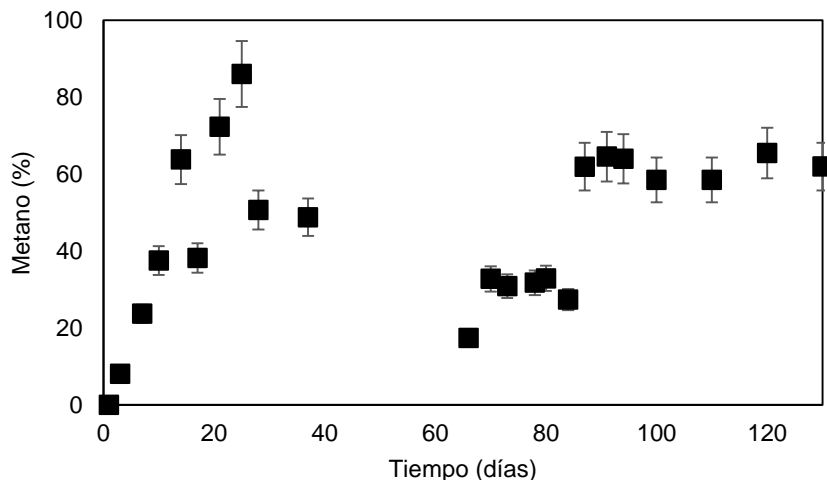


Figura 13. Producción de metano con respecto al tiempo en el reactor metanogénico bajo régimen termofílico 55°C con alimentación semi-continua hasta un TRM 50 d.

Una vez terminada la aclimatación del inóculo, se procedió a realizar la inhibición de las arqueas metanogénicas, mediante choque térmico a 95 °C por espacio de 1 h, este inóculo ya inhibido se utilizó para la actividad siguiente y producir los sólidos fermentados.

6.2. Actividad 2. Producción de hidrógeno por sistema en lote a partir de FORSU.

El propósito de esta actividad fue obtener los sólidos fermentados suficientes, para ser utilizados posteriormente como sustrato en la producción de holocelulasas. Los reactores se mantuvieron en operación por lote durante 30 días a una temperatura mesofílica. La cuantificación de ácidos orgánicos se muestra en la figura 14, se observó una tendencia a la fermentación acética, pues al final de la misma los valores de ácido acético aumentaron con respecto a su concentración inicial (de 4 mgDQO/Kg B.seca pasó a 37 mgDQO/Kg B.seca). Por el contrario, hubo una disminución en el

contenido de ácidos butírico, al pasar de 43.74 mgDQO/Kg B.seca a 11.31 mgDQO/Kg B.seca.

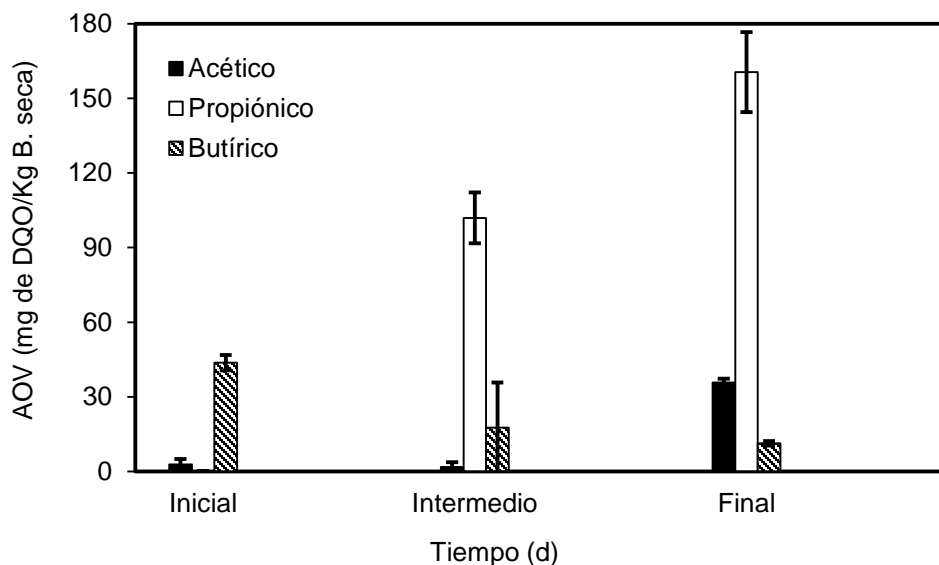


Figura 14. Producción de ácidos orgánicos volátiles en fermentación oscura por lote a partir de FORSU

6.3. Actividad 3. Obtención de holocelulasas empleando la cepa *Trichoderma reesei* MCG 80 y sólidos fermentados residuales de la producción de hidrógeno.

La mayor actividad volumétrica de FPasa se encontró a las 96 h de la cinética de crecimiento, obteniéndose hasta 375.6 U/L de actividad, utilizando FORSU como fuente de carbono. En el caso de los sólidos fermentados, la mayor actividad volumétrica se presentó a las 120 h con 220 U/L. En la figura 15, se muestra la actividad específica de FPasa, crecida a partir de distintas fuentes de carbono.

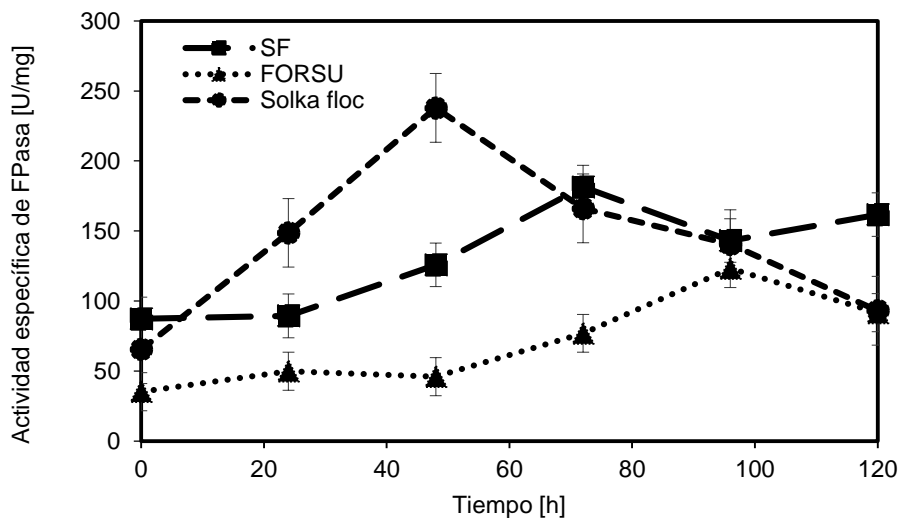


Figura 15. Actividad enzimática específica de celulasas (mediante ensayo en papel filtro) obtenidas en cultivo sumergido utilizando *Trichoderma reesei* MCG 80, empleando distintos sustratos como fuente de carbono.

Con respecto a las xilanasas, se observó una mayor actividad volumétrica utilizando FORSU y sólidos fermentados con 5.3 U/mL a las 96 h; en la figura 16 se presenta la tendencia en la actividad de xilanasas, a partir de tres fuentes de carbono distintas.

Si bien la actividad FPasa y xilanolítica fueron bajas, con respecto a trabajos anteriores (Escamilla-Alvarado, 2013), se presentó una tendencia semejante en el comportamiento de ambas enzimas.

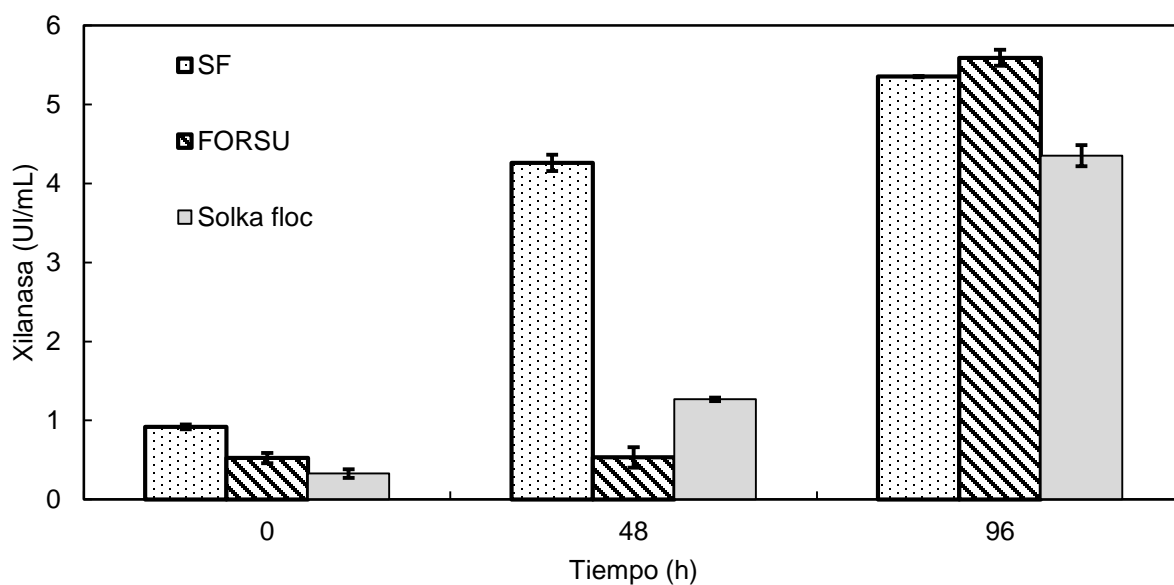


Figura 16. Actividad xilanasas de *T. reesei* MCG 80, a partir de cultivos sumergidos con distinta fuente de carbono.

Las cinéticas posteriores se realizaron utilizando como sustrato los sólidos fermentados de la producción de hidrógeno; a lo largo de las cinéticas se obtuvieron datos similares, aunque con un ligero aumento en la actividad de la enzima, alcanzando en promedio hasta 547 U/L a las 96 h de crecimiento. En la figura 17, se presentan la actividad volumétrica y específica para FPasa, a partir del crecimiento de *T. reesei* MCG 80 en sólidos fermentados.

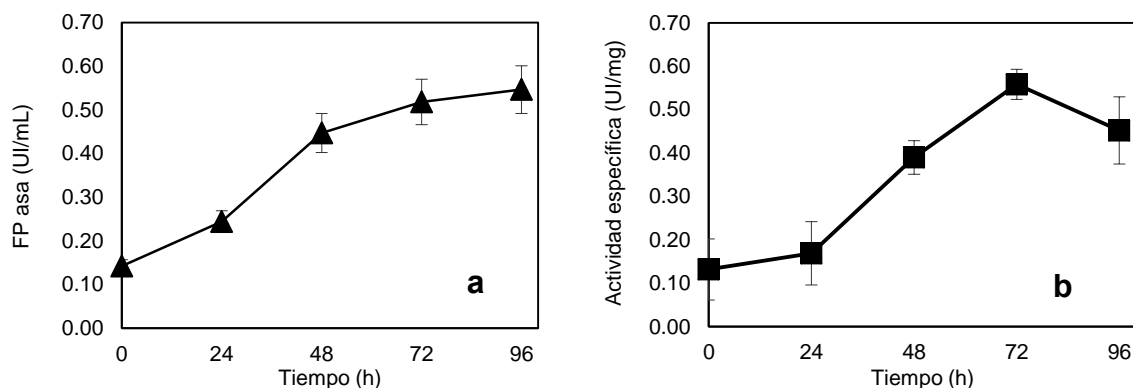


Figura 17. a) Actividad volumétrica de FPasa, a partir de cultivos sumergidos con *T. reesei* MCG 80, utilizando sólidos fermentados 3% (p/v). b) Actividad específica de FPasa, obtenida bajo las condiciones antes descritas.

Todos los sólidos que se generaron (biomasa y sustrato residual, llamados X_z) a partir de las cinéticas con *Trichoderma reesei* MCG 80 se recolectaron mediante centrifugación a 7,000 rpm por espacio de 20 minutos. Esta masa fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fue objeto de pretratamiento en la actividad posterior.

En la tabla 18 se presentan los resultados promedio obtenidos en las cinéticas con *Trichoderma reesei* MCG 80.

Tabla 18. Valores obtenidos a partir de la cinética de crecimiento y producción de celulasas con *T. reesei* MCG 80 y sólidos fermentados como sustrato.

Tiempo (h)	P. total (g/L)	DS	P. soluble (g/L)	DS	UI (U/mL)	DS
0	1.517	± 0.110	1.080	± 0.071	0.142	± 0.048
24	2.175	± 0.155	1.443	± 0.059	0.244	± 0.001
48	2.569	± 0.210	1.146	± 0.020	0.447	± 0.009
72	3.353	± 0.287	0.928	± 0.195	0.518	± 0.007
96	5.727	± 0.105	1.209	± 0.266	0.547	± 0.030

6.4. Actividad 4. Pretratamiento de la corriente residual Xz para la selección del mejor método en función de la degradabilidad de celulosa y contenido de lignina.

Lós sólidos Xz que se recuperaron después de las cinéticas con *T. reesei* MCG 80, fueron sometidos a tres pretratamientos, dos de naturaleza alcalina y uno mediante tratamiento ácido diluido.

Las soluciones alcalinas empleadas fueron NaOH 1M y Na₂CO₃ 1M, para el tratamiento ácido diluido se utilizó una solución de HCl al 1.5% (%v/v); las condiciones de tiempo y temperatura, así como la relación de masa y reactivo, fueron las mismas en los tres casos (sección 5.4).

Al término del pretratamiento, las muestras se lavaron y neutralizaron a un pH de 7.0, después se secaron en estufa a 60 °C durante 24 h hasta su deshidratación total.

Posteriormente se molieron con ayuda de un mortero y a estas se les realizaron análisis de celulosa y lignina.

En la figura 18, se presentan los reultados de los análisis de celulosa, que se obtuvieron a partir de muestras pretatadas de FORSU, sólidos fermentados (SF), sólidos Xz, y sólidos Xz sometidos a los tres pretratamientos.

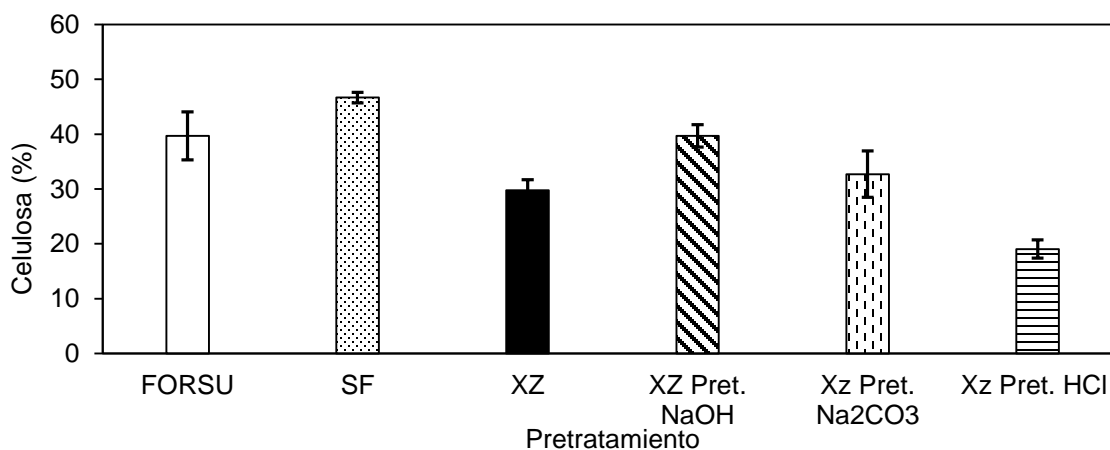


Figura 18. Contenido de celulosa en FORSU y otras corrientes derivadas de la biorrefinería. SF: Sólidos fermentados; Xz: residuos sólidos de etapa Z, así como esta fracción sometida a pretratamientos.

En el caso de los pretratamientos alcalinos, se observaron resultado favorables, que indican una mayor disponibilidad de la celulosa, con respecto al control Xz que no fue sometido a pretratamiento. Al utilizaro NaOH 1M se presentó el mayor incremento aparente en la celulosa (de 29.75 a 39.7 %), de aproximadamente 30%, este aumento es casi comparable a la cantidad de celulosa que se encuentra en la muestra de sólidos fermentados (46.7%), por lo que aparentemente puede tener el mismo potencial, que éste último.

El efecto positivo de los pretratamiento alcalinos puede deberse a que la remoción de lignina es más favorable empleando estas condiciones. En el caso de los tratamientos ácidos, son más efectivos removiendo hemicelulosa, por lo que la lignina permanece intacta y aparentemente se concentra. En la figura 19, se muestran los resultados de los análisis de lignina en las muestras pretratadas y el control Xz sin pretratar.

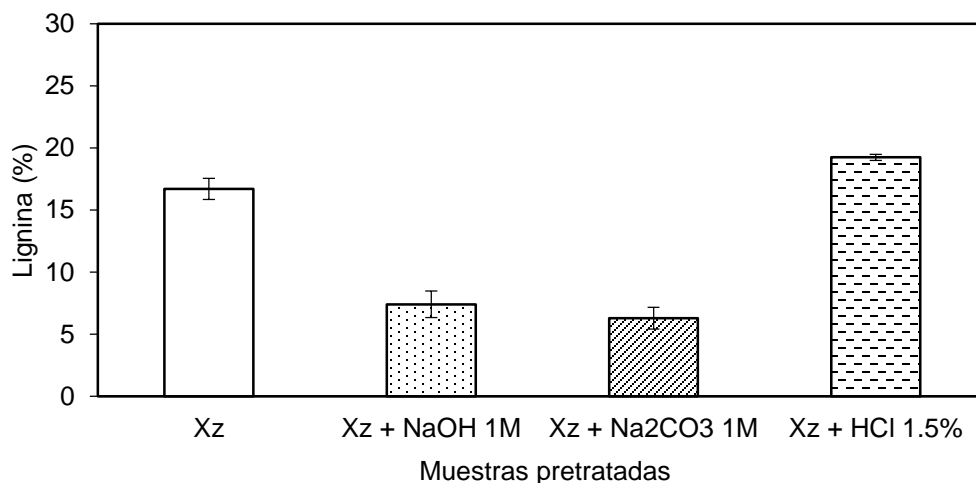


Figura 19. Efecto del tipo de pretratamiento sobre la remoción de lignina, en muestras de Xz.

Posterior a los pretratamientos, todas las muestras fueron observadas por microscopía electrónica de barrido para distinguir el efecto sobre las fibras pretratadas. En la figura 20 se presentan las muestras de Xz antes de ser pretratadas.

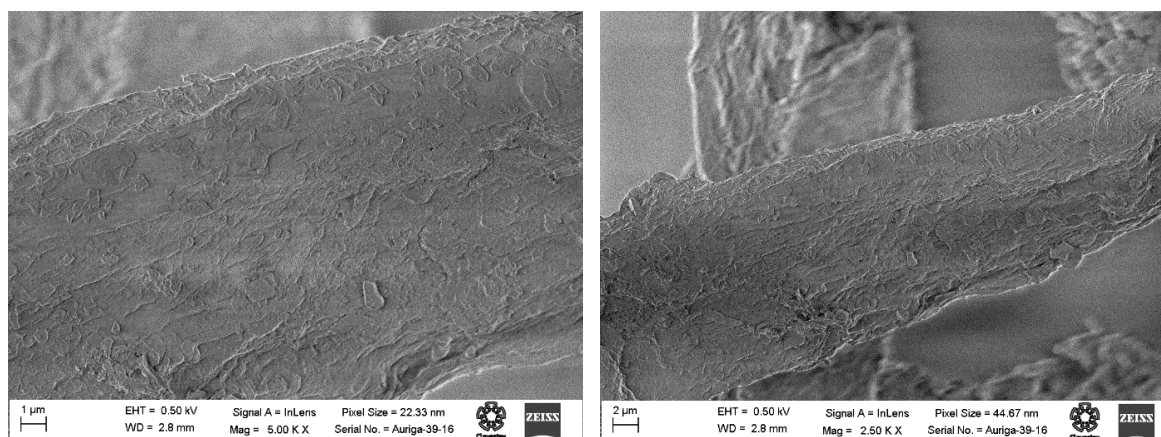


Figura 20. Imágenes de SEM (Microscopía electrónica de barrido), a las fibras del residuo Xz antes de ser pretratadas.

En estas imágenes no se aprecian zonas amorfas, a diferencia de las muestras sometidas a los pretratamientos alcalinos (Figuras 21 y 22).

En la figura 21, se observa la topografía de la fibra con zonas amorfas, como resultado del rompimiento de los enlaces C-C y C-O de la lignina, lo cual da como resultado la

liberación de moléculas de menor tamaño y el acceso a la celulosa para formar una estructura irregular.

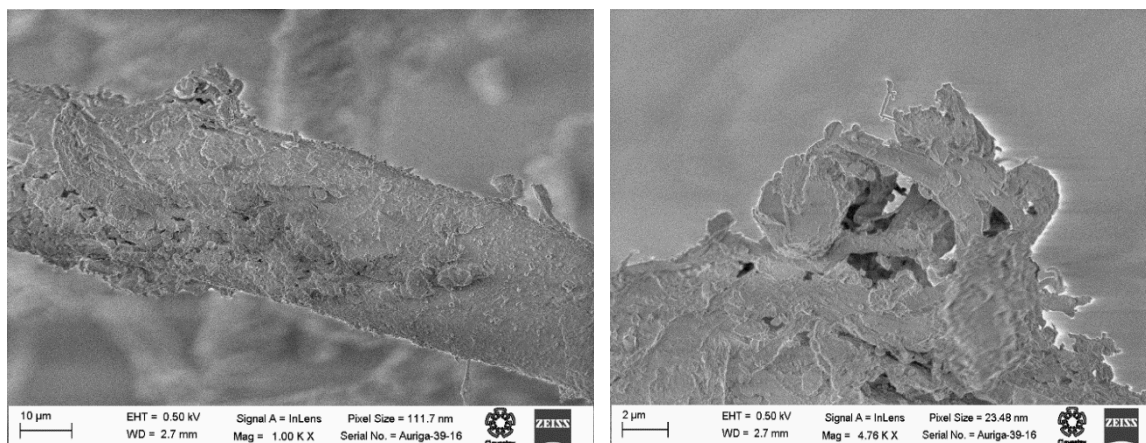


Figura 21. Imágenes correspondiente a la fracción Xz después del pretratamiento con NaOH 1M.

En la figura 22, que corresponde al tratamiento con Na₂CO₃ 1M, también se generaron zonas amorfas en las fibras, al igual que con el tratamiento con NaOH 1M.

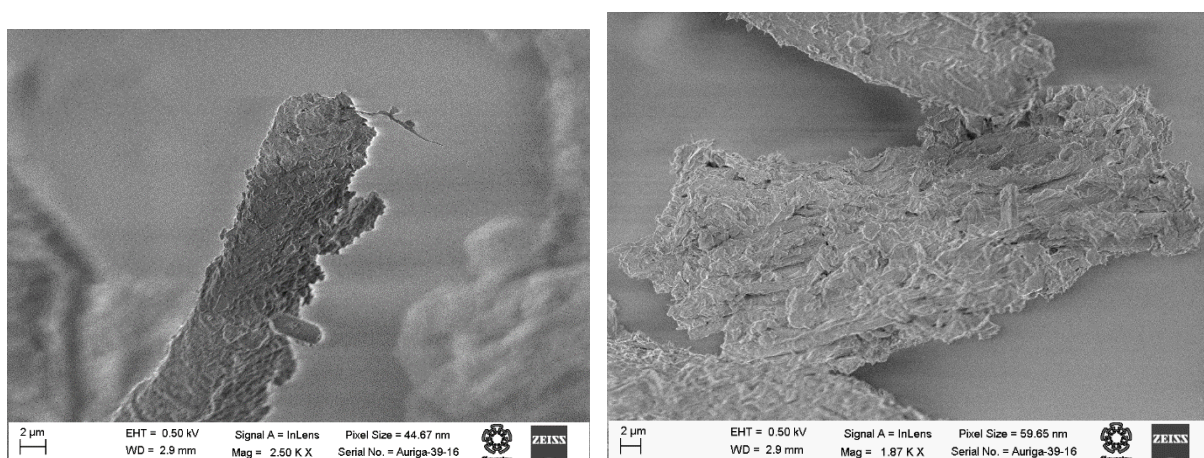


Figura 22. Fibras de Xz vistas desde el microscopio electrónico de barrido, después de ser pretratadas con Na₂CO₃ 1M.

A diferencia de los tratamientos alcalinos, en el tratamiento ácido diluido no se presentaron cambios en la estructura de la fibra, debido a que el ácido sólo remueve hemicelulosa. Por lo que su apariencia (Figura 23) permaneció igual, si se compara con el la muestra Xz que no ha sido sometida a pretratamiento.

El estudio de las muestras por microscopía electrónica, permitió hacer una comparación de los resultados obtenidos con las determinaciones de celulosa y lignina y así poder seleccionar el tratamiento más adecuado. Considerando que la mayor remoción se obtuvo con uno de los tratamientos alcalinos, al igual que la disponibilidad de celulosa mejoró con el tratamiento con NaOH 1M, se seleccionó a éste último para realizarel

pretratamiento a todo el lote de sólidos residuales Xz, que se recuperaron de la producción de holocelulasas.

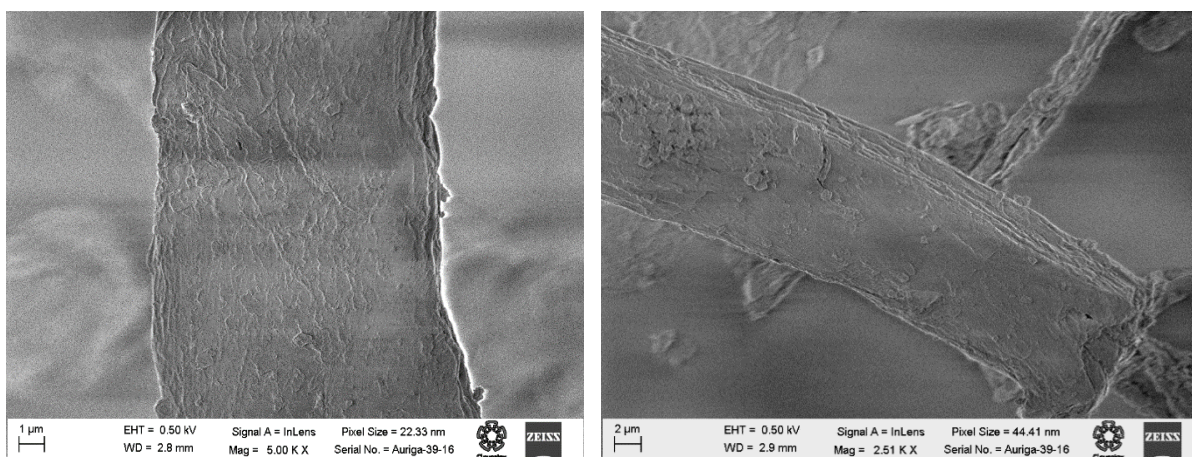


Figura 23. Imágenes de las muestras de Xz después de ser sometidas a un pretratamiento ácido diluido con HCl 1.5%.

6.5. Actividad 5. Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de los sólidos residuales pretratados de la corriente Xz.

Para la fermentación oscura y producción de hidrógeno, se emplearon reactores por lote, utilizando como sustrato los sólidos pretratados Xz, con el método alcalino NaOH 1M, bajo las condiciones descritas en la actividad 4. Se realizó la caracterización de los sustratos, para evaluar el contenido de sólidos en cada tratamiento (T1-T5). En la tabla 19, se muestra el análisis correspondiente por tipo de composición.

Tabla 19. Análisis proximal a partir de muestras de sólidos de cada tratamiento en la etapa inicial de la producción de hidrógeno en reactor por lote FASSH-VI

Tratamiento	ST	DS	HUM	DS	SV	DS	CENIZA	DS
T1	23.59	±0.52	76.41	±0.52	61.02	±1.25	38.98	±1.25
T2	23.11	±0.23	76.89	±0.23	42.52	±0.97	57.48	±0.97
T3	23.35	±0.62	76.65	±0.62	52.33	±12.27	47.67	±12.27
T4	23.07	±0.85	76.93	±0.85	60.19	±1.33	39.81	±1.33
T5	22.82	±0.26	77.18	±0.26	57.60	±2.25	42.40	±2.25

El mayor contenido en sólidos volátiles, se presentó en los tratamientos T1, T4 y T5, que corresponden a los reactores con FORSU (T1), FORSU 60% más 40% de Xz

pretatado con NaOH 1M (T4) y FORSU 60% más 40% de Xz in pretratar. Los valores más bajos en este aspecto, se obtuvieron en el tratamiento con Xz pretratado 100% con NaOH 1M (T2); lo anterior puede deberse a que hubo una degradación mayor de otro tipo de carbohidratos y moléculas orgánicas durante el pretratamiento y la materia restante quedó en poca disponibilidad al ser menos compleja o rica. La caracterización de los sustratos se realizó antes de su incubación a régimen mesofílico (35 °C). una vez terminada la cinética de producción de hidrógeno, se realizó el análisis de la materia orgánica restante al final del experimento.

Producción de hidrógeno por reactor en lote tipo FASSH-VI

La cinética de producción de hidrógeno fue monitoreada diariamente, y al cabo de 30 días, se observó un comportamiento favorable en los tratamientos T1, T3 y T4 en los primeros 2 ciclos de producción (primeros 15 días); al realizar el venteo de los reactores con nitrógeno para volver a estimular un nuevo ciclo de producción, al siguiente día se observó el comienzo de una nueva etapa de producción.

Este efecto se debe a que es liberado una parte del espacio gaseoso en los reactores, ya que hay una acumulación en exceso de hidrógeno (en la etapa estacionaria), por lo que hay un fenómeno de inhibición por producto. Al liberar la presión de hidrógeno, mediante la adición de nitrógeno gaseoso, se vuelve a comenzar un nuevo ciclo.

En la figura 24, se presenta la cinética de producción de hidrógeno por sistema en lote de tipo FASSH-VI. En esta se puede observar que hasta el tercer ciclo, hay una respuesta positiva del tratamiento T1 y T4, siendo éste último de mayor interés al estar compuesto por un 40% de sólidos Xz pretratados.

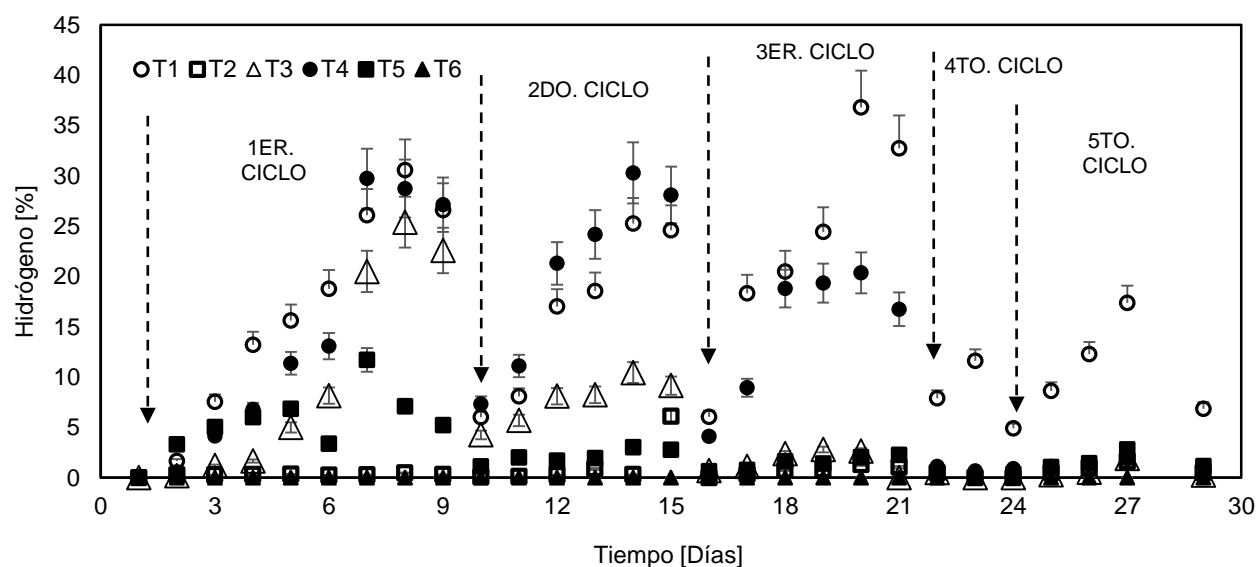


Figura 24. Cinética de producción de hidrógeno por reactor en lote tipo FASSH-VI, empleando diferente sustrato y composición.

Cabe señalar, que en los reactores T5 hubo una moderada producción de hidrógeno, aunque esto no continuó durante el segundo ciclo. En el caso del tratamiento T2, en

ninguna etapa de la cinética se presentaron valores de hidrógeno superiores al 2. Lo anterior se puede deber a que hay una baja disponibilidad de la materia orgánica, a pesar de que se haya empleado 100% de Xz pretratado con NaOH 1M como sustrato. La eliminación de otros componentes orgánicos en el sustrato, influyó en su baja productividad.

6.6. Actividad 6. Producción de sacarificados empleando sólidos residuales pretratados de Xz como sustrato.

Para esta actividad, se utilizó el mismo residuo Xz pretratado con NaOH 1M, y el extracto crudo enzimático de celulasas, obtenidas con *T.reesei* MCG 80. La sacarificación se realizó por 48 h a 50 ° bajo las siguientes concentraciones de sustrato: 1, 3, 5% (%p/v) y con una relación de unidades de enzimas FPasa de la siguiente forma: 0, 3, 5 y 7 U/mL.

Se tomaron muestras al inicio y al término de la sacarificación, con lo que se obtuvo la cantidad neta de azúcares reductores. En la figura 25, se muestra que la mayor cantidad de azúcares reductores (1.4 g/L) se obtuvo con 3 U/mL de FPasa y una concentración de 5% de sustrato.

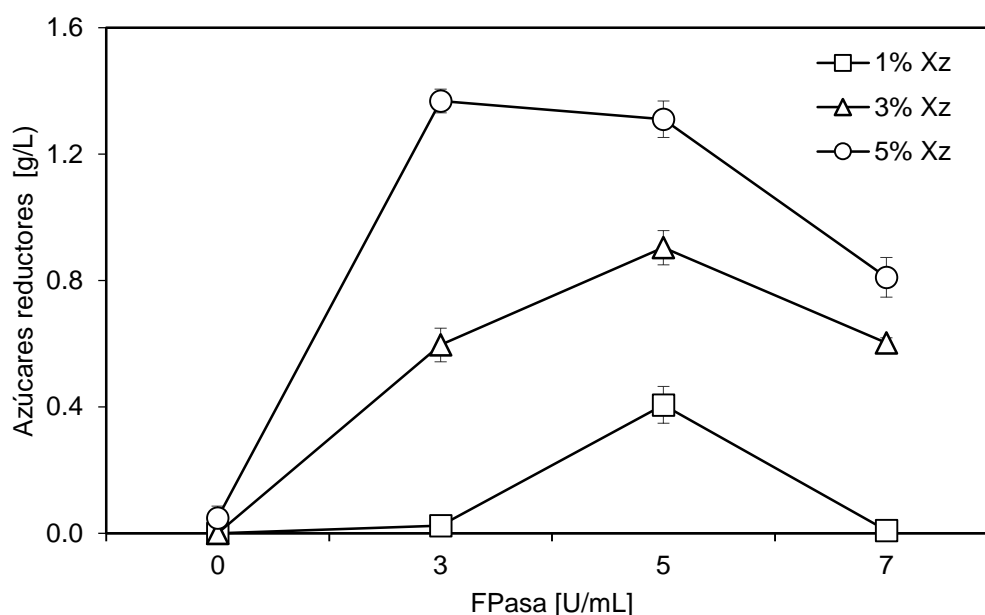


Figura 25. Efecto de la concentración de enzima (FPasa (U/mL) y de sustrato Xz, pretratado con NaOH 1M, durante 48 h de sacarificación a 50 °C, empleando el extracto concentrado de celulasas de *T. reesei* MCG 80.

Con respecto al contenido de azúcares, al analizar las muestras en el YSI, se obtuvieron 0.29 g/L de xilosa, que corresponden a los valores más altos, utilizando una concentración de 3% de sustrato.

Cabe mencionar, que en ninguno de los reactores se presentó glucosa, por lo que se dedujo que había presencia de otro tipo de oligosacáridos que interfirieron en las cuantificaciones de azúcares reductores.

Sin embargo, las muestras resultantes de este experimento que fueron analizadas por HPLC, solo detectaron xilosa y no hubo correspondencia de los cromatogramas, al ser comparados con estándares de celooligosacáridos y xilooligosacáridos.

7. CONCLUSIÓN

El tratamiento alcalino resultó el más favorable al remover la mayor cantidad de lignina y mejorar la disponibilidad de celulosa, en los sólidos pretratados Xz. Hubo una disminución, en el contenido de lignina al pasar de 17% al 6%, posterior al pretratamiento. Por lo cuál la hipótesis sobre el efecto positivo del pretratamiento alcalino se acepta.

Así mismo, se observó un comportamiento favorable en la producción, en uno de los tratamientos que contenía una fracción de sólidos pretratados (T4). Por lo que la incorporación del pretratamiento en esta corriente residual, permitió la reutilización de un residuo (Xz), y además aumentó los ciclos de generación de hidrógeno, de forma muy semejante a la que se presentó con el control de FORSU. Es decir, el residuo Xz sometido a pretratamiento alcalino, es aprovechable para la fermentación oscura, bajo las condiciones del tratamiento T4. Por lo anterior, se acepta la segunda hipótesis sobre el incremento en la producción de hidrógeno, mediante el pretratamiento de los sólidos Xz residuales.

En el caso de los sacarificados, si bien hay una baja producción de azúcares (1.4 g/L), estos son obtenidos de un sustrato que es de naturaleza pobre, ya que ha sido sometido a varios procesos de degradación (fermentación oscura, producción de enzimas y pretratamiento). Por lo que su reutilización es factible, aunque debe considerarse su composición y la presencia de otros componentes que puede resultar tóxicos o inhibidores de algún proceso. La presencia de xilosa, y otros azúcares no detectados, sugieren la exploración de estos residuos o licores, para poder ser incorporados a alguna etapa de la biorrefinería. En este caso, la hipótesis debe ser rechazada, ya que comparando con el proceso tradicional de sacarificación utilizando sólidos fermentados, se obtuvieron bajos resultados.

8. Referencias

1. Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert TI, Dale BE (2005) Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotechnol* 124: 1133-1141.
2. Alves HJ, Bley Junior C, Niklevicz RR, Frigo EP, Frigo MS, Coimbra-Araújo CH. Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. *Int J Hydrogen Energy* 2013; 38:5215–25.
3. Antognoni S, Ragazzi M, Rada EC, Plank R, Aichinger P, Kuprian M, Ebner Ch (2013) Potential Effects of Mechanical Pre-treatments on Methane Yield from Solid Waste Anaerobically Digested. *Int J Environ Biorem Biodeg* 1:20-25.
4. Balat M. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33:4013–29.
5. Barakat A, Monlau F, Steyer JP, Carrere H (2012) Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour Technol* 104: 90-99.
6. Bisaria VS (1991) Bioprocessing of agro-residue to glucose and chemicals. In: Martin AM (ed) *Bioconversion of waste materials to industrial products*. Elsevier, London, pp 187–223.
7. Bridgewater AV. Principles and practice of biomass fast pyrolysis processes for liquids. *J Anal Appl Pyrolysis* 1999; 51:3–22
8. Bru K, Blazy V, Joulian C, Trably E, Latrille E, Quéméneur M, Dictor MC (2012) Innovative CO₂ pretreatment for enhancing biohydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Int J Hydrogen Energy* 37: 14062-14071.
9. Cai, M., Liu, J., Wei Y (2004) Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environ Sci Technol* 38: 3195-3202.
10. Carrasco, JE, Saiz MC, Navarro A, Soriano P, Saez F, Martinez JM (1994) Effects of dilute-acid and steam explosion pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Appl Biochem Biotechnol* 45: 23-34
11. Cesaro A, Belgiorno V (2014) Pretreatment methods to improve anaerobic biodegradability of organic municipal solid waste fractions. *Chem Eng J* 240: 24-37.
12. Chairattananokorn P, Tapananont S, Detjaroen S, Sangkhatim J, Anurakpongsatorn P, Sirirote P (2012) Additional Paper Waste in Pulping Sludge for Biohydrogen Production by Heat-Shocked Sludge. *Appl Biochem Biotech* 166: 389-401.
13. Cheng J, Lin R, Ding L, Song W, Li Y, Zhou J, Cen K (2015) Fermentative hydrogen and methane cogeneration from cassava residues: Effect of pretreatment on structural characterization and fermentation performance. *Bioresour Technol* 179: 407-413.
14. Chiamonti D, Prussi M, Ferrero S, Oriani L, Ottonello P, Torre P, Cherchi F (2012) Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy* 46: 25-35.
15. Das D, Khanna N, Veziroglu N (2008). Recent developments in biological hydrogen production processes. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 14 (2): 57-67.

16. Das D, Veziroglu T. Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33:6046–57.
17. Demirbas, A. (2010). Biorefineries for biomass upgrading facilities. ISSN 1865-3529. DOI 10.1007/978-1-84882-721-9.
18. Duarte LC, Silva-Fernandes T, Carneiro F, Gírio FM (2009) Dilute Acid Hydrolysis of Wheat Straw Oligosaccharides. *Appl. Biochem Biotechnol*, 15, 15: 116-126.
19. Ekman A, Campos M, Lindahl S, Co M, Börjesson P, Nordberg Karlsson, Turner C. (2013). Bioresource utilisation by sustainable technologies in new value-added biorefinery concepts-two case studies from food and forest industry. *Journal of cleaner production*; 57: 46-58
20. Escamilla-Alvarado C (2009) Proceso integrado para producción de energía y enzimas a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. México: Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
21. Escamilla-Alvarado, C., Vázquez-Barragán, J. A., Ponce-Noyola, M. T., Poggi-Varaldo, H. M. A novel biorefinery approach for biofuels and holocellulolytic enzymes production from organic wastes. (2011) a. *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. 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.
22. Escamilla-Alvarado C, Poggi-Varaldo HM, Ponce-Noyola MT. (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.
23. Escamilla-Alvarado C, Poggi-Varaldo HM, Ponce-Noyola T, Ríos-Leal E, Robles-Gonzalez I, Rinderknecht-Seijas N (2015) Saccharification of fermented residues as integral part in a conceptual hydrogen-producing biorefinery. *IntJ Hydrogen Energy* doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.164.
24. Eveleigh DE, Mandels M, Andreotti R, Roche Ch (2009). Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnology for biofuels*. Commentary 2:21.
25. Galbe M, Zacchi G (2012) Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg* 46: 70-78.
26. George A, Brandt A, Tran K, Zahari MS, Marcuschamer DK, Sung N, Sathitsuksanoh N, Shi J, Stavila V, Parthasarathi R, Singh S, Holmes BM, Welton T, Simmons BA, Hallett JP (2015) Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment. *Green Chem* 1728-1734.
27. Ghatak HR (2011) Biorefineries from the perspective of sustainability: feedstocks, products and processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:4042-4052.
28. Ghimire A, Valentino S, Frunzo L, Trably E, Escudie E, Pirozzi F, Lens P, Esposito G (2015) Biohydrogen production from food waste by coupling semi-continuous dark-photofermentation and residue post-treatment to anaerobic digestion: A synergy for energy recovery. *International Journal of Hydrogen Energy*, In press.
29. Ghose TK (1987) Measurement of cellulose activities. *Pure & Appl.Chem* 59: 257-268.

30. Guo XM, Trably E, Latrille E, Carrère H, Steyer J-P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *Int J Hydrogen Energy* 2010; 35:10660–73.
31. Gupta R, Khasa YP, Kuhad RCH (2011) Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydrate polymers* 84: 1103-1109.
32. Hallac BB, Sannigrahi P, Pu Y, Ray M, Murphy RJ, Ragauskas AJ. (2010) Effect of ethanol organosolv pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Buddleja davidii* stem biomass. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49: 1467-1472.
33. Hay JXW, Wu TY, Juan JC, Jahim JM (2015) Improved biohydrogen production and treatment of pulp and paper mill effluent through ultrasonication pretreatment of wastewater. *Energ Conv Manage* 106: 576-583.
34. Heitz M, Capek-Ménard, E, Koeberle PG, Gagné J, and Chornet, E (1991) Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresour Technol* 35: 23-32
35. Heo NH, Park SC, Lee JS, Kang H (2003) solubilization of waste activated sludge by alkaline pretreatment and biochemical methane potential (BMP) tests for anaerobic co-digestion of municipal organic waste. *Water Sci Technol* 48(8): 211-219.
36. Hernandez JE, Edyvean RGJ (2008) Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *J Hazard Mater* 160: 20-28.
37. Jia X, Li M, Xi B, Zhu C, Yang Y, Xia T, Song C, Pan H (2014) Integration of fermentative biohydrogen with methanogenesis from fruit vegetable-waste using different pre-treatments. *Energ Convers Manage* 88: 1219-1227.
38. Kajaste R. (2014). Chemicals from biomass-managing greenhouse gas emissions in biorefinery production chains-a review. *Journal of cleaner production*; 75:1-10.
39. Kamm, B., Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 137–145. DOI 10.1007/s00253-003-1537-7.
40. Kautto J, Realff M, Ragauskas AJ (2013) Design and simulation of an organosolv process for bioethanol production. *Biomass Conv. Bioref.* 3: 199-212.
41. Kim DH, Kim SH, Shin HS (2009) Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology* 45:181-187.
42. Kiran EU, Trzcinski AP, Liu Y (2015) Enhancing the hydrolysis and methane production potential of mixed food waste by an effective enzymatic pretreatment. *Bioresour Technology* 183: 47-52.
43. Kopp J, Müller J, Dichtl N, Schwedes J (1997). Anaerobic digestion and dewatering characteristics of mechanically disintegrated sludge. *Water Sci. Technol* 36: 129–136.
44. Kotay SM, Das D. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:258–63
45. Kothari R, Singh DP, Tyagi VV, Tyagi SK. Fermentative hydrogen production – an alternative clean energy source. *Renew Sustain Energy Rev* 2012; 16:2337–46.

46. Leañó EP, Babel S (2012) Effects of pretreatment methods on cassava wastewater for biohydrogen production optimization. *Renew Energ* 39: 339-346.
47. Li C, Fang HHP. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2007; 37:1-39.
48. Lin Y, Wang D, Wu S, Wang C (2009) Alkali pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge. *J Hazard Mater* 170: 366-373.
49. Lin R, Cheng J, Ding L, Song W, Zhou J, Cen K (2015) Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. *Bioresource Technology* 196: 250-255.
50. Liu J, Cai Y, Liao X, Huang Q, Hao Z, Hu M, Zhang D (2012) Simultaneous laccase production and color removal by culturing fungus *Pycnoporus* sp. SYBCL3 in a textile wastewater effluent supplemented with a lignocellulosic waste *Phragmites australis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 269-273.
51. Liu J, Wang ML, Tonnis B, Habteselassie M, Liao X, Huang Q (2013) Fungal pretreatments of switchgrass for improved saccharification and simultaneous enzyme production. *Bioresour Technol* 135: 39-45.
52. Liu S, Li X, Wu S, He J, Pang Ch, Deng Y, Dong R (2014) Fungal pretreatment by *Phanerochaete chrysosporium* for Enhancement of Biogas Production from Corn Stover Silage. *Appl Biochem Biotech* 174: 1907-1918.
53. Liu Z, Zhang Ch, Wang L, He J, Li B, Zhang Y, Xing X (2015) Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. *Bioresour Technol* 175: 152-159.
54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
55. Mandels M, Hontz LI, Nystrom J. (1974). Enzymatic Hydrolysis of Waste Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 16:1471-1493.
56. Menon V, Rao M (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38: 522-550.
57. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31 (3): 426-428.
58. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96:673-686 28.
59. Muñoz-Páez, K.M., Robledo-Narváez, P., Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Poggi-Varaldo, H.M., Rinderknecht-Seijas, N., Philippis, R. (2011). A review on biohydrogen from heterotrophic photofermentation. *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. 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.
60. Muñoz-Páez, K.M., Ríos-Leal, E., Valdez-Vazquez, I., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2012) Re-fermentation of washed spent solids from batch hydrogenogenic fermentation for additional production of biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *Journal of Environmental Management* 95: 355-359.

61. Muñoz-Paez KM, Poggi-Varaldo HM, García-Mena J, Ponce-Noyola MT, Ramos-Valdivia AC, Barrera-Cortés J, Robles-González IV, Ruiz-Ordaz N, Villa-Tanaca L, Rinderknecht-Seijas N (2014) Cheese Whey as substrate of batch hydrogen production: effect of temperature and addition of buffer. *Waste Management and Research* 32(5): 434-440.
62. Mussoline W, Giovanni E, Giordano A, Lens P (2012) The anaerobic digestion of rice straw – a review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 43:895–915.
63. Nanda S, Mohammad J, Reddy NS, Kozinski JA, Dalai AK (2014) Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. *Biomass Conv Bioref* 4:157-191.
64. Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Oliva JM, Cabañas A, Ballesteros M (2003) Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. *Appl Biochem Biotech* 105-108.
65. Ntaikou I, Antonopoulou G, Lyberatos G (2010) Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste Biomass Valor* 1: 21-39.
66. Parawira W (2012) Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Crit Rev Biotechnol* 32: 172-186.
67. Poggi-Varaldo, H.M., Trejo-Espino, J., Fernández-Villagómez, G., Esparza-García, F., Caffarel-Méndez, S., Rinderknecht-Seijas, N. (1999) Quality of anaerobic compost for soil amendment. *Water Sci Technol* 40(11/12):179–186.
68. Poggi-Varaldo HM, Muñoz-Paez KM, Escamilla-Alvarado C, Robledo-Narváez PN, Ponce-Noyola MT, Calva-Calva G, Ríos-Leal E, Galíndez-Mayer J, Estrada-Vázquez C, Ortega-Clemente A, Rinderknecht-Seijas NF (2014) Biohydrogen, Biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: a review. *Waste Manage Res*. DOI: 10.1177/0734242X14529178
69. Prasad S, Singh A, Joshi HC (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Res Conserv Recycl* 50:1–39. doi:10.1016/j.resconrec.2006.05.007.
70. Prabhudessai V, Salgaonkar B, Braganca J, Mutnuri S (2014) Pretreatment of Cottage Cheese to Enhance Biogas Production. *Bio Med Res Int* doi/10.1155/2014/374562.
71. Ren N, Guo W, Liu B, Cao G, Ding J (2011) Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Curr Opin Biotechnol* 22: 365–70.
72. Robledo-Narváez PN, Muñoz-Páez KM, Poggi-Varaldo HM, Ríos-Leal E, Calva-Calva G, Ortega-Clemente A, Rinderknecht-Seijas N, Estrada-Vázquez C, Ponce-Noyola MT, Salazar-Montoya JA (2013) The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *J Environ Manage* 128: 126-137.
73. Ruggeri B, Tommasi T (2012) Efficiency and efficacy of pretreatment and bioreaction for bio-H₂ energy production from organic waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 37:6491-6502.
74. Saritha M, Arora A, Nain L (2012) Pretreatment of paddy draw with *Trametes hirsute* for improved enzymatic saccharification. *Bioresou Technol* 104: 459-465.
75. Saritha M, Arora A, Singh S, Nain L (2013) *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. *Bioresou Technol*. 135: 12-17.

76. Saxena, R.C., Adhikari, D.K., Goyal, H.B. (2009). Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (13):167–178
77. Schroyen M, Vervaeren H, Van Hulle WH, Raes K (2014) Impact of enzymatic pretreatment on corn stover degradation and biogas production. *Bioresour Technol*, 173: 59-66.
78. Schroyen M, Vervaeren H, Vandepitte H, Van Hulle WH, Raes K (2015) Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. *Bioresour Technol* 192: 696-702.
79. Shahriari H, Warith M, Hamoda M, Kennedy KJ (2012) Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. *Waste Manage* 32:41-52.
80. Sindhu R, Binod P, Pandey A (2015) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass an overview. *Bioresour Technol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>.
81. Taherzadeh MJ, Karimi K (2008) Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review *Int J Mol Sci* 9: 1621-1651.
82. Teghammar A, Karimi K, Sárvári IH, Taherzadeh MJ (2012) Enhanced biogas production from rice straw, triticale straw and softwood spruce by NMMO pretreatment. *Biomass Bioenerg* 36: 116-120.
83. Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Carmona-Martinez, A., Muñoz-Paez, K.M., Poggi-Varaldo, H.M., 2006a. Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ. Sci. Technol.* 40: 3409-3415.
84. Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Muñoz-Paez, K.M., Carmona-Martinez, A., Poggi-Varaldo, H.M., 2006b. Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotechnol. Bioeng.* 95 (3): 342-349.
85. Valle Pereña JA, Ortega Navarro HO (2012) *Prospectiva de Energías Renovables 2012-2026, México.*
86. Van Soest PJ, Wine RH (1968). Determination of Lignin and cellulose in acid –detergent fiber with permanganate. *Journal of the AOAC* 51 (4): 780-785.
87. Vasconcelos SM, Pinheiro-Santos AMP, Moraes-Rocha GJ, Souto-Maior AM (2013) Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresour Technol* 135:46-52.
88. Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *Int J Hydrogen Energy* 2009; 34:799–811.
89. Wang L, Liu W, Kang L, Yang C, Zhou A, Wang A (2014) Enhanced biohydrogen production from waste activated sludge in combined strategy of chemical pretreatment and microbial electrolysis. *Int J Hydrogen Energy* 39: 11913-11919.
90. Wimonson P, Nitisoravut S (2009) Pretreatment Evaluation and its application on Palm oil mill effluent for Bio-Hydrogen Enhancement and methanogenic activity repression. *Pakistan J Biol Sci* 12: 1127-1133.

91. Zhang M-L, Fan Y-T, Xing Y, Pan C-M, Zhang G-S, Lay J-J (2007) Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass Bioenergy* 31: 250–4.
92. Zhang, YH (2013) Next generation biorefineries will solve the food, biofuels, and environmental trilemma in the energy-food-water nexus. *Energy Science and Engineering*. 1(1): 27-41.
93. Zheng Y, Kahnt J, Kwon IH, Mackie RI, Thauer RK (2014) Hydrogen formation and its regulation in *Ruminococcus albus*: involvement of an electron-bifurcating (Fe-Fe)-hydrogenase, of a non electron-bifurcating (FeFe)-hydrogenase and of a putative hydrogen-sensing (FeFe)-hydrogenase. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.02070-14.