



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Producción de biohidrógeno en un reactor de  
tanque agitado continuo: Evaluación de los  
hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con  
enzimas comerciales**

Tesis que presenta

**Diana Karime Olmos Hernández**

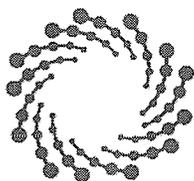
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Ambientales**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Elías Razo Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., septiembre 2018



**IPICYT**

## **Constancia de aprobación de la tesis**

La tesis "***Producción de biohidrógeno en un reactor de tanque agitado continuo: Evaluación de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con enzimas comerciales***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Diana Karime Olmos Hernández** y aprobada el diecinueve de septiembre del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Elías Razo Flores**  
Director de la tesis

**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta**  
Miembro del Comité Tutorial

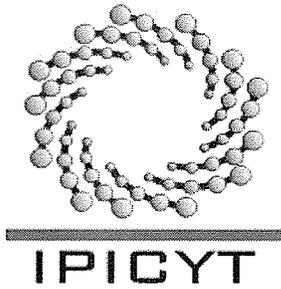


## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 619734) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial SENER-CONACYT Sustentabilidad Energética, CEMIE-Bio, Clúster Biocombustibles Gaseosos 247006



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 058 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de septiembre del año 2018, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Felipe Alatraste Mondragón</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UdG</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Diana Karime Olmos Hernández**

sobre la Tesis intitulada:

*Producción de biohidrógeno en un reactor de tanque agitado continuo: Evaluación de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con enzimas comerciales*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Elías Razo Flores**

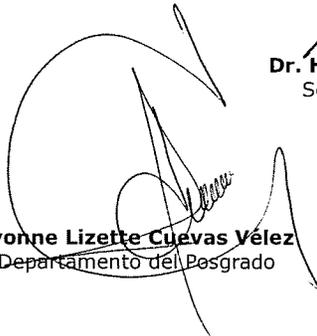
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 19:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de septiembre de 2018.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## **DEDICATORIA**

A todas las personas que generaron las causas y condiciones para emprender y terminar esta etapa.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Elías Razo Flores por haberme brindado el apoyo, la confianza y el ánimo para continuar en cada experimento de este proyecto. A la Dra. Berenice Celis por su confianza, paciencia y valiosos comentarios durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Felipe Alatríste y al Dr. Hugo Méndez por sus enseñanzas y aportes.

A la Dra. Virginia Montiel Corona por su invaluable apoyo, tiempo, constancia y conocimientos compartidos.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales, la M. en C Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez, M. en C. Guillermo Vidriales Escobar y M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz por su disponibilidad y apoyo técnico.

A todo el equipo de hidrógeno, el equipo de enzimáticos, pero sobre todo a mis compañeros Anai, Chuy, Mariana y Marisol pues mi estancia en este instituto fue una buena experiencia gracias a ustedes.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. Introducción	1
1.1 Producción de biohidrógeno	1
1.2 Biomasa Lignocelulósica	2
1.2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica	3
1.2.2 Hidrólisis enzimática	4
1.3 Inóculo y pretratamiento	6
1.4 Configuraciones de reactor	7
1.4.1 Reactor de tanque continuamente agitado	8
2. Justificación, Hipótesis y Objetivos	10
2.1 Justificación	10
2.2 Hipótesis	11
2.3 Objetivo general	11
2.4 Objetivos específicos	11
3. Materiales y Métodos	12
3.1 Tratamiento del bagazo	12
3.2 Hidrólisis enzimática	12
3.2.1 Hidrolizado con una mezcla de enzimas comerciales	12
3.2.2 Hidrolizado con una enzima nacional	13
3.3 Inóculo y medio mineral	13
3.4 Operación del reactor de tanque agitado	14
3.5 Métodos analíticos	17
4. Resultados y Discusión	18
4.1 Hidrolizados enzimáticos	18
4.2 Producción de biohidrógeno en el CSTR con el hidrolizado de la mezcla enzimática, Experimento 1.	20
4.3 Producción de biohidrógeno en el CSTR con el hidrolizado de una enzima nacional, Experimento 2.	25
4.4 Desempeño de los CSTR con los diferentes hidrolizados enzimáticos.	30
4.5 Efecto de costo de producción de biohidrógeno con los diferentes hidrolizados.	36

5. Conclusiones y Perspectivas	39
5.1 Conclusiones	39
5.2 Perspectivas	40
Referencias	41
Anexos	47

## Lista de tablas

Tabla 1	Producción de H <sub>2</sub> en continuo en CSTR con biomasa lignocelulósica.	9
Tabla 2	Condiciones de operación del CSTR alimentado en el Experimento 1 con hidrolizados obtenidos con enzimas comerciales importadas y en el Experimento 2 con hidrolizados obtenidos con una enzima comercial nacional.	15
Tabla 3	Ecuaciones para medir el desempeño del CSTR.	16
Tabla 4	Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la mezcla de enzimas importadas (Celluclast 1.5L/Viscozyme) y con una enzima nacional (Stonezyme). Se muestran los valores promedio.	19
Tabla 5	Periodo de uso de cada uno de los lotes de hidrolizado alimentados al CSTR.	20
Tabla 6	Desempeño del CSTR en el Experimento 1 con el hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática Celluclast 1.5L/Viscozyme.	24
Tabla 7	Producción de hidrógeno y metabolitos en el Experimento 2 con el hidrolizado obtenido con Stonezyme	28

Tabla 8	Desempeño de la producción de hidrógeno en reactores CSTR empleando hidrolizados enzimáticos de sustratos lignocelulósicos.	34
Tabla 9	Costo por litro de hidrolizado con la mezcla enzimática del Experimento 1.	36
Tabla 10	Costo por litro de hidrógeno con la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme del Experimento 1.	36
Tabla 11	Costo por litro de hidrolizado con Stonezyme en el Experimento 2.	37
Tabla 12	Costo por litro de hidrógeno con Stonezyme en el Experimento 2	37
Tabla 13	Costo por litro de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.	38

## Lista de figuras

Figura 1	Composición del bagazo de agave, en base peso seco (w/w) (Contreras-Dávila et al., 2017).	4
Figura 2	Esquema del reactor CSTR. Donde A: Bomba de alimentación, C: Bomba de efluente, F: Sensor de pH, G: Sensor de temperatura, M: bomba de NaOH, N: Contador de gas, P: Rotor, Q: Sensor potencial oxido-reducción, R: Computadora, S: Chaqueta térmica.	14
Figura 3	Caracterización de los distintos lotes de hidrolizados enzimáticos utilizados para la producción de hidrógeno en el CSTR. a) Hidrolizado obtenido de la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme, b) Hidrolizado obtenido con Stonezyme. ■ AT, ■ Rendimiento de azúcares y ■ DQO <sub>sol</sub> .	18
Figura 4	Desempeño del CSTR en el Experimento 1 con el hidrolizado de la mezcla enzimática importada Celluclast 1.5L/Viscozyme. a) Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno, VVPH (●) y Carga Orgánica Volumétrica, COV (-); b) Rendimiento Específico de Hidrógeno, REH (▲); c) Eficiencia de Consumo de Azúcares (◆); d) Porcentaje de H <sub>2</sub> en el gas (■).	23
Figura 5	Balance de DQO <sub>sol</sub> para el CSTR empleando los hidrolizados con la mezcla enzimática durante el Experimento 1.	25

Figura 6	Desempeño del CSTR en el Experimento 2 con el hidrolizado que se obtuvo con la enzima nacional Stonezyme. a) Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno, VVPH (●) y Carga Orgánica Volumétrica, COV (-); b) Rendimiento Específico de Hidrógeno, REH (▲); c) Eficiencia de Consumo de Azúcares (◆); d) Porcentaje de H <sub>2</sub> en el gas (■).	27
Figura 7	Balance de DQO <sub>sol</sub> para el CSTR empleando los hidrolizados con la mezcla enzimática durante el Experimento 2.	29
Figura 8	Diagrama de cajas que muestra el efecto de la carga orgánica volumétrica (COV) en la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y el rendimiento específico de hidrógeno (REH) en el CSTR para los hidrolizados con la mezcla enzimática del Experimento 1 (a, c) y con Stonezyme del Experimento 2 (b, d). Las cajas están divididas por la mediana y contiene el 50% de los datos; (●) promedio de los valores. Las líneas verticales indican la variabilidad fuera de los cuartiles superiores e inferiores.	31
Figura 9	Perfiles de concentración de AGV a lo largo de la operación de los CSTR's con Celluclast 1.5L/Viscozyme del Experimento 1 (a), con Stonezyme del Experimento 2 (b). ■ Lactato, ■ Acetato, ■ Butirato y concentración total de AGV (●).	33

Figura 10      Perfil de la concentración de acetato producido por      35  
homoacetogénesis a lo largo de la operación de los  
CSTR's con Celluclast 1.5L/Viscozyme del  
Experimento 1 (a) y Stonezyme del Experimento 2  
(b).

## Abreviaturas

AR	Azúcares reductores
AT	Azúcares totales
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COV	Carga orgánica volumétrica
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado por sus siglas en inglés, continuous stirred tank reactor
DQO	Demanda química de oxígeno
EGU	Unidades de endoglucanasa por sus siglas en inglés, endoglucanase unit
FPU	Unidades de papel filtro por sus siglas en inglés, filter paper unit
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
REH	Rendimiento específico de hidrógeno
RMH	Rendimiento molar de hidrógeno
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente por sus siglas en inglés, Upflow Anaerobic Sludge Blanket
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno

## Resumen

La producción de hidrógeno por métodos biológicos a partir de fuentes renovables, como la fermentación oscura de biomasa, resulta una alternativa prometedora para reducir la dependencia a los combustibles fósiles ya que el biohidrógeno es un combustible libre de carbono que sólo genera agua cuando se quema. El bagazo de *Agave tequilana* Weber es uno de los principales residuos lignocelulósicos generados por la industria del tequila en México. Este bagazo tiene un gran potencial para la producción de H<sub>2</sub> debido a su alto contenido de azúcares, que pueden liberarse a través de una hidrólisis enzimática. Actualmente, se ha demostrado que mezclas enzimáticas (celulasas y hemicelulasas) mejoran significativamente la liberación de los azúcares, sin embargo, son costosas. En este trabajo se evaluó el potencial de producción de hidrógeno en un reactor CSTR a partir de hidrolizados obtenidos con una mezcla enzimática importada (Celluclast 1.5L/Viscozyme) y una enzima comercial nacional (Stonezyme). El desempeño del CSTR alimentado con el hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática fue excelente, alcanzando una velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) máxima de 12.9 L H<sub>2</sub>/L-d que se logró a una carga orgánica volumétrica (COV) de 90 g DQO/L-d. Cuando se operó un segundo reactor CSTR con el hidrolizado obtenido a partir de una enzima comercial nacional se obtuvo una VVPH máxima de 2.2 L H<sub>2</sub>/L-d a una COV de 100 g DQO/L-d. La remoción de azúcares durante este ensayo fue de 83%, menor al obtenido con la mezcla enzimática que fue de 93%. En ambos ensayos se observó una relación directa entre la COV y la VVPH. Los distintos desempeños fueron atribuidos a que la producción de hidrógeno fue influenciada significativamente por la composición de los azúcares de los hidrolizados. El presente trabajo muestra que la alta VVPH obtenida con la mezcla enzimática da como resultado un menor costo en la producción por litro de H<sub>2</sub>, en comparación con la enzima comercial nacional.

**Palabras clave:** Bagazo de agave, CSTR, Hidrógeno, Hidrólisis enzimática

## Abstract

Hydrogen production by biological methods from renewable sources, such as dark fermentation of biomass, is a promising alternative to reduce dependence on fossil fuels since biohydrogen is a carbon-free fuel that only generates water when it is burned. The *Agave tequilana* Weber bagasse is one of the main lignocellulosic residues generated by the tequila industry in Mexico. This bagasse has a great potential to produce H<sub>2</sub> due to its high content of sugars, which can be released through an enzymatic hydrolysis. Currently, it has been shown that mixtures of cellulases and hemicellulases significantly improve the release of sugars, however, are very expensive. In this work the potential of hydrogen production in a CSTR reactor was evaluated from hydrolysates obtained with an imported enzymatic mixture and a national commercial enzyme. The performance of the CSTR fed with the hydrolysate obtained with the enzymatic mixture was excellent; reaching a maximum volumetric hydrogen production rate (VHPR) of 12.9 L H<sub>2</sub>/L-d achieved at an organic loading rate (OLR) of 90 g COD/L-d. In the second test when operating the CSTR with the hydrolysate obtained with a single commercial enzyme preparation, a maximum VHPR of 2.2 L H<sub>2</sub>/L-d was obtained at an OLR of 100 g COD/L-d. The removal of sugars during this trial was 83%, lower than that obtained with the enzymatic mixture that was 93%. In both trials, a direct relationship was observed between OLR and VHPR. The different performances were attributed to the fact that the production of hydrogen was significantly influenced by the composition of the sugars of the hydrolysates. The present work shows that the high VHPR obtained with the enzymatic mixture results in a lower cost in the production per liter of H<sub>2</sub>, compared with the national commercial enzyme.

**KEYWORDS.** Agave bagasse, CSTR, Enzymatic hydrolysis, Hydrogen.

## **1. Introducción**

### **1.1 Producción de hidrógeno**

La producción de hidrógeno es una alternativa prometedora para reducir la dependencia de los combustibles fósiles y aumentar el uso de biocombustibles sostenibles, ya que se puede producir a partir de fuentes renovables como la biomasa. De esta forma se pueden obtener beneficios como la reducción de emisiones de CO<sub>2</sub>, mayores ingresos de productos agrícolas a través de la conversión de residuos y reducción de los costos de gestión de los mismos (Chang et al. 2011; Tapia-Venegas et al. 2015). El hidrógeno, además de caracterizarse por ser el gas con mayor contenido de energía por unidad de peso (143 GJ/ton), es un combustible libre de carbono que sólo genera agua cuando se quema y es un gas de baja solubilidad que puede ser fácilmente separado del agua (Davila-Vazquez et al. 2008).

Actualmente, los principales métodos de producción de hidrógeno incluyen la gasificación del carbón, producción a partir de gas natural, la electrólisis del agua, la fotocatalisis solar, los ciclos termoquímicos por energía nuclear y la producción de hidrógeno a partir de biomasa (Chang et al. 2011). Existen diferentes vías para producir hidrógeno a partir de biomasa y los dos métodos de conversión más comunes son termoquímicos y biológicos. Los métodos termoquímicos usan calor para descomponer la biomasa en productos gaseosos, lo cual pone a los métodos biológicos en ventaja al usar menores cantidades de energía (Bartels et al. 2010; Tapia-Venegas et al. 2015). En cuanto a los métodos biológicos, éstos incluyen la biofotólisis directa e indirecta, la fotofermentación y la fermentación oscura. La fermentación oscura ocurre en la naturaleza dentro del proceso de digestión anaerobia, el cual se lleva a cabo por bacterias anaerobias que degradan sustratos ricos en carbohidratos, donde la generación de hidrógeno es un producto secundario de la degradación de la materia orgánica a ácidos grasos volátiles (AGV). Este proceso de producción de hidrógeno presenta algunas ventajas, tales como: condiciones de reacción moderadas, mayor velocidad de producción y AGV que son fáciles de usar en otros procesos (Chang et al. 2011; Kothari et al. 2012;

Lee et al. 2009). Sin embargo, en este proceso el hidrógeno producido puede ser consumido por otras bacterias, como los microorganismos homoacetógenos, lo cual es una desventaja del proceso (Tapia-Venegas et al., 2015).

## **1.2 Biomasa lignocelulósica**

La producción de hidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica se ha convertido en una alternativa de combustible que puede disminuir la contaminación ambiental. Distintos países en el mundo están interesados en el potencial de la biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de biocombustibles debido a su bajo costo, amplia disponibilidad, alto contenido de carbohidratos, ninguna competencia con materia prima alimentaria y sumando la ventaja de que con esta aplicación podemos dar tratamiento a estos desechos (Contreras-Davila et al. 2017; Montiel et al. 2016; Tapia-Venegas et al. 2015).

El bagazo de *Agave tequilana* Weber, var. azul es un subproducto lignocelulósico en la producción de tequila, como bien sabemos, la bebida alcohólica más importante producida en México. La producción anual de bagazo de agave en México es de aproximadamente  $3.6 \times 10^5$  toneladas por año y actualmente se utiliza como alimento para animales o para compostaje. Sin embargo, su potencial para la sacarificación y la posterior producción de biohidrógeno no ha sido ampliamente estudiado (Montiel et al., 2016).

Contreras-Davila et al. (2017) reportan que el bagazo de *Agave tequilana* Weber es una buena fuente de azúcares fermentables para la producción de hidrógeno debido a su alto contenido en carbohidratos y bajo contenido de lignina, sin embargo, la combinación de procesos efectivos con la hidrólisis enzimática eficiente para obtener azúcares fermentables a partir de estos residuos sigue siendo un desafío importante (Montiel et al., 2016).

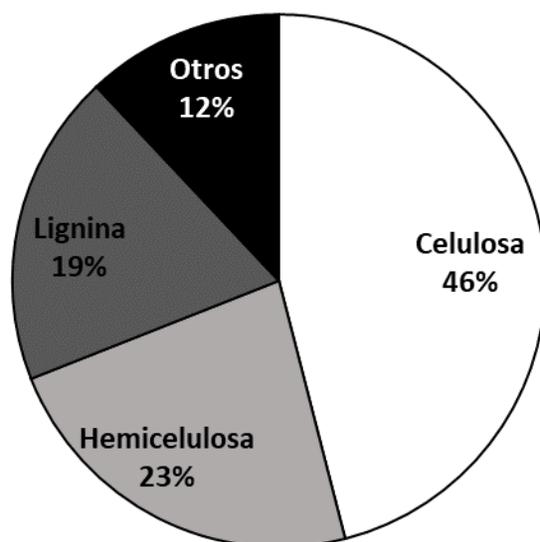
### 1.2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica

En la pared celular de las plantas se encuentra el material lignocelulósico, el cual es un biopolímero, cuyos constituyentes son lignina, hemicelulosa y celulosa principalmente. En la fase fibrilar cristalina se encuentran finos filamentos formados de celulosa, mientras que hay una fase amorfa formada por celulosa, hemicelulosa y polisacáridos no celulósicos como xilanos, glucanos, galactanos, mananos y fructanos, además de pectinas, glucoproteínas y lignina (Lopez-Gutiérrez 2015).

La lignina forma una matriz amorfa que sirve para proteger a los polisacáridos de la degradación microbiana y de la hidrólisis enzimática en general, es de naturaleza fenólica con grupos metoxi y fenilpropánicos. La hemicelulosa es un conjunto de polímeros formados por pentosas, hexosas, ácidos urónicos y 6-deoxi-hexosas, que interacciona con la celulosa y la lignina para dar rigidez a la pared celular (Doherty et al. 2011; López-Gutiérrez 2015). La celulosa o  $\beta$ -1-4-glucano es un polímero lineal de glucosa compuesto por unidades de celobiosa, las cadenas de celulosa se encuentran empacadas por enlaces de hidrógeno en microfibrillas que están unidas entre sí por hemicelulosas, polímeros amorfos, pectinas y a su vez estos están cubiertos por lignina, por lo que es necesario someterla a un tratamiento para la liberación de azúcares como D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa (López-Gutiérrez 2015; Karimi et al. 2008).

La planta del agave está constituida por hojas o pencas (55% p/p) y por la piña, la cual representa 45% del peso total de la planta. A su vez, la piña del agave está formada por una fracción soluble rica en fructanos y una insoluble constituida por fibra lignocelulósica (López-Gutiérrez, 2015).

La composición del bagazo de agave se muestra en la Figura 1. Los componentes restantes son proteínas, minerales y otros compuestos. Esta composición es lo que hace que el bagazo de agave sea un candidato potencial para la bioconversión a hidrógeno (Vandenbossche et al., 2014).



**Figura 1.** Composición del bagazo de agave, en base peso seco (w/w) (Contreras-Dávila et al., 2017).

### 1.2.2 Hidrólisis enzimática

La biomasa lignocelulósica puede transformarse en hidrógeno a través de procesos fisicoquímicos o biológicos como ya se mencionó anteriormente pero el tratamiento es el paso crucial para convertir los materiales lignocelulósicos en azúcares fermentables (Montiel et al., 2016). En este sentido, la hidrólisis enzimática es un tratamiento altamente atractivo desde el punto de vista económico y energético ya que la recuperación de carbohidratos es alta y la utilización de energía baja, lo cual hace que el proceso sea rentable, en comparación con el proceso de la hidrólisis ácida que se lleva a cabo a altas temperaturas que aumentan los costos (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009; Montiel et al., 2016; Mosier et al., 2005). Aunado a esto, el uso de enzimas tiene ventajas importantes, como condiciones moderadas en el proceso (pH 4.0-7.0 y temperatura de 40-60 °C), altos rendimientos, especificidad y el hecho de que las reacciones con enzimas no producen

subproductos (compuestos fenólicos, furfurales, hidroximetilfurfurales, ácido fórmico, entre otros), que puedan impactar negativamente en la producción de hidrógeno al afectar el metabolismo microbiano (Palomo-Briones et al. 2018).

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática es necesaria la reducción de tamaño de las fibras del bagazo de agave para facilitar el manejo de los materiales lignocelulósicos y aumentar su área superficial, mejorando así el acceso a las enzimas y también disminuye la cristalinidad de la celulosa. Una alternativa es la molienda del bagazo, un método práctico que se usa comúnmente en las industrias de procesamiento de alimentos para la producción a gran escala (Lee et al. 2009; Montiel et al. 2016; Singh et al. 2014).

Una vez que se lleva a cabo un proceso para reducir el tamaño de partícula, los azúcares contenidos en el bagazo se pueden liberar a través de la hidrólisis enzimática por dos principales grupos de enzimas (celulasas y hemicelulasas) que descomponen la celulosa y hemicelulosa en sus correspondientes monómeros. La primera parte de la hidrólisis enzimática consiste en la adsorción de enzimas celulasas en fase líquida en la superficie de la celulosa (sólido), después se lleva a cabo la hidrólisis de la celulosa a azúcares simples, principalmente celobiosa y oligómeros y, finalmente, la desorción de las celulasas a la fase líquida. Del mismo modo la hemicelulosa se puede hidrolizar mediante hemicelulasas (Karimi et al. 2008).

Diversos estudios han reportado buenos rendimientos de azúcares reductores mediante la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos utilizando enzimas como Acellerasa, Novozyme 188, Multieffect Xilanasa y Multieffect Pectinasa donde se han alcanzado entre 400 y 500 g de azúcares reductores por kilogramo de material lignocelulósico (Bals, Rogers, Jin, Balan, & Dale, 2010). Otras enzimas comerciales se han utilizado con diferentes sustratos, entre ellos algunos tipos de agaves y bagazos. Cellic CTec2 (Novozyme) fue capaz de hidrolizar paja de trigo con más de 98% de rendimiento y Celluclast 1.5L (Novozyme) con suplementos de  $\beta$ -glucosidasa alcanzó hasta 81% de rendimiento (Rodrigues, Haven, Lindedam, Felby, & Gama, 2015). Por otro lado Hu y colaboradores (2011) han propuesto que mezclas de enzimas como la  $\beta$ -glucosidasa, xilanasa y cofactores de celulasas,

pueden mejorar considerablemente la eficiencia de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos tal como lo muestran sus resultados en donde Celluclast 1.5L, Novozyme 188 y Multieffect Xilanasa se usaron en combinación para lograr una conversión cercana a 70%. Otras mezclas de las preparaciones de Novozyme, como Cellic CTec2 y Cellic HTec2, se emplearon en la hidrólisis de bagazo de agave, pretratado con líquido iónico, y el rendimiento obtenido fue de aproximadamente el 50% del rendimiento teórico de C6 (Perez-Pimienta et al., 2015). La mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme (Novozyme) ya ha sido utilizada para la sacarificación de biomasa de una especie de sauce nativa de Asia occidental (Singal et al., 2011), pero no para bagazo de agave. Para el caso específico de hidrolizados de bagazo de agave, trabajos anteriores han reportado concentraciones de azúcares totales utilizando Celluclast 1.5L entre 5.3 y 12.5 g/L (Contreras-Davila et al. 2017; Montiel-Corona y Razo Flores 2018). Sin embargo, en todos los casos son enzimas comerciales importadas y, hasta el momento, no hay reportes del potencial de producción de hidrógeno con hidrolizados obtenidos de mezclas enzimáticas ni de enzimas comerciales nacionales.

En el presente trabajo se empleó la preparación enzimática Stonezyme, de origen nacional la cual es empleada en detergentes. Su función es reacondicionar la apariencia de la ropa eliminando las pequeñas fibras de celulosa que se forman con el desgaste de la ropa (pilling). Además, se empleó una mezcla de dos preparaciones enzimáticas de importación, Celluclast 1.5L/Viscozyme, las cuales han sido usadas con éxito para la sacarificación de biomasa lignocelulósica. La producción de hidrógeno de los hidrolizados obtenidos con esta mezcla se usará como referencia de comparación para la producción de hidrógeno proveniente de los hidrolizados obtenidos con Stonezyme.

### **1.3 Inóculo y pretratamiento**

Es importante saber que los algunos microorganismos productores de biohidrógeno pueden ser anaerobios estrictos y facultativos, que pertenecen principalmente a las familias Clostridiaceae y Enterobacteriaceae. La diferencia entre ambos grupos de

microorganismos es la producción de subproductos debido a sus diferentes metabolismos y al rendimiento teórico de hidrógeno de cada uno. La producción de hidrógeno por fermentación oscura puede llevarse a cabo ya sea mediante un cultivo puro o un cultivo mixto de bacterias (Davila-Vazquez et al., 2008; Tapia-Venegas et al., 2015). Una serie de trabajos han demostrado que los cultivos puros pueden promover mayores tasas de producción de hidrógeno y rendimientos molares que los cultivos mixtos. A pesar de ello, el principal inconveniente para usar cultivos puros es que se deben mantener condiciones estériles para evitar la contaminación de los microorganismos que pueden reducir la producción de hidrógeno (Carrillo-Reyes et al., 2016). Por otro lado, los cultivos mixtos son más fáciles de operar, controlar y se puede usar una amplia variedad de sustratos (Wang et al. 2009).

La estrategia de aplicar un pretratamiento al inóculo y las condiciones operacionales del proceso de producción de hidrógeno son fundamentales para enriquecer el consorcio con bacterias productoras de hidrógeno y eliminar los potenciales consumidores de hidrógeno como los metanógenos hidrogenotróficos (Carrillo-Reyes et al., 2016). Los tratamientos con calor o ácido han sido ampliamente utilizados debido a que, a diferencia de los metanógenos que consumen  $H_2$ , las bacterias productoras de hidrógeno como *Clostridium* toleran temperaturas más altas; adicionalmente, las bacterias productoras de hidrógeno pueden crecer a pH más bajo que los metanógenos consumidores de hidrógeno (Davila-Vazquez et al. 2008). Sin embargo Carrillo-Reyes (2013), reporta que este pretratamiento, además de seleccionar microorganismos productores de hidrógeno, también selecciona consumidores de hidrógeno, como los homoacetogénicos, ya que mediante técnicas moleculares como PCR-DGGE y clonación encontró homoacetogénicos como *Blautia hydrogenotrophica*, *Oscillibacter valericigenes* y *Clostridium ljungdahlii*.

#### **1.4 Configuraciones de reactor**

La configuración del reactor tiene un gran impacto en el desempeño del proceso de producción de hidrógeno, por esta razón, se han estudiado ampliamente diversas

configuraciones, desde el uso de reactores de biomasa fija como ~~le es~~ el reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés, Upflow Anaerobic Sludge Blanket) y el reactor de lecho empacado, donde la principal limitante es el largo tiempo de arranque necesario para establecer una comunidad productora de hidrógeno (Carrillo-Reyes, 2013), hasta los reactores de biomasa suspendida como el reactor de tanque agitado continuo (CSTR por sus siglas en inglés, Continuous Stirred Tank Reactor) que es el más utilizado para la producción de hidrógeno.

#### **1.4.1 Reactor de tanque continuamente agitado**

El CSTR es la configuración de reactor de biomasa suspendida más sencilla para la producción de hidrógeno (Jung et al., 2011), ya que es fácil de operar y, dado que estos sistemas se encuentran completamente agitados, pueden mejorar la eficiencia de transferencia de masa debido al buen contacto sustrato-biomasa y permite estudiar aspectos cinéticos de los cultivos productores de hidrógeno (Arriaga et al., 2011; Contreras-Davila, 2015). Un factor importante a considerar en la operación de un CSTR es el tiempo de retención de sólidos (TRS), que es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH), lo cual, en principio, permite el lavado de la biomasa que no puede crecer a la tasa de dilución aplicada, especialmente cuando se opera a una alta tasa de dilución (es decir, bajo TRH), lo que puede resultar en una baja eficiencia de producción de H<sub>2</sub> debido al lavado de células (Arriaga et al., 2011; Carrillo-Reyes, 2013).

No obstante, superando los factores anteriormente mencionados que podrían afectar la producción de H<sub>2</sub> en el CSTR, hay estudios que reportan valores altos de velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) utilizando distintos sustratos. En el caso particular, existen diferentes reportes de producción de H<sub>2</sub> a partir del hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave utilizando una sola enzima (Celluclast 1.5L) en los cuales se obtienen VVPH entre 2.53 y 6 L H<sub>2</sub>/L-d (Contreras-Dávila et al. 2017; Montiel-Corona y Razo Flores 2018) a cargas orgánicas volumétricas (COV) no mayores a 52 g de demanda química de oxígeno (DQO)/L-

d, y de 5.19 L H<sub>2</sub>/L-d utilizando como sustrato un hidrolizado enzimático de paja de avena pretratada con vapor ácido (Tabla 1).

**Tabla 1** Producción de H<sub>2</sub> en continuo en CSTR con biomasa lignocelulósica.

Reactor	Sustrato	Tratamiento	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	Referencia
CSTR	Bagazo de agave	Hidrólisis enzimática (Celluclast 1.5L)	52.2	2.53	(Contreras-Davila et al. 2017)
CSTR	Bagazo de agave	Hidrólisis enzimática (Celluclast 1.5L)	44	6	(Montiel-Corona y Razo Flores 2018)
CSTR	Paja de trigo	Pretratada con vapor ácido. Hidrólisis enzimática (Cellic C)	70.3	5.19	(Pawar et al. 2013)

Una limitante en el proceso fermentativo de producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave es que, a pesar de que ya se conocen de manera detallada las condiciones de operación de temperatura y pH de los reactores CSTR, se ha encontrado una barrera de COV alrededor de 52.2 g DQO/L-d (Contreras-Davila et al., 2017) en donde conforme ésta aumenta, la VVPH comienza a decaer.

## **2. Justificación, Hipótesis y Objetivos**

### **2.1 Justificación**

Si bien la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos vía fermentación oscura es bien reconocida como una alternativa a los combustibles fósiles, la biomasa lignocelulósica se destaca como una materia prima atractiva para la producción de biocombustibles debido a su abundancia y su carácter renovable. Sumando a esto el hecho de que grandes cantidades de este tipo de biomasa pueden recuperarse como subproductos de una amplia gama de procesos agroindustriales, como es el caso de la industria del tequila en México (Arreola-Vargas et al., 2016), donde se ha reportado la producción de  $3.6 \times 10^5$  toneladas de bagazo de agave por año (Caspeta et al. 2014).

Hasta el momento, los estudios del potencial de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave se han realizado utilizando un solo grupo de enzimas (celulasas), o una mezcla de enzimas (celulasas y hemicelulasas). El uso de mezclas permite obtener una mayor concentración de azúcares totales debido al sinergismo entre dichas enzimas, lo cual puede favorecer la producción de  $H_2$ .

Por otra parte, la hidrólisis enzimática del bagazo de agave a partir de una enzima comercial nacional reduciría los costos de producción de hidrógeno ya que actualmente el precio por mililitro de las enzimas comerciales importadas es de \$1.05 Celluclast 1.5L (celulasa) y \$29.95 Viscozyme (hemicelulasa), mientras que Stonezyme (una celulasa comercial nacional) tiene un precio de \$0.42.

Por lo que en este trabajo se estudiará el efecto de diferentes COV con hidrolizados de bagazo de agave a partir de una mezcla de enzimas de importación (Celluclast 1.5L/Viscozyme) y una enzima de producción nacional (Stonezyme) de menor precio con la finalidad de analizar el desempeño de un CSTR en la producción de hidrógeno.

## **2.2 Hipótesis**

Se obtendrá una mayor producción de hidrógeno en un CSTR utilizando como sustrato el hidrolizado de bagazo de agave obtenido con una mezcla de enzimas comerciales importadas, gracias al sinergismo entre celulasas y hemicelulasas durante el proceso de sacarificación, lo que resultará en una mayor concentración de azúcares totales en el hidrolizado, en comparación con el hidrolizado de bagazo de agave obtenido a partir de una enzima nacional comercial.

## **2.3 Objetivo General**

Evaluar el efecto del uso de dos diferentes hidrolizados de bagazo *Agave tequilana* Weber obtenidos con una mezcla de enzimas importadas (Celluclast 1.5L/Viscozyme) y una enzima comercial nacional (Stonezyme) empleados como sustrato, sobre la producción de hidrógeno en continuo, utilizando un CSTR.

## **2.4 Objetivos Específicos**

- Caracterizar los hidrolizados de bagazo de agave de la mezcla enzimática importada y de la enzima comercial nacional, para conocer la concentración de DQO, AT y AR.
- Evaluar el efecto de la variación de distintas COV en la producción de hidrógeno en un reactor CSTR alimentado con los distintos hidrolizados de bagazo de agave, con el fin de encontrar una máxima COV a la que se pueda producir una alta VVPH.
- Comparar el costo efectivo por litro de hidrógeno producido a partir de los dos diferentes hidrolizados, para conocer cuál sería el hidrolizado más rentable.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **1.1 Tratamiento del bagazo**

El bagazo de agave se obtuvo de Casa Herradura (Amatitán, Jalisco, México). Se llevaron a cabo tres lavados de una hora cada uno con agua potable para eliminar residuos y sustancias solubles, se secó a temperatura ambiente durante 48 horas, posteriormente se molió en un molino de cuchillas para obtener fibras más pequeñas y, finalmente, se tamizó con una malla de 2 mm (No. 18). El bagazo tamizado se almacenó en costales a temperatura ambiente en condiciones secas y sin luz.

#### **1.2 Hidrólisis enzimática**

##### **1.2.1 Hidrolizado con una mezcla de enzimas comerciales**

La hidrólisis con la mezcla enzimática se llevó a cabo en un reactor de vidrio con un volumen de trabajo de 10 L (modelo U1 TPLC/FAM-10000, Prendo, Puebla, México) integrado con un agitador vertical helicoidal y con un control manual de agitación. La temperatura se controló de forma automática empleando un recirculador de agua integrado a dicho reactor (modelo FC-20P, Prendo, Puebla, México). Las enzimas empleadas en este estudio fueron mezclas comerciales de celulasas y hemicelulasas producidas por la empresa Novozyme: Celluclast 1.5L, con actividad celulasa (Biotecsa, México) y Viscozyme con actividad de hemicelulasa (Sigma-Aldrich, EUA). Siguiendo el protocolo para sacarificación enzimática reportado por Galindo-Hernández (2017), se incorporaron 50 g de bagazo seco por cada litro de buffer de citratos 50 mM a pH 5.0, se añadió 1 mg celulasa/mL buffer y 0.1 mg hemicelulasa/mL buffer (25 mL de Celluclast 1.5L y 2.7 mL de Viscozyme por litro de buffer). El tratamiento se llevó a cabo a 40°C por 6 horas en agitación continua

a 100 rpm. La caracterización de las enzimas en función de sus actividades hidrolíticas se muestra en el Anexo 1.

El hidrolizado se filtró a través de una tela absorbente 100% algodón para eliminar fibras del bagazo y evitar futuros problemas de taponamiento en las líneas de alimentación. El hidrolizado filtrado se almacenó a 4°C.

### **1.2.2 Hidrolizado con una enzima nacional**

La hidrólisis de bagazo de agave con una enzima comercial nacional se realizó utilizando Stonezyme (ENMEX, México), con actividad celulasa. Se agregaron 78.79 g de bagazo seco por cada litro de buffer de citratos 50 mM, la temperatura y el pH fueron 50 °C y 6.21, respectivamente. La concentración de enzima añadida fue de 2.25 mg proteína/mL de buffer (82.97 mL de Stonezyme por litro de buffer). El tratamiento se llevó a cabo en el mismo reactor de vidrio de 10 L utilizado para la mezcla enzimática (modelo U1 TPLC/FAM-10000, Prendo, Puebla, México) con agitación continua a 100 rpm durante 7 horas.

Al igual que con el hidrolizado de la mezcla enzimática, el hidrolizado se filtró a través de una tela absorbente y se almacenó a 4°C antes de introducirlo al reactor.

### **1.3 Inóculo y medio de cultivo**

Se utilizó como inóculo lodo anaeróbico granular obtenido de un reactor UASB a nivel industrial que trata vinazas de tequila de Casa Herradura (Amatitán, Jalisco, México). El lodo fue tratado térmicamente a 105 °C durante 24 horas de acuerdo a Contreras-Davila et al. (2017) para eliminar los microorganismos que consumen hidrógeno. El medio mineral se preparó de acuerdo con Arreola-Vargas et al. (2014) para contener (g/L):  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 4.5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.635;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.125;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.075;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.009;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.005. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

#### 1.4 Operación del reactor de tanque agitado

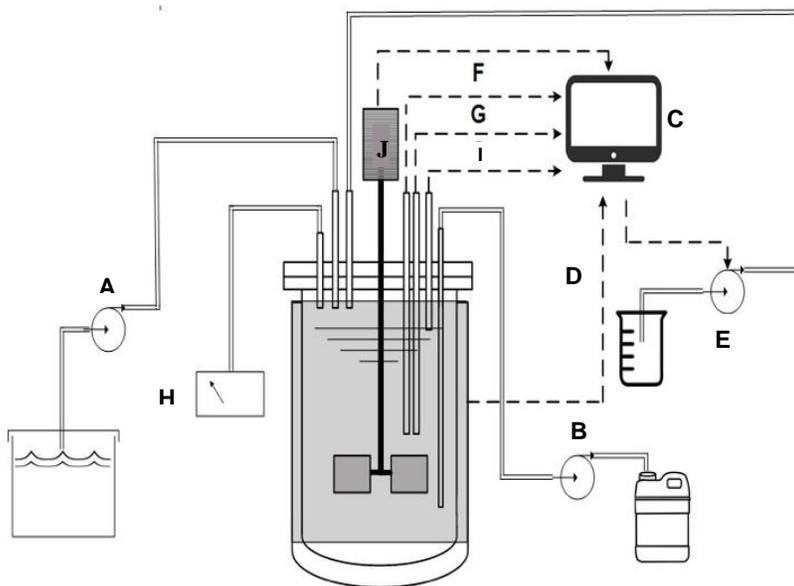
Se utilizó un CSTR (Applikon modelo Z310210011) con un volumen total de 1.3 L y un volumen de trabajo de 1 L, mezclado mecánico y equipado con una chaqueta térmica y sensores de pH, potencial redox y temperatura (Figura 2).

El CSTR se operó en 2 experimentos distintos:

Experimento 1: Se trabajó con el hidrolizado obtenido de la mezcla de enzimas comerciales importadas (celulasas y hemicelulasas) a 37 °C.

Experimento 2: Se trabajó con el hidrolizado obtenido de una enzima comercial nacional (celulasas) a 37 °C.

Las condiciones operacionales se presentan en la Tabla 2. En todos los casos se evaluó el desempeño de los reactores con especial énfasis en VVPH y en los rendimientos específicos de producción de hidrógeno (REH), expresados en litros de hidrógeno por kilogramo de bagazo.



**Figura 2.** Esquema del reactor CSTR. A: Bomba de alimentación, B: Bomba de efluente, C: Computadora, D: Chaqueta térmica, E: bomba de NaOH, F: Sensor de pH, G: Sensor de temperatura, H: Contador de gas, I: Sensor potencial oxido-reducción, J: Rotor.

El reactor se operó en lote durante el arranque en ambos experimentos, en cada uno de los experimentos el reactor se inoculó con 4.5 g SSV/L de lodo tratado

térmicamente y se alimentó con el hidrolizado enzimático correspondiente a una concentración de 10 g DQO/L, ajustando el pH inicial a 5.5 con NaOH 4 M y con agitación mecánica continua a 300 rpm. Para mejorar las condiciones anaerobias, el reactor se purgó con una mezcla de gases CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> durante 8 minutos. Para cambiar a modo continuo, el flujo de alimentación en ambos experimentos se estableció en 2.7 mL/min, para obtener un TRH de 6 h. Los procesos se consideraron en estado estacionario cuando la variación de la producción de gas fue inferior a 10% durante 3 días seguidos.

Para el Experimento 1 con el hidrolizado obtenido de la mezcla enzimática, la COV en el reactor fue entre 36 y 90 g DQO/L-d y para el Experimento 2 con Stonezyme la COV fue entre 44 y 100 g DQO/L-d; en el periodo final de este experimento se evaluó una carga de 100 g DQO/L-d pero centrifugando el hidrolizado a 10000 rpm por 15 minutos para retirar los sólidos del hidrolizado y determinar su efecto en el desempeño del CSTR.

**Tabla 2.** Condiciones de operación del CSTR alimentado en el Experimento 1 con hidrolizados obtenidos con enzimas comerciales importadas y en el Experimento 2 con hidrolizados obtenidos con una enzima comercial nacional.

Experimento	Periodo	Días de Operación	Enzima <sup>a</sup>	Concentración de sustrato (g DQO/L)	COV (g DQO/L-d)
1	I	1 - 9	Celluclast 1.5L/Viscozyme	9	36
	II	10 - 22		10	44
	III	23 - 29		13	52
	IV	30 - 41		15	60
	V	42 - 47		17.5	70
	VI	48 - 52		20	80
	VII	53 - 57		22.5	90
2	I	1 - 10	Stonezyme	11	44
	II	11 - 16		13	52
	III	17 - 23		15	60
	IV	24 - 30		20	80
	V	31 - 35		25	100
	VI*	36 - 39		25	100

\*Hidrolizado centrifugado a 10,000 rpm

<sup>a</sup>El hidrolizado se obtuvo con la(s) enzima(s) que se indica(n)

Las ecuaciones utilizadas para calcular los parámetros operacionales como la COV y evaluar el rendimiento del reactor (Tabla 3) fueron tomadas de Contreras-Davila et al. (2017).

**Tabla 3.** Ecuaciones para medir el desempeño del CSTR.

		Donde:
(1)	$COV = \frac{S^0}{TRH}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>S^0</math> = Concentración sustrato inicial</li> </ul>
(2)	$TRH = \frac{V_R}{Q}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>V_R</math> = Volumen del CSTR</li> <li>• <math>Q</math> = Flujo de alimentación</li> </ul>
(3)	$VVPH = \frac{V_{H_2 \text{ producido}}/t}{V_R}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>V_{H_2 \text{ producido}}</math> = volumen a condiciones estándar (0°C y 1 atm)</li> </ul>
(4)	$RMH = \left[ \frac{\text{mol } H_2 \text{ producido}/t}{\text{mol AT}_{\text{cons}}/t} \right] \times 0.6$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mol de AT= 1 mol de glucosa</li> </ul>
(5)	$REH = \frac{VVPH * V_r * \frac{Vol_{\text{hidrolizado}}}{Vel_{\text{consumo}}}}{[\text{sustrato}]}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>Vol_{\text{hidrolizado}}</math> = Volumen de hidrolizado obtenido por lote</li> <li>• <math>Vel_{\text{consumo}}</math> = Volumen de hidrolizado consumido por día</li> <li>• <math>[\text{sustrato}]</math> = Cantidad de bagazo empleado por lote en la hidrólisis.</li> </ul>
(6)	Acetato homoacetogénico	
	$= \frac{2[Ace] + 2[But] - [Prop] - H_2}{6}$	
(7)	% Acetato homoacetogénico	
	$= \left( \frac{\text{Acetato homoacetogénico}}{\text{Acetato total}} \right) * 100$	
(8)	Costo L de $H_2$	$= \frac{\text{Precio por litro de hidrolizado}}{\text{Litros de } H_2 \text{ producidos por L de hidrolizado}}$
(9)	Litros de $H_2$ producidos por L de hidrolizado	$= \frac{VVPH (\text{Vol del reactor})}{\text{Litros de hidrolizado por día}}$

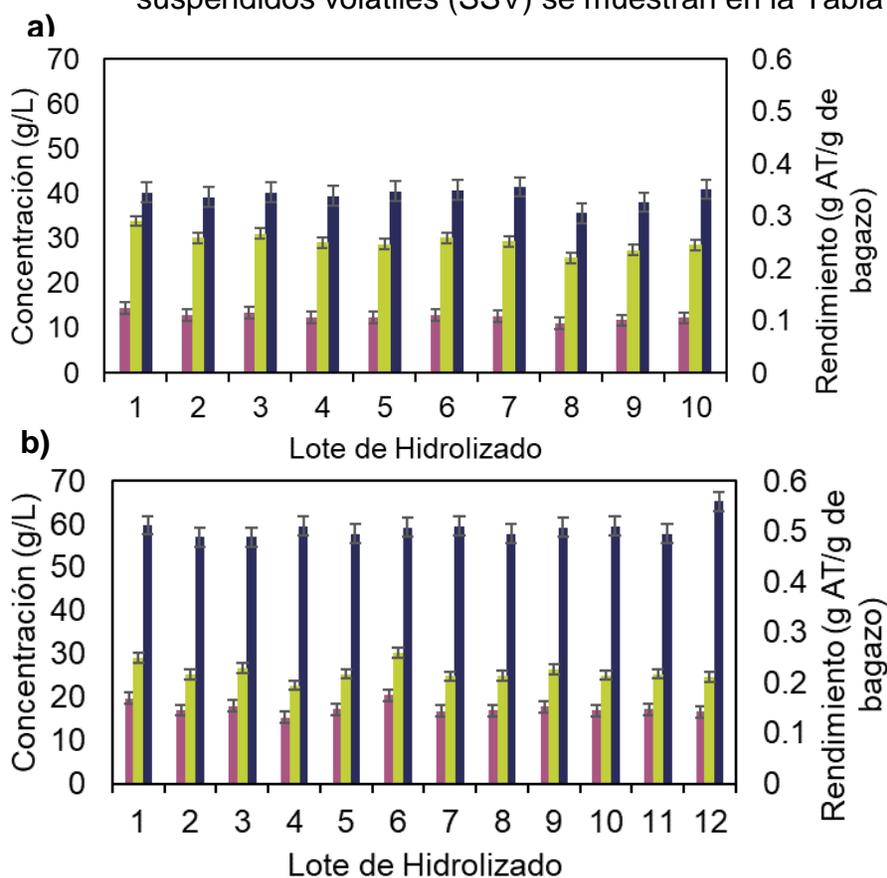
## 1.5 Métodos analíticos

La determinación de DQO soluble, ST, y SSV se realizó de acuerdo con los métodos estándar APHA 5220, 2540-B y 2450-E, respectivamente (APHA, 1997). Los azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR) se determinaron por el método fenol-sulfúrico y ácido 3,5-dinitrosalicílico, respectivamente (DuBois et al. 1956; Miller, 1959). La producción de gas se midió mediante un dispositivo de desplazamiento de líquido (modelo MVG-10, Prendo, México) y la composición del gas ( $H_2$  y  $CO_2$ ) se analizó mediante Cromatografía de Gases -TCD, tal como se describió previamente (Carrillo-Reyes et al. 2012). Los metabolitos producidos durante la operación del reactor (acetato, butirato, propionato, formiato y lactato) se cuantificaron mediante electroforesis capilar de acuerdo con Davila-Vazquez et al. (2008).

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Hidrolizados enzimáticos

El hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática importada (Celluclast 1.5L-Visozyme) y que se usó para la alimentación del reactor CSTR en el Experimento 1, se obtuvo de un solo lote de bagazo de agave y se realizaron 10 lotes de hidrolizado. Los valores de  $DQO_{sol}$  y azúcares totales (AT) para cada lote de hidrolizado se presentan en la Figura 3a y la duración de los hidrolizados enzimáticos de cada uno de los lotes alimentados al CSTR se describe más adelante. En promedio, el hidrolizado obtenido de la mezcla Celluclast 1.5L/Visozyme presentó una  $DQO_{sol}$  de  $39.7 \pm 1.7$  g/L, AT de  $12.61 \pm 0.94$  g/L y AR de  $9.0 \pm 1.03$  g/L. Las concentraciones de sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se muestran en la Tabla 4.



**Figura 3.** Caracterización de los distintos lotes de hidrolizados enzimáticos utilizados para la producción de hidrógeno en el CSTR. a) Hidrolizado obtenido de la mezcla Celluclast 1.5L/Visozyme, b) Hidrolizado obtenido con Stonezyme. ■ AT, ■ Rendimiento de azúcares y ■  $DQO_{sol}$ .

El hidrolizado obtenido con Stonezyme y que se usó para operar el Experimento 2 del CSTR, se obtuvo de un solo lote de bagazo de agave y se produjeron 12 lotes de hidrolizado, los valores de DQO<sub>sol</sub>, AT y rendimiento de azúcares para cada lote se muestran en la Figura 3b.

En promedio, el hidrolizado obtenido con esta enzima nacional presentó  $59.1 \pm 2.2$  g DQO<sub>sol</sub>/L,  $17.47 \pm 1.3$  g AT/L y  $13.9 \pm 0.9$  g AR/L, respectivamente. El contenido de sólidos en el hidrolizado con Stonezyme fue de  $59.91 \pm 0.94$  g ST/L y  $36.28 \pm 0.41$  g SSV/L, concentraciones mayores a las encontradas en el hidrolizado con la mezcla enzimática Celluclast 1.5L/Viscozyme (Tabla 4).

**Tabla 4.** Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave obtenidos con la mezcla de enzimas importadas (Celluclast 1.5L/Viscozyme) y con una enzima nacional (Stonezyme). Se muestran los valores promedio.

Hidrolizado	DQO <sub>sol</sub> g/L	Azúcares totales g/L	Azúcares reductores g/L	Sólidos totales g/L	Sólidos suspensionados volátiles g/L
Celluclast 1.5L/Viscozyme	$39.7 \pm 1.7$	$12.61 \pm 0.94$	$9 \pm 1.03$	$51.84 \pm 2.18$	$29.11 \pm 0.23$
Stonezyme	$59.1 \pm 2.2$	$17.47 \pm 1.3$	$13.9 \pm 0.96$	$59.91 \pm 0.94$	$36.28 \pm 0.41$

De acuerdo con la Figura 3, en cada lote del hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática se observó una menor concentración de DQO<sub>sol</sub> y AT en comparación con las concentraciones obtenidas en los lotes con Stonezyme. Sin embargo, el rendimiento de sacarificación fue muy similar para ambos hidrolizados, el hidrolizado con la mezcla presentó en promedio  $0.22 \pm 0.1$  g AT/g de bagazo y para el hidrolizado con Stonezyme se obtuvo un rendimiento de  $0.25 \pm 0.1$  g AT/g de bagazo. Finalmente, la Tabla 5 muestra el periodo de uso de cada uno de los lotes de hidrolizado producidos durante la operación del reactor en los Experimentos 1 y 2.

**Tabla 5.** Periodo de uso de cada uno de los lotes de hidrolizado alimentados al CSTR.

<b>Mezcla Enzimática Experimento 1</b>		<b>Enzima nacional Experimento 2</b>	
<b>Núm. De Lote</b>	<b>Periodo de duración (d)</b>	<b>Núm. De Lote</b>	<b>Periodo de duración (d)</b>
1	1 - 7	1	1 - 3
2	8 - 13	2	4 - 6
3	14 - 22	3	6 - 7
4	23 - 30	4	7 - 9
5	31 - 36	5	9 - 11
6	37 - 41	6	12 - 15
7	41 - 46	7	15 - 19
8	46 - 50	8	19 - 23
9	50 - 53	9	23 - 27
10	54 - 57	10	27 - 30
		11	31 - 35
		12	36 - 39

Con estos resultados se observa que a pesar de que se obtuvieron concentraciones mayores de  $DQO_{sol}$  y azúcares totales con la enzima individual en comparación con la mezcla enzimática, la proporción de AT respecto de la DQO es similar en ambos hidrolizados, (30.7% en el hidrolizado con la mezcla y 29.7% en el hidrolizado con Stonezyme). Así mismo, la concentración de AT obtenida en el hidrolizado con la mezcla enzimática ( $12.61 \pm 0.94$  g/L), fue mayor en comparación con las concentraciones obtenidas en la hidrólisis de bagazo utilizando solo Celluclast 1.5L, donde Montiel-Corona y Razo Flores (2018) reportan  $5.3 \pm 0.8$  g AT/L y Contreras-Davila et al. (2017), reportan  $11 \pm 3.7$  g AT/L, lo cual sugiere que emplear una mezcla enzimática es mejor que un solo grupo de enzimas.

#### **4.2 Producción de biohidrógeno en el CSTR con el hidrolizado obtenido con una mezcla enzimática, Experimento1**

El CSTR se operó durante 57 días bajo siete periodos de acuerdo con las condiciones descritas en las Tablas 2 y 5. El reactor se arrancó en lote y después de 24 horas, al momento de iniciar la operación en continuo, la concentración residual de azúcares totales fue de 0.43 g/L.

Durante el Periodo I, con una COV de 36 g DQO/L-d, el reactor mostró fluctuaciones en la VVPH de entre 2 y 5 L H<sub>2</sub>/L-d (Figura 4a). Durante el Periodo II a una COV de 40 g DQO/L-d se tuvo una operación estable obteniendo una VVPH de  $4.16 \pm 0.08$  L H<sub>2</sub>/L-d y un REH de  $84 \pm 0.22$  L H<sub>2</sub>/kg de bagazo. En el Periodo III se aumentó la COV a 52 g DQO/L-d, lo cual resultó en un aumento de la VVPH y el REH,  $7.66 \pm 0.03$  L H<sub>2</sub>/L-d y  $117 \pm 0.31$  L H<sub>2</sub>/kg de bagazo, respectivamente. Durante el Periodo IV a una carga de 60 g DQO/L-d, la VVPH alcanzó un valor máximo de 9.66 L H<sub>2</sub>/L-d, sin embargo, se presentó un problema en el suministro de energía eléctrica y, una vez resuelto este problema, se obtuvo una VVPH bajo condiciones de estado estable de  $7.72 \pm 0.05$  L H<sub>2</sub>/L-d, muy similar a la VVPH promedio alcanzada durante el Periodo III. Durante los Periodos V, VI y VII se continuó incrementando gradualmente la COV hasta 90 g de DQO/L-d, con la que se logró una VVPH máxima de 12.9 L y REH de 115 H<sub>2</sub>/Kg de bagazo (Figura 4b). La máxima VVPH obtenida en el Periodo VII es la más alta que se ha reportado en producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

El consumo de azúcares por periodo se muestra en la Figura 4c. En promedio, a lo largo del Experimento 1, se obtuvo una eficiencia de remoción de azúcares de 93%. La concentración de biomasa al final de la operación del reactor durante el Periodo VII fue de  $2.27 \pm 0.43$  g SSV/L.

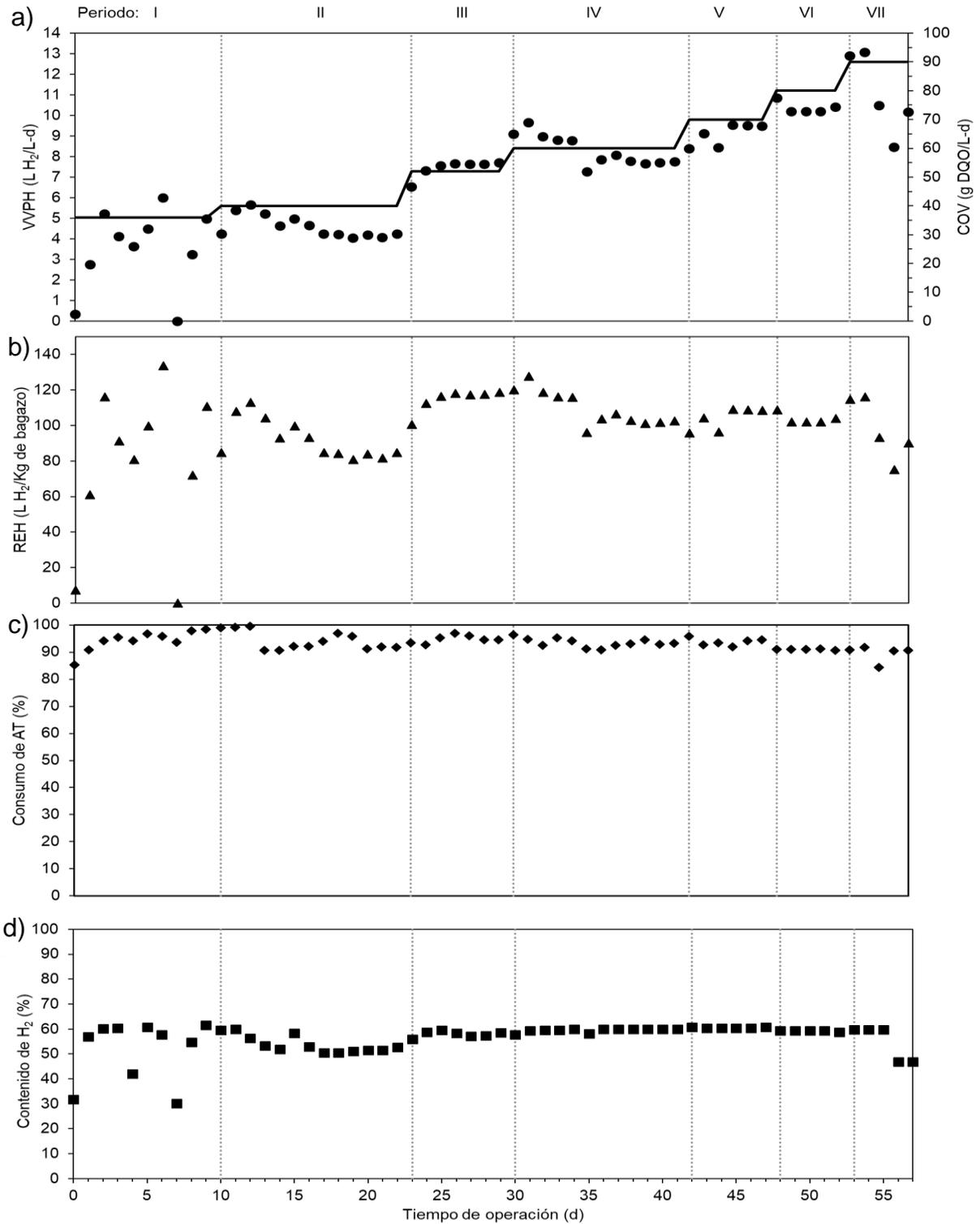
Respecto al contenido de H<sub>2</sub> en el gas durante la operación del CSTR, aunque el Periodo I mostró algunas fluctuaciones, el promedio de contenido de H<sub>2</sub> durante el Experimento 1 fue de 56.3% y el porcentaje máximo observado fue de 60% durante el Periodo V (Figura 4d).

En cuanto al rendimiento molar de hidrógeno (RMH) se observó una tendencia de aumento conforme la COV aumentaba (Tabla 6). El RMH máximo se alcanzó durante el Periodo III ( $3.83 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  de azúcar consumido). Este rendimiento tan cercano al rendimiento teórico ( $4 \text{ mol de H}_2/\text{mol}$  de glucosa) podría deberse a que el cálculo del rendimiento teórico está hecho por mol de hexosa, mientras que en el hidrolizado enzimático de la mezcla pudieron estar presentes otros azúcares o compuestos que pueden ser fermentados por las bacterias y convertirlos a hidrógeno, los cuales no están incluidos en el cálculo del RMH.

Los ácidos grasos volátiles (AGV) presentes durante el Experimento 1 fueron butirato y acetato (Tabla 6), lo que explica que se tuvieron las condiciones adecuadas para el proceso de fermentación oscura a lo largo del experimento y que se siguieron las rutas metabólicas más favorables para la producción de H<sub>2</sub>, que son las que tienen acetato y butirato como principales productos (Contreras-Dávila et al. 2017). Así mismo no se detectó presencia de lactato ni propionato en ninguno de los siete periodos, lo que significa que las rutas metabólicas no se desviaron para producir estos compuestos y concuerda con lo que se esperaba en este trabajo ya que no hubo disminución en la producción de hidrógeno debido a la producción de estos metabolitos (Lee and Rittmann, 2009). Las concentraciones de acetato y butirato durante los estados estables de operación (variación de la producción de gas inferior a 10% durante 3 días seguidos), fueron entre  $0.735 \pm 0.1$  y  $3.798 \pm 0.4$  g/L y entre  $1.518 \pm 0.3$  y  $4.437 \pm 0.2$  g/L, respectivamente (Tabla 6).

En cuanto al proceso de homoacetogénesis, en el cual el hidrógeno es consumido para producir acetato, se llevó a cabo un cálculo para conocer el porcentaje de acetato homoacetogénico siguiendo las ecuaciones 6 y 7 de la Tabla 3, el cual fue entre 29% durante el Periodo I y 43% del acetato total cuantificado durante el Periodo VII (Tabla 6).

El balance de DQO<sub>sol</sub> mostró que el acetato y butirato fueron los principales metabolitos que aportaron la mayor fracción en el efluente (Figura 5). Durante el Periodo I de operación los metabolitos solubles y el hidrógeno representaban en promedio cerca de 46% de la DQO soluble, en el Periodo III el 45% de la DQO<sub>sol</sub> estaba representado por butirato mientras que el 10% correspondía a hidrógeno. Los metabolitos y el hidrógeno representaron alrededor de 66% de la concentración de DQO<sub>sol</sub> en el efluente en el Periodo VII, mientras que 18% era aportado por la biomasa. El porcentaje de DQO<sub>sol</sub> no definido puede corresponder a otros subproductos que no fueron cuantificados, como podrían ser alcoholes o para el caso de los hidrolizados, carbohidratos que no se miden como carbohidratos totales.



**Figura 4.** Desempeño del CSTR en el Experimento 1 con el hidrolizado de la mezcla enzimática importada Celluclast 1.5L/Viscozyme. a) Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno, VVPH (●) y Carga Orgánica Volumétrica, COV (-); b) Rendimiento Específico de Hidrógeno, REH (▲); c) Eficiencia de Consumo de Azúcares (◆); d) Porcentaje de H<sub>2</sub> en el gas (■).

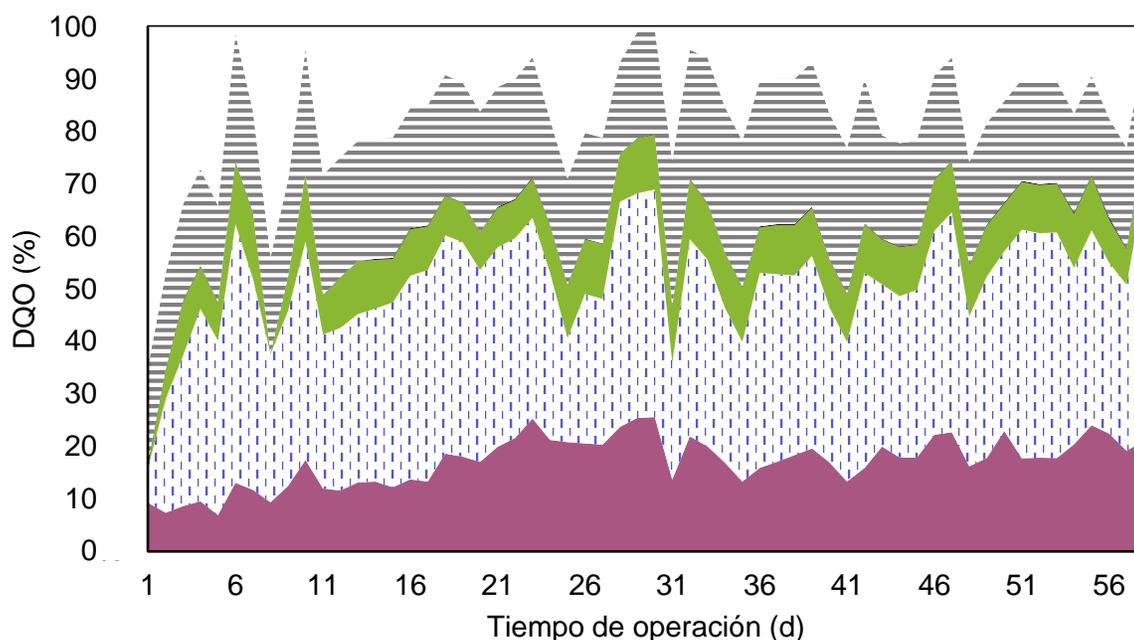
**Tabla 6.** Desempeño del CSTR en el Experimento 1 con el hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática Celluclast 1.5L/Viscozyme.

Periodo	COV (g DQO/L-d)	AGV (g/L)				H <sub>2</sub> (%)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido)	REH (L H <sub>2</sub> /kg bagazo)	Eficiencia consumo AT %	Homoaceto- génesis %
		Lactato	Acetato	Propionato	Butirato						
I <sup>a</sup>	36	0	0.735 ± 0.1	0	1.518 ± 0.3	54.3	4.07 ± 0.42	2.85 ± 0.26	86 ± 7	96	29.1
II <sup>a</sup>	40	0	1.848 ± 0.1	0	2.084 ± 0.1	51.3	4.16 ± 0.08	2.79 ± 0.09	84 ± 0.22	92	34.2
III <sup>b</sup>	52	0	3.134 ± 0.1	0	3.209 ± 0.2	57.8	7.66 ± 0.03	3.83 ± 0.05	117 ± 0.31	95	29.2
IV <sup>b</sup>	60	0	2.313 ± 0.4	0	2.496 ± 0.3	59.7	7.72 ± 0.05	3.45 ± 0.04	102 ± 0.73	93	24.3
V <sup>b</sup>	70	0	3.278 ± 0.5	0	3.472 ± 0.6	60.5	9.51 ± 0.02	3.58 ± 0.05	108 ± 0.28	93	24.2
VI <sup>c</sup>	80	0	3.509 ± 0.4	0	4.454 ± 0.4	59.1	10.25 ± 0.10	3.48 ± 0.04	103 ± 1.04	91	30.9
VII <sup>b</sup>	90	0	3.798 ± 0.4	0	4.437 ± 0.2	54.6	12.99 ± 0.12	3.55 ± 0.33	115 ± 1.02	92	43.4

<sup>a</sup>n=6

<sup>b</sup>n=3

<sup>c</sup>n=4



**Figura 5.** Balance de  $DQO_{sol}$  para el CSTR empleando los hidrolizados con la mezcla enzimática durante el Experimento 1. ■ Acetato □ Butirato ■ Hidrógeno ■ Azúcar Residual ≡ Biomasa □ N.D.

#### 4.3 Producción de biohidrógeno en el CSTR con el hidrolizado obtenido con una enzima nacional, Experimento 2

Durante el arranque del Experimento 2, el CSTR se operó en lote por 16 horas, en ningún momento se detectó producción de metano y la producción de hidrógeno se registró a las 16 horas después del arranque del reactor en lote, por lo que la operación en continuo comenzó a las 18 horas, antes de que se consumiera todo el sustrato. El CSTR fue operado en continuo por 39 días en seis periodos bajo las condiciones mencionadas en las Tablas 2 y 5.

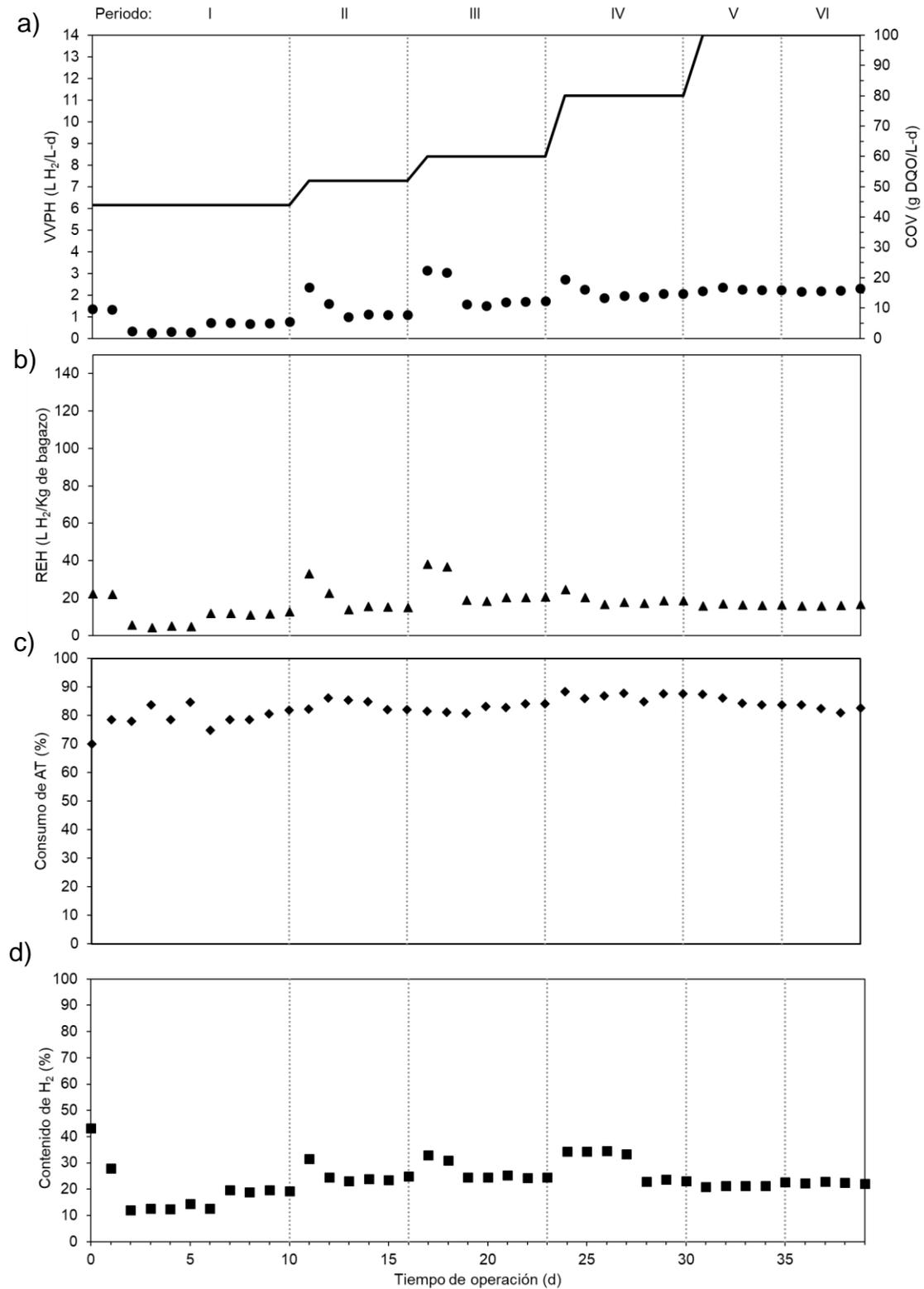
Durante el Periodo I se observó una VVPH de  $0.716 \pm 0.03$  L  $H_2$ /L-d y un RMH de 0.55 mol  $H_2$ /mol azúcar consumido a una COV de 44 g DQO/L-d. En el Periodo II la VVPH incremento a  $1.096 \pm 0.02$  L  $H_2$ /L-d al aumentar la COV a 52 g DQO/L-d y se observó una relación directa entre el aumento de la COV y el aumento en la VVPH (Figura 6a) ya que, durante el tercer Periodo a una COV de 60 g DQO/L-d, la VVPH

fue de  $1.695 \pm 0.01$  L H<sub>2</sub>/L-d y se tuvo un REH de  $20 \pm 0.2$  L H<sub>2</sub>/kg de bagazo (Figura 6b). Durante el Periodo IV se incrementó la COV a 80 g DQO/L-d resultando en una VVPH de  $2 \pm 0.08$  L H<sub>2</sub>/L-d, equivalente a tres veces más de la obtenida en el Periodo I y fue durante este periodo que se obtuvo el máximo REH (87 L H<sub>2</sub>/kg de bagazo) del Experimento 2. La máxima VVPH de 2.248 L H<sub>2</sub>/L-d se alcanzó durante el Periodo V a una COV de 100 g DQO/L-d. En el Periodo VI el CSTR se alimentó nuevamente a una COV de 100 g DQO/L-d, pero esta vez con hidrolizado centrifugado para determinar el posible impacto de sólidos en el desempeño del CSTR, sin embargo, no se observó ningún cambio en la VVPH (Figura 6a), lo que indica que los sólidos no tienen un efecto negativo en la producción de H<sub>2</sub>.

El consumo de azúcares a lo largo de los seis periodos de operación se muestra en la Figura 6c. La remoción de azúcares totales con el hidrolizado obtenido con Stonezyme en promedio fue de  $83 \pm 2.5\%$ . En cuanto a la concentración de SSV en el efluente durante el Experimento 2, ésta varió desde 1.48 hasta 9.4 g SSV/L. Una parte de los sólidos volátiles pueden ser atribuidos a los sólidos del hidrolizado, así como a los sólidos provenientes de la biomasa.

El contenido de H<sub>2</sub> en promedio durante la operación del CSTR alimentado con el hidrolizado obtenido con Stonezyme fue de 19%, menor al obtenido en el Experimento 1.

Con respecto a la concentración de metabolitos solubles se encontró únicamente acetato (entre  $1.6 \pm 0.1$  y  $5.6 \pm 0.2$  g/L) y butirato (entre  $1.9 \pm 0.3$  y  $5 \pm 0.2$  g/L), a excepción del Periodo I, donde se obtuvo una concentración mínima de lactato (0.25 g/L), tal como se muestra en la Tabla 7, lo que nos indica que la producción de hidrógeno se llevó a cabo por fermentación tipo acetato-butirato. En general, hasta una COV de 80 g DQO/L-d, la concentración de acetato y butirato fue menor que la que se obtuvo con la mezcla de enzimas, lo cual pudiera deberse a una menor producción de H<sub>2</sub>. A una COV de 100 g DQO/L-d, se encontró una mayor concentración de AGV que en el Experimento 1, esto probablemente debido a que a mayor COV la concentración de sustrato es mayor, lo cual aumenta el metabolismo microbiano y explica una mayor producción de estos metabolitos (Contreras-Davila et al., 2017; Kyazze et al., 2006).



**Figura 6.** Desempeño del CSTR en el Experimento 2 con el hidrolizado que se obtuvo con la enzima nacional Stonezyme. a) Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno, VVPH (●) y Carga Orgánica Volumétrica, COV (-); b) Rendimiento Específico de Hidrógeno, REH (▲); c) Eficiencia de Consumo de Azúcares (◆); d) Porcentaje de H<sub>2</sub> en el gas (■).

**Tabla 7.** Producción de hidrógeno y metabolitos en el Experimento 2 con el hidrolizado obtenido con Stonezyme

Periodo	COV (g DQO/L-d)	AGV (g/L)				H <sub>2</sub> (%)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	RMH (mol H <sub>2</sub> /mol azúcar consumido)	REH (L H <sub>2</sub> /kg bagazo)	Consumo AT %	Homoaceto- génesis %
		Lactato	Acetato	Propionato	Butirato						
I <sup>a</sup>	44	0.25	1.625 ± 0.1	0	1.990 ± 0.3	18	0.716 ± 0.03	0.553 ± 0.02	12 ± 0.61	79	56.6
II <sup>b</sup>	52	0	1.095 ± 0.1	0	1.619 ± 0.3	24	1.096 ± 0.02	0.680 ± 0.001	15 ± 0.28	83	56.8
III <sup>b</sup>	60	0	1.689 ± 0.1	0	2.480 ± 0.5	25	1.695 ± 0.01	0.924 ± 0.007	20 ± 0.20	84	55.6
IV <sup>b</sup>	80	0	2.048 ± 0.4	0	3.698 ± 0.2	23	2.015 ± 0.08	0.740 ± 0.01	18 ± 0.80	87	64.7
V <sup>b</sup>	100	0	5.561 ± 0.5	0	4.724 ± 0.4	22	2.248 ± 0.03	0.681 ± 0.004	16 ± 0.14	83	45.9
VI <sup>b</sup> *	100	0	5.641 ± 0.2	0	5.067 ± 0.2	22	2.233 ± 0.05	0.692 ± 0.01	16 ± 0.42	82	49.3

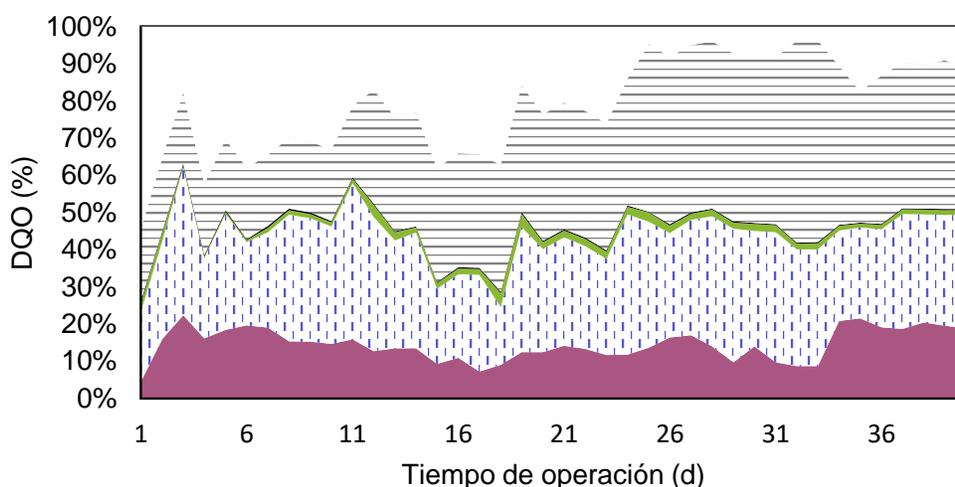
<sup>a</sup>n=5

<sup>b</sup>n=3.

\*hidrolizado centrifugado

En cuanto al rendimiento molar de hidrógeno, durante los primeros tres periodos se observó una tendencia positiva con respecto al aumento de COV y VVPH (Tabla 7), sin embargo, el RMH disminuyó (0.74 y 0.68 mol H<sub>2</sub>/mol de hexosa) al aumentar la COV a 80 y 100 g DQO/L-d. La disminución del RMH con el aumento de la COV ya se había observado en estudios previos, donde el valor máximo de RMH no se obtuvo a la mayor COV (Contreras-Davila et al. 2017; Davila-Vazquez et al. 2009; Van Ginkel et al. 2005). Los rendimientos molares de hidrógeno tan bajos podrían deberse al proceso de homoacetogénesis, ya que el porcentaje de acetato homoacetogénico estimado teóricamente en el Experimento 2 fue de entre 45 y 67% del acetato total cuantificado (Tabla 7).

El balance de DQO<sub>sol</sub> mostró que los metabolitos presentes (acetato y butirato) fueron los que aportaron la mayor cantidad de la DQO<sub>sol</sub> en el efluente (Figura 7). Durante el Periodo I y II del CSTR (días 1-16), los metabolitos solubles y el hidrógeno representaban en promedio cerca de 50% de la DQO, entre los días 24 y 30 de la operación, 34% de la DQO<sub>sol</sub> estaba representado por butirato, mientras que 11% correspondía a acetato. La DQO<sub>sol</sub> de los metabolitos y el hidrógeno durante el Periodo V representaron alrededor del 47% de la concentración de DQO<sub>sol</sub> en el efluente, en el último periodo, entre los días 31 a 39 el porcentaje de DQO<sub>sol</sub> por butirato se mantuvo entre 34 y 37%, mientras que el 48 a 54 % era aportado por la biomasa.



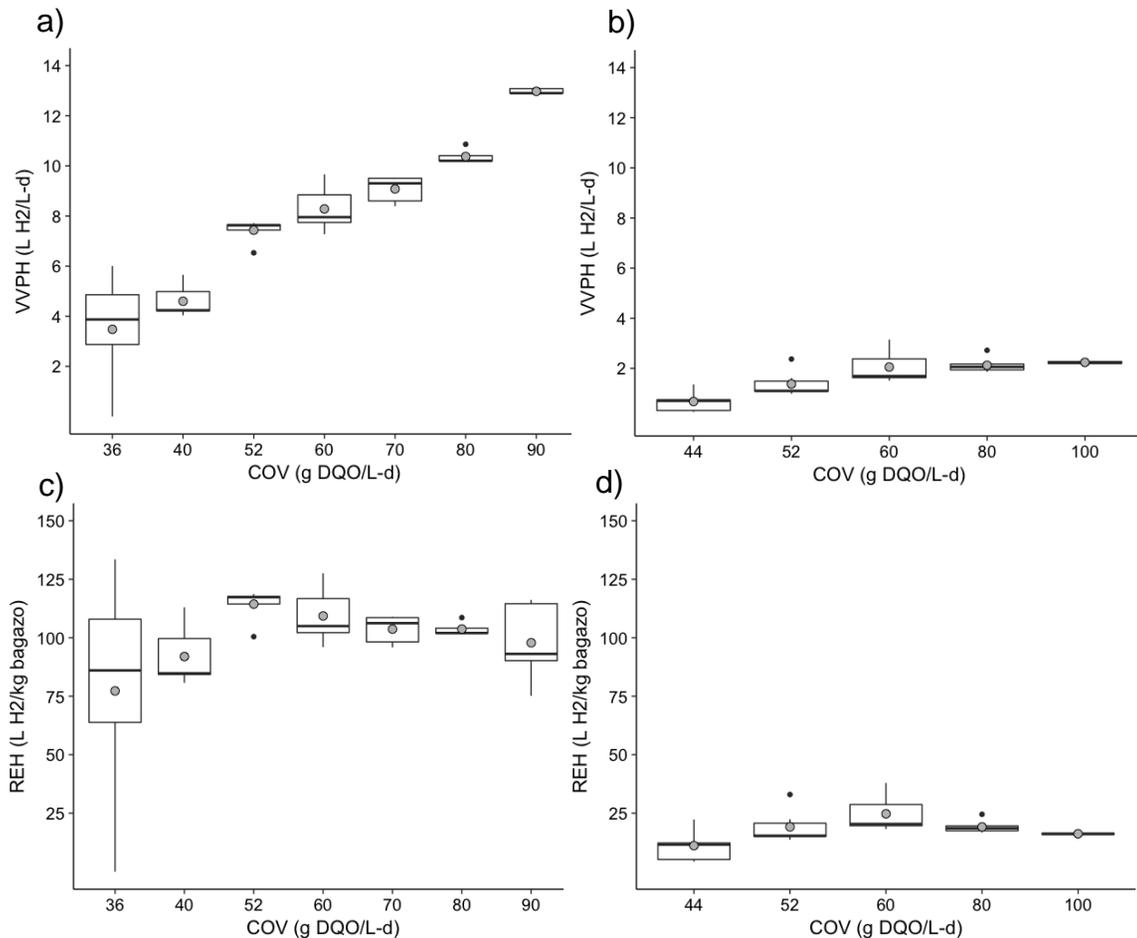
**Figura 7.** Balance de DQO<sub>sol</sub> para el CSTR empleando los hidrolizados con la mezcla enzimática durante el Experimento 2.

#### 4.4 Desempeño de los CSTRs con los diferentes hidrolizados enzimáticos.

Las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno obtenidas en los Experimentos 1 y 2 en el CSTR se muestran en las Figuras 8a y 8b, respectivamente, mediante diagramas de cajas. En estas figuras se observa claramente la relación directa que hubo entre la COV y la VVPH en ambos ensayos, donde conforme aumentaba la COV se obtenían VVPH más altas, logrando operar a cargas máximas de 90 y 100 g DQO/L-d, respectivamente, con los hidrolizados obtenidos con la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme y con Stonezyme.

La principal diferencia entre ambos hidrolizados se observó en la VVPH, ya que la producción de H<sub>2</sub> en el Experimento 1 con la mezcla enzimática fue mucho mayor (VVPH máxima de 12.9 L H<sub>2</sub>/L-d) a una COV de 90 g DQO/L-d (Figura 8a), en comparación con la máxima VVPH alcanzada en el Experimento 2 con el hidrolizado de Stonezyme, la cual fue de solo 2.2 L H<sub>2</sub>/L-d a una COV de 100 g DQO/L-d (Figura 8b). Con relación al punto anterior, es importante hacer una comparación en la remoción de azúcares totales, ya que durante el Experimento 1 con la mezcla enzimática se obtuvo una remoción de azúcares mayor ( $93 \pm 2.7\%$ ), que la remoción obtenida con Stonezyme en la Experimento 2 ( $83 \pm 2.5\%$ ), lo cual está relacionado a la baja producción de hidrógeno, ya que al utilizar el hidrolizado obtenido con Stonezyme el desempeño de la producción de hidrógeno fue claramente afectado, en comparación con el desempeño al utilizar el hidrolizado de la mezcla enzimática. Una posible razón por la cual se obtuvieron menores VVPH son los compuestos liberados durante la hidrólisis, que aunque no se caracterizaron, de acuerdo con la literatura los monómeros de glucosa son los que más fácilmente degradan los microorganismos para la producción de hidrógeno, y compuestos con estructuras más complejas como dímeros y oligómeros son difícilmente degradados por las bacterias, lo que se refleja en bajos rendimientos de producción de H<sub>2</sub> (Elbeshbishy et al. 2017). Sería de suma importancia realizar un análisis mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas que permita caracterizar los hidrolizados y así confirmar el papel fundamental de su composición en la producción de hidrógeno.

Por otro lado, comparando la máxima VVPH obtenida en el Experimento 1 utilizando la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme con los trabajos de Contreras-Davila et al. (2017) y Montiel-Corona y Razo Flores (2018) mostrados en la Tabla 8, se observa que la VVPH alcanzada en el Experimento 1 es la mayor reportada hasta el momento en CSTRs utilizando hidrolizados de bagazo de agave como sustrato.



**Figura 8.** Diagrama de cajas que muestra el efecto de la carga orgánica volumétrica (COV) en la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y el rendimiento específico de hidrógeno (REH) en el CSTR para los hidrolizados con la mezcla enzimática del Experimento 1 (a, c) y con Stonezyme del Experimento 2 (b, d). Las cajas están divididas por la mediana y contiene el 50% de los datos; (●) promedio de los valores. Las líneas verticales indican la variabilidad fuera de los cuartiles superiores e inferiores.

En las Figuras 8c y 8d se muestra el rendimiento específico de hidrógeno con la mezcla enzimática y con Stonezyme, respectivamente, el cual también mostró una

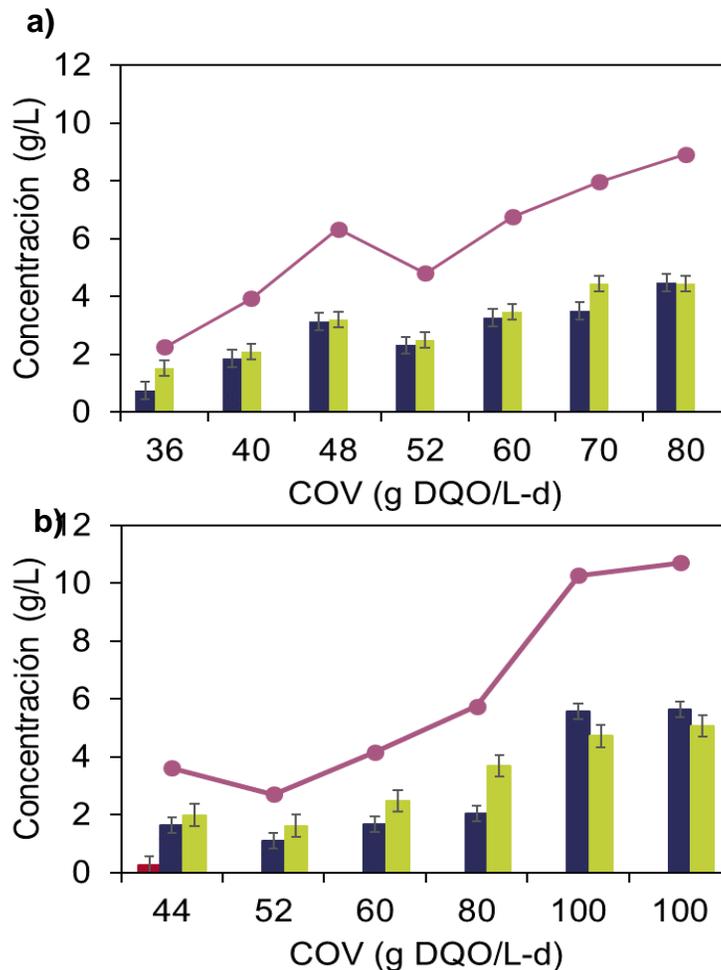
relación directa positiva con la COV para ambos hidrolizados. Sin embargo, hay una gran diferencia en los rendimientos con los distintos hidrolizados, durante el Experimento 1 con la mezcla enzimática a una COV de 90 g DQO/L-d se obtuvo un REH entre 115 y 117 L H<sub>2</sub>/kg bagazo, el cual es sustancialmente mayor que el REH máximo obtenido en el Experimento 2 con Stonezyme, 16 L H<sub>2</sub>/kg bagazo, a una COV de 100 g DQO/L-d, lo cual pudiera deberse a la remoción menor de AT y a las razones anteriormente mencionadas respecto de la posible diferencia en la composición de los hidrolizados.

La Figura 9 muestra que a pesar de que la producción de H<sub>2</sub> con la mezcla enzimática fue mayor que con Stonezyme, la concentración total de AGV en el efluente fue menor para el CSTR operado con la mezcla enzimática (9 g/L), en comparación con Stonezyme (11 g/L). La razón por la cual con Stonezyme la concentración de AGV es mayor y la producción de hidrógeno menor que con la mezcla, podría deberse a la presencia de rutas metabólicas donde el hidrógeno es consumido (Cabrol et al., 2017), y no tanto por inhibición debido a altas concentraciones de metabolitos en el sistema, como lo sugiere Contreras-Dávila (2015), y como lo observaron Kim, Han, & Shin (2008) donde a concentraciones de AGV mayores a 10 g/L observaron un descenso en la producción de hidrógeno. De modo que la relación molar H<sub>2</sub>/(acetato + butirato), que es un indicador de consumo de hidrógeno propuesto por autores como Motte et al. (2014), donde valores menores a 2 sugieren la presencia de otras rutas metabólicas en las cuales el hidrógeno es consumido; en tal sentido, durante el Experimento 2 se observaron relaciones con valores menores a 2 (entre 1.43 y 0.66), lo cual sugiere que el aumento en metabolitos y disminución de hidrógeno puede deberse a un incremento en el consumo de H<sub>2</sub>.

Tanto en el Experimento 1 como en el Experimento 2, el butirato fue el metabolito que predominó alcanzando concentraciones entre 4 y 5 g/L, respectivamente, por lo que se habla de una fermentación en su mayoría butírica en ambos experimentos. Al inicio del Experimento 2 se observó una baja concentración de lactato (0.25 g/L), la cual desapareció en el Periodo II de operación cuando el reactor se estabilizó; a

partir de ahí solo se observó acetato y butirato en el efluente del reactor al igual que con la mezcla enzimática.

Al final del Experimento 2 a una COV de 100 g DQO/L-d se observó una mayor concentración de acetato que butirato. Esto pudiera deberse al aumento en el consumo del hidrógeno por homoacetogénesis.

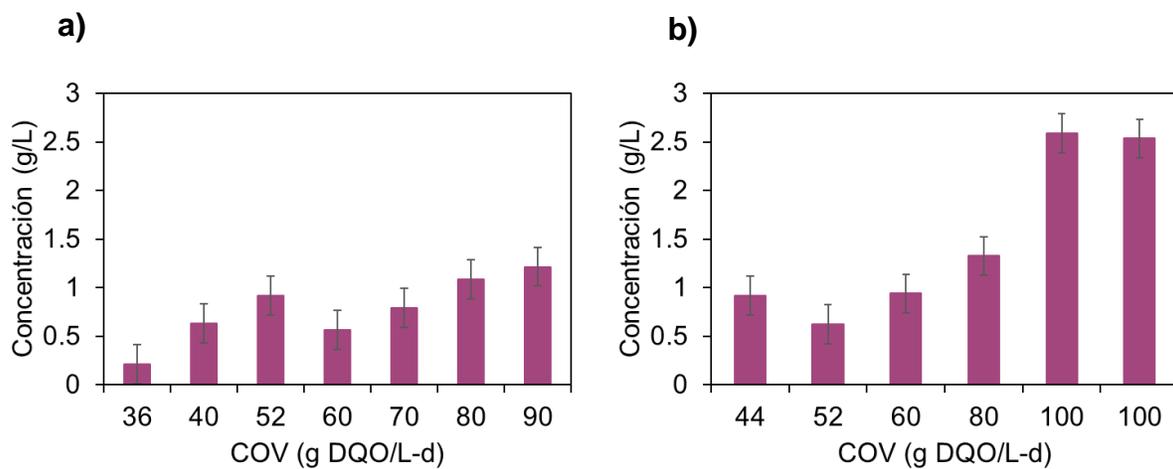


**Figura 9.** Perfiles de concentración de AGV a lo largo de la operación de los CSTR´s con Celluclast 1.5L/Viscozyme del Experimento 1 (a), con Stonezyme del Experimento 2 (b). ■ Lactato, ■ Acetato, ■ Butirato y concentración total de AGV (●).

**Tabla 8.** Desempeño de la producción de hidrógeno en reactores CSTR empleando hidrolizados enzimáticos de sustratos lignocelulósicos.

Reactor	Sustrato	Enzima	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	REH (L H <sub>2</sub> /Kg bagazo)	Referencia
CSTR	Bagazo de Agave	Celluclast 1.5L	52.2	2.53	55	(Contreras-Davila et al., 2017)
CSTR	Bagazo de Agave	Celluclast 1.5L	44	6	105	(Montiel-Corona y Razo Flores 2018)
CSTR	Paja de trigo	Cellic C Htech	70.3	5.19	N.R.	(Pawar et al., 2013)
CSTR	Bagazo de Agave	Celluclast 1.5L/Viscozyme	90	12.99	115	Este estudio
CSTR	Bagazo de Agave	Stonezyme	100	2.23	16	Este estudio

En cuanto al porcentaje de homoacetogénesis al inicio de la operación del CSTR en el Experimento 1 fue de 29.1% (0.21 g/L de acetato homoacetogénico), un valor muy similar al obtenido por Montiel-Corona y Razo-Flores (2018), quienes reportaron un porcentaje de homoacetogénesis de  $29.1 \pm 1\%$ . Durante el Periodo II y III, cuando la COV aumentó a 40 y 48 g DQO/L-d se observa un aumento en la concentración de acetato homoacetogénico (0.63 y 0.91 g/L, respectivamente). Contrario a la VVPH y el REH, no se observó relación entre la COV y el proceso de homoacetogénesis, ya que al subir nuevamente la COV, ahora a 52 y 60 g DQO/L-d la concentración de acetato homoacetogénico disminuyó a 0.79 g/L (Figura 10a), no es sino hasta el último periodo a una COV de 90 g DQO/L-d donde se observó la máxima concentración de acetato homoacetogénico (1.21 g/L), la cual es menor a obtenida en el Experimento 2 (Figura 10b) a una COV similar, donde aunque se reporta un menor porcentaje de homoacetogénesis, la concentración máxima de acetato homoacetogénico fue de 2.53 g/L, lo que pudiera ser una razón más de las bajas velocidades volumétricas de producción de hidrógeno obtenidas con Stonezyme.



**Figura 10.** Perfil de la concentración de acetato producido por homoacetogénesis a lo largo de la operación de los CSTR's con Celluclast 1.5L/Viscozyme del Experimento 1 (a) y Stonezyme del Experimento 2 (b).

#### 4.5 Costo de producción de biohidrógeno con los diferentes hidrolizados.

El costo de la producción por litro de hidrógeno para los Experimentos 1 y 2 se calculó tomando en cuenta solo el precio de las enzimas y el costo del buffer de citratos 50 mM, que se compone de ácido cítrico (\$0.45 por gramo) y citrato de sodio (\$0.43 por gramo). De esta manera se calculó que el costo por litro de hidrolizado obtenido con la mezcla de Celluclast 1.5 L (\$1.05 por mL) y Viscozyme (\$29.95 mL) es de \$113.01 (Tabla 9).

**Tabla 9.** Costo por litro de hidrolizado con la mezcla enzimática del Experimento 1.

Componentes	Cantidad	Costo
Celluclast 1.5L	25 mL	\$ 26.25
Viscozyme	2.72 mL	\$ 81.46
Ac. Cítrico	6.7 g	\$ 3.02
Citrato de Sodio	5.3 g	\$ 2.28
Costo total por litro de hidrolizado		\$ 113.01

Partiendo del costo para producir un litro de hidrolizado con la mezcla, se realizó el cálculo para conocer el costo por litro de H<sub>2</sub> producido con cada COV usando las ecuaciones 8 y 9 de la Tabla 3. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Costo por litro de hidrógeno con la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme del Experimento 1.

COV (g DQO/L-d)	Hidrolizado (L/d)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	Costo L de H <sub>2</sub>
36	0.9	4	\$ 25.43
40	1	4.1	\$ 27.56
52	1.3	7.66	\$ 19.18
60	1.5	7.72	\$ 21.96
70	1.75	9.51	\$ 20.80
80	2	10.25	\$ 22.05
90	2.25	12.9	\$ 19.56

De acuerdo con estos resultados, el costo por litro de hidrógeno a una COV de 90 g DQO/L-d es de \$19.56, que es el costo más bajo a la COV con la que se obtuvo la máxima VVPH. Por otro lado, el análisis económico de la producción de hidrógeno a partir del hidrolizado obtenido con Stonezyme, usando nuevamente las ecuaciones 8 y 9, indica que el costo por litro de hidrolizado es de \$ 40.2 como se muestra en la Tabla 11, mientras que el costo por litro de hidrógeno a la máxima VVPH obtenida es de \$ 31.58 como se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 11.** Costo por litro de hidrolizado con Stonezyme en el Experimento 2.

Componentes	Cantidad	Costo	
Stonezyme	82.97 mL	\$	34.85
Ac. Cítrico	6.35 g	\$	2.86
Citrato de Sodio	5.8 g	\$	2.49
Costo total por litro de hidrolizado		\$	40.20

**Tabla 12.** Costo por litro de hidrógeno con Stonezyme en el Experimento 2.

COV (g DQO/L-d)	Hidrolizado (L/d)	VVPH (L H <sub>2</sub> /L-d)	Costo L de H <sub>2</sub>	
44	0.772	0.716	\$	43.34
52	0.912	1.096	\$	33.45
60	1.053	1.695	\$	24.97
80	1.404	2.015	\$	28.01
100	1.754	2.248	\$	31.37
100	1.754	2.233	\$	31.58

Debido al alto precio de las enzimas comerciales importadas, el costo por litro de hidrolizado obtenido a partir de la mezcla enzimática es cerca de 3 veces mayor

(\$113.01) que el costo por litro de hidrolizado obtenido a partir de Stonezyme (\$40.20). Sin embargo, al momento de comparar costos de producción por litro de hidrógeno, el costo de la producción de un litro de H<sub>2</sub> es menor con la mezcla enzimática a cualquier COV, que con el hidrolizado obtenido a partir de una enzima comercial nacional. Lo anterior es debido a los bajos resultados de VVPH obtenidos con Stonezyme en comparación con los altos valores obtenidos con la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme.

Finalmente se realizó una comparación del costo usando los mismos parámetros de cálculo, los cuales se muestran en la Tabla 13, donde podemos observar que el costo de producción de hidrógeno con la mezcla enzimática no supera los bajos costos de producción que se obtuvieron usando solo Celluclast 1.5L en la hidrólisis de bagazo de agave reportados por Montiel-Corona y Razo Flores (2018), debido a que al solo ser una enzima a menor concentración en el hidrolizado y con VVPH no tan bajas, el costo por litro de hidrógeno es menor.

**Tabla 13.** Costo por litro de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave.

Reactor	Enzima	VHPR (L H <sub>2</sub> /L-d)	Costo L H <sub>2</sub>	Referencia
CSTR	Celluclast 1.5L	2.53	\$ 18.66	(Contreras-Davila et al., 2017)
CSTR	Celluclast 1.5L	6	\$ 7.35	(Montiel-Corona y Razo Flores 2018)
CSTR	Celluclast 1.5L/Viscozyme	12.9	\$ 19.56	Este trabajo
CSTR	Stonezyme	2.23	\$ 31.37	Este trabajo

## 5. Conclusiones y Perspectivas

### 5.1 Conclusiones

Los hidrolizados obtenidos a partir de una mezcla de enzimas comerciales importadas (Celluclast 1.5L/Viscozyme) y de una enzima comercial nacional (Stonezyme) tuvieron un resultado diferente en la sacarificación del bagazo de agave y en la producción de hidrógeno. Ambos hidrolizados enzimáticos de bagazo permitieron operar a altas COV (90 y 100 g DQO/L-d, respectivamente). Al usar la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme se obtuvo una menor concentración de azúcares totales (12.61 g/L) pero se logró una mayor velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (12.9 L H<sub>2</sub>/L-d), a diferencia del hidrolizado obtenido con Stonezyme, donde a pesar de obtener una mayor concentración de azúcares totales (17.47 g/L), se obtuvo una menor velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (2.2 L H<sub>2</sub>/L-d).

Los resultados obtenidos sugieren que la producción de hidrógeno esta significativamente influenciada por la composición y el tipo de azúcares presentes en el hidrolizado. Es decir, una menor remoción de azúcares totales en la producción de hidrógeno con Stonezyme (83 ± 2.5%) en comparación con remociones por arriba de 90% con la mezcla Celluclast 1.5L/Viscozyme, sugieren que la composición de oligómeros en los dos hidrolizados es diferente y que diversos compuestos, tales como estabilizantes que vienen en las preparaciones de las enzimas, podrían estar afectando la producción de hidrógeno.

En este estudio, la producción de un litro de hidrógeno resultó ser más económica utilizando hidrolizado obtenido con una mezcla de enzimas comerciales importadas que con el hidrolizado obtenido con una enzima nacional más económica, debido a los altos rendimientos alcanzados con la mezcla, lo cual es una condición deseable para aplicaciones industriales.

## 5.2 Perspectivas

A pesar de que el costo de la producción de hidrolizado con Stonezyme es muy bajo, es conveniente estudiar a detalle la composición de los estabilizantes y compuestos que acompañan a la enzima, para tener certeza de lo que posiblemente está influyendo en la baja VVPH. Lo anterior ayudaría a plantear una opción para incrementar la producción de hidrógeno con esta enzima y por consiguiente disminuir el costo de producción de H<sub>2</sub>.

Dado que Stonezyme tiene actividades más altas de 1,4-β-endoglucanasa, β-glucosidasa y xilanasas que Celluclast 1.5L y Viscozyme, sería de interés determinar que compuestos en la preparación de la enzima podrían estar influyendo en el bajo desempeño de producción de hidrógeno. Sin embargo, esto requiere de establecer comunicación con la empresa que produce la preparación enzimática (ENMEX) para realizar un estudio que permite definir los cambios en su formulación, para de esta forma tener una preparación enzimática con mayor eficiencia de hidrólisis.

Otra posible alternativa es preparar mezclas de Stonezyme con enzimas con actividad de hemicelulasa tal como Viscozyme, para determinar si gracias al sinergismo de esta mezcla la concentración de azúcares totales en el hidrolizado incrementa o cambia de composición y la producción de hidrógeno aumenta.

Finalmente, dado que el CSTR ha demostrado ser una buena configuración de reactor para la producción de hidrógeno es importante realizar una revisión del nivel de madurez de la tecnología (TRL, por sus siglas en inglés) en el cual se encuentra el uso del reactor para la producción de H<sub>2</sub>, aunado al estudio de la metodología a seguir en un futuro cercano para establecer si realmente esta tecnología es escalable a niveles más altos de TRL y que puede llegar incluso a escala piloto o industrial.

## Referencias

- APHA. (1997). Standar Methods for examination of water & wastewater. Retrieved from [www.standardmethods.org](http://www.standardmethods.org)
- Arreola-vargas, J., Alatraste-mondragón, F., Celis, L. B., Razo-flores, E., López-lópez, A., & Méndez-acosta, H. O. (2015). Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum : effect of simple and complex substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(6), 1062–1069. <https://doi.org/10.1002/jctb.4410>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(2), 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Arriaga, S., Rosas, I., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(5), 3442–3449. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.019>
- Bals, B., Rogers, C., Jin, M., Balan, V., & Dale, B. (2010). Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-1>
- Bartels, J. R., Pate, M. B., & Olson, N. K. (2010). An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(16), 8371–8384. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.035>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*,

41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

- Carrillo-Reyes, J. (2013). *Producción de hidrógeno en reactores de biomasa fija , implicaciones de microorganismos hidrogenotróficos*. Instituto de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Tesis de doctorado, febrero 2013, 108 páginas.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5591–5601. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.004>
- Carrillo-Reyes, J., Cortés-Carmona, M. A., Bárcenas-Ruiz, C. D., & Razo-Flores, E. (2016). Cell wash-out enrichment increases the stability and performance of biohydrogen producing packed-bed reactors and the community transition along the operation time. *Renewable Energy*, 97, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.05.082>
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., & Martínez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Chang, P. L., Hsu, C. W., Lin, C. Y., & Hsiung, C. M. (2011). Constructing a new business model for fermentative hydrogen production from wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13914–13921. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.066>
- Contreras-Dávila, C. A. (2015). *Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos Agave tequilana Weber*. Instituto de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., Tesis de Maestría, 108.
- Contreras-Davila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatríste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A.,

- Rosales-Colunga, L. M., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(1), 27–45. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296–4304. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>
- Doherty, W. O. S., Mousavioun, P., & Fellows, C. M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 259–276. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.022>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(October 2015), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Galindo-Hernández, K. L. (2017). *Deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de hidrógeno y metano*. Instituto de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Tesis de Maestría, 71.
- Hu, J., Arantes, V., & Saddler, J. N. (2011). The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-36>
- Jung, K., Kim, D., Kim, S., & Shin, H. (2011). Bioresource Technology Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8612–8620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.056>
- Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2008). Optimization of continuous hydrogen

- fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochemistry*, 43(2), 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.007>
- Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V., & Tyagi, S. K. (2012). Fermentative hydrogen production - An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2337–2346. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.002>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry*, 48(8), 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Kyazze, G., Martinez-Perez, N., Dinsdale, R., Premier, G. C., Hawkes, F. R., Guwy, A. J., & Hawkes, D. L. (2006). Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5), 971–979. <https://doi.org/10.1002/bit.20802>
- Lee, H. S., & Rittmann, B. E. (2009). Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 749–758. <https://doi.org/10.1002/bit.22107>
- Lee, S. H., Teramoto, Y., & Endo, T. (2009). Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I - Effect of additives with cellulose affinity. *Bioresource Technology*, 100(1), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.051>
- López-Gutiérrez, I. (2015). *Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de Agave tequilana Weber var. azul: Efecto del procesamiento de la piña y de la sacarificación del bagazo*. Instituto de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., Tesis de Maestría, 116.
- Montiel-Corona, V., & Razo-flores, E. (2018). Bioresource Technology Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery e ffi ciency. *Bioresource Technology*, 249(October 2017), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Montiel, C., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., &

- Bárzana, E. (2016). Enhanced Bioethanol Production from Blue Agave Bagasse in a Combined Extrusion–Saccharification Process. *Bioenergy Research*, *9*(4), 1005–1014. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9747-x>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *96*(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Motte, J. C., Trably, E., Hamelin, J. Ô., Escudié, R., Bonnafous, A., Steyer, J. P., ... Dumas, C. (2014). Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. *Bioresource Technology*, *166*, 610–615. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.078>
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K. L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J. A., ... Razo-Flores, E. (2018). Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *20*(7), 1423–1441. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>
- Pawar, S. S., Nkemka, V. N., Zeidan, A. A., Murto, M., & van Niel, E. W. J. (2013). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* followed by biogas production in a two-step uncoupled process. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(22), 9121–9130. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.075>
- Perez-Pimienta, J. A., Lopez-Ortega, M. G., Chavez-Carvayar, J. A., Varanasi, P., Stavila, V., Cheng, G., ... Simmons, B. A. (2015). Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, *75*, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.026>
- Rodrigues, A. C., Haven, M. Ø., Lindedam, J., Felby, C., & Gama, M. (2015). Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme and Microbial Technology*, *79–80*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.019>
- Singal, R., Grimes, S. R., Kim, H., Song, H., Jeong, M., Sim, S., ... Yang, J. (2011).

Enzymatic Saccharification of *Salix viminalis* cv . Q683 Biomass for Bioethanol Production. *Biotechniques*, 27(3), 143–149. [https://doi.org/Chronic ischaemic mitral regurgitation. Current treatment results and new mechanism-based surgical approaches](https://doi.org/Chronic%20ischaemic%20mitral%20regurgitation.%20Current%20treatment%20results%20and%20new%20mechanism-based%20surgical%20approaches)☆

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., & Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713–728. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.051>

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>

Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., ... Ruiz-Filippi, G. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>

Van Ginkel, S. W., & Logan, B. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, 39(16), 3819–3826. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.021>

Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., ... Rigal, L. (2014). A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and biocatalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products*, 55, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>

Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production : A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>

## ANEXO 1

La siguiente tabla muestra la caracterización de las enzimas en función de sus actividades hidrolíticas.

Caracterización de las enzimas.

<b>Enzima</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>Celulasa (FPU/mL)</b>	<b>1,4-<math>\beta</math>- endoglucanasa (EGU/mL)</b>	<b><math>\beta</math>- glucosidasa (U/mL)<sup>a</sup></b>	<b>Xilanasas (U/mL)<sup>b</sup></b>
Celluclast 1.5L	32.45	46.028	177.94	0.72	740
Viscozyme	18.9	2	211.92	0.74	195
Stonezyme	36.52	44.53	560.42	6.19	13312

<sup>a</sup> U: Cantidad de enzima requerida para remover un micromol de p-nitrofenol por minuto.

<sup>b</sup> U: cantidad de enzima requerida para remover un micromol de xilosa por minuto.