

IPICYT

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

DIVISIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES

**Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de
residuos agrícolas para la producción de metano**

Tesis que presenta
IBQ. Francisco Gómez Tovar

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS

Con opción terminal en **Ciencias Ambientales**

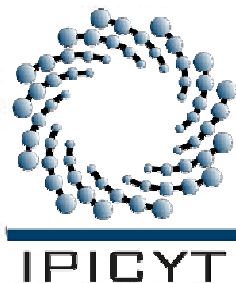
Codirectores:

Dr. Felipe Alatríste Mondragón
Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García

Asesores:

Dr. Alberto Flores Martínez
Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luís Potosí, SLP.
Noviembre del 2008



Constancia de Aprobación de Tesis

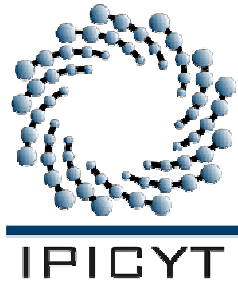
La tesis "**Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Francisco Gómez Tovar** y aprobada el **21 de Noviembre del 2008** 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. Felipe Alatraste Mondragón
Codirector de tesis

Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis
García
Codirectora de tesis

Dr. Alberto Flores Martínez
Asesor de tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores
Asesor de tesis



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de Ingeniería Ambiental de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Felipe Alatraste Mondragón y de la Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-060205).

Agradecimiento al FOMIX FMSLP-2005-C01-23 del fondo mixto San Luis Potosí-CONACYT, cuyo responsable técnico es el Dr. Elías Razo Flores



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 024 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de noviembre del año 2008, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Alberto Flores Martínez	Presidente	UGTO
Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Secretario	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Sinodal	IPICYT

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

**MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

Francisco Gómez Tovar

sobre la Tesis intitulada:

Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Dr. Felipe Alatraste Mondragón

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de noviembre de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bomilla Arrín
Secretario Académico



Dedicatoria

A mi familia y a mis amigos por darme todo el apoyo que necesitaba mientras estaba lejos de ustedes, principalmente a mi Mamá por estar siempre pendiente de mí y a mi Papá, que aunque no está aquí físicamente, sé que me acompaña en todo lo que hago. Muchas gracias y esto es por ustedes.

La sabiduría consiste en saber cuál es el siguiente paso; la virtud, en llevarlo a cabo.

David Starr Jordan

Agradecimientos

Al Dr. Felipe Alatríste y a la Dra. Berenice Celis por todo el apoyo que me dieron tanto en lo personal como en mi formación profesional.

Al Dr. Sergio Casas y al Dr. Alberto Flores por ser mis asesores y aportar a mi formación profesional.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales (Dulce Partida, Guillermo Vídríales, Rebeca Pérez y Griselda Chávez) por apoyarme en cada uno de los experimentos que hice y perdonar las fallas que tuve.

A los auxiliares de biblioteca (Ofelia Rico, Elizabeth Ramírez y Víctor Mata) por toda la ayuda que me dieron en la obtención de artículos.

A todos y cada uno de mis amigos Carmen, Cesar, Alberto, Horacio, Dulce, Gigi, Ana, Marlín, Gris, Rebe, Gus, Pau, Olga, Luz y muchos otros que aunque no puedo enlistarlos porque abarcaría toda la página ellos saben quienes son, a todos gracias por compartir un poco de su tiempo conmigo y hacer de esta estancia un recuerdo inolvidable.

CONTENIDO

Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumen	xv
Abstract	xvi

ÍNDICE

	Pag.
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. La biomasa como fuente de energía	3
2.1.1. Origen y tipos de biomasa	4
2.1.1.1. Residuos orgánicos	4
2.1.1.2. Cultivos energéticos	5
2.1.2. Organización de polisacáridos en los residuos agrícolas	6
2.2. Generalidades de la degradación anaerobia	8
2.2.1. Procesos microbianos involucrados en la degradación anaerobia	9
2.2.2. Reactores anaerobios	11
2.3. Procesos de solubilización de azúcares	12
2.3.1. Procesos químicos	13
2.3.1.1. Producción de hidrolizados ácidos	13
2.3.1.1.1. Mecanismos de sacarificación ácida	14
2.3.1.1.2. Destrucción de lignina mediante proceso alcalino	15
2.3.1.1.3. Generación de inhibidores	15

2.3.1.2.	Producción de biogás a partir de hidrolizados ácidos	16
2.3.2.	Procesos enzimáticos	17
2.3.2.1.	Producción de celulasas	18
2.3.2.2.	Uso de celulasas para la sacarificación de materiales lignocelulósicos	18
2.3.2.2.1.	Mecanismos de sacarificación	19
2.3.2.2.2.	Producción de hidrolizados a partir de residuos lignocelulósicos	20
3.	Justificación	22
4.	Hipótesis	22
5.	Objetivo	23
5.1.	Objetivos específicos	23
6.	Estrategia experimental	24
7.	Materiales y métodos	26
7.1.	Materiales	26
7.1.1.	Sustratos lignocelulósicos	26
7.1.2.	Enzimas	26
7.1.3.	Fuente de inóculo	26
7.1.4.	Medios de cultivo	26
7.1.4.1.	Medio para alimentación de reactores	26
7.1.4.2.	Medio para determinar la actividad metanogénica	28
7.1.4.3.	Medio para determinación de toxicidad	28
7.2.	Métodos	28
7.2.1.	Obtención de hidrolizados	28
7.2.1.1.	Hidrolizado ácido	28
7.2.1.2.	Hidrolizado alcalino	29
7.2.1.3.	Hidrolizado enzimático	29
7.2.2.	Caracterización de los hidrolizados	30
7.2.2.1.	Determinación de azúcares	30
7.2.2.2.	Toxicidad del hidrolizado ácido	30
7.2.3.	Optimización de las condiciones de hidrólisis enzimáticas	31

utilizando CMC	
7.2.3.1. Determinación de la concentración de proteína	31
7.2.3.2. Determinación de azúcares reductores	31
7.2.3.3. Ensayos para la determinación de la actividad enzimática celulolítica	32
7.2.3.4. Diseño experimental para la optimización de la hidrólisis enzimática	32
7.2.4. Reactores metanogénicos	33
7.2.4.1. Ensayo de la actividad metanogénica del inóculo	33
7.2.4.2. Condiciones de operación	34
7.2.4.2.1. Reactor ácido (RAc)	34
7.2.4.2.2. Reactor enzimático (REnz)	35
7.2.4.2.3. Desempeño del reactor	35
7.2.5. Determinaciones analíticas	35
7.2.5.1. Determinación del volumen de metano producido	35
7.2.5.2. Cromatografía de gases	36
7.2.5.3. Electroforesis capilar	36
7.2.5.4. Demanda química de oxígeno (DQO)	37
7.2.5.5. pH	37
7.2.5.6. Alcalinidad	37
7.2.5.7. Caracterización de compuestos lignocelulósicos	37
7.2.5.7.1. Carbono orgánico total (COT)	37
7.2.5.7.2. Determinación de fibras	37
8. Resultados	39
8.1. Determinación de la actividad celulolítica del preparado enzimático	39
8.2. Optimización de las condiciones de la hidrólisis enzimática	
8.3. Caracterización química de los hidrolizados	39
8.4. Determinación de fibras residuales	45
8.5. Pruebas de toxicidad del hidrolizado ácido	46
8.6. Determinación de la actividad metanogénica del inóculo	48
8.7. Desempeño de los reactores	49

8.7.1. Reactor alimentado con hidrolizado ácido (RAc)	50
8.7.2. Reactor alimentado con hidrolizado enzimático (REnz)	50
8.8. Balances de DQO en los reactores	52
9. Discusión	55
10. Conclusiones	57
11. Perspectivas	68
12. Referencias	69
Anexo A	70
	78

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Nombre de la figura	Pag.
2.1	Aprovechamiento de la biomasa como energía mediante pretratamientos químicos y enzimáticos	4
2.2	Residuos agrícolas y forestales	5
2.3	Cultivos energéticos	5
2.4	Estructura química de la celulosa	7
2.5	Estructura química de la hemicelulosa	8
2.6	Estructura química de la lignina	8
2.7	Esquema general de la degradación anaerobia	10
2.8	Esquema de un reactor UASB	12
2.9	Mecanismo de sacarificación ácida	15
2.10	Compuestos generados a partir de la hidrólisis de material lignocelulósico y principales inhibidores que pueden afectar la actividad microbiana	16
2.11	Hidrólisis enzimática	19
6.1	Estrategia experimental para hidrolizar la hemicelulosa, celulosa y lignina presentes en los residuos agrícolas	25
7.1	Método de desplazamiento de volumen	36
7.2	Método tradicional de Van Soest de determinación de fibras	38
8.1	Ajuste de los datos obtenidos en algunos ensayos para la optimización de condiciones para la hidrólisis enzimática	41
8.2	Modelo de superficie de respuesta de la tasa de producción de azúcares reductores al variar la temperatura y el pH	42
8.3	Modelo de superficie de respuesta de la tasa de producción de azúcares reductores al variar la concentración de enzima y sustrato	42
8.4	Efecto del pH sobre la producción de azúcares (temperatura=45°C, concentración de enzima=0.5 mg/mL, sustrato=60 g/L)	43
8.5	Efecto del pH sobre la producción de azúcares (pH=4.5, temperatura=45°C, concentración de enzima=0.5 mg/mL)	44
8.6	Efecto del pH sobre la producción de azúcares (pH=4.5,	44

	temperatura=45°C, concentración de sustrato=60 g/L)	
8.7	Producción de metano a diferentes porcentajes de hidrolizado ácido (pruebas de toxicidad)	49
8.8	Pruebas de toxicidad a diferentes porcentajes de hidrolizado ácido	49
8.9	Cinética de producción de metano para la determinación de la actividad metanogénica del inóculo	50
8.10	Fases operacionales del reactor RAc alimentado con hidrolizado ácido	52
8.11	Fases operacionales del reactor REnz alimentado con hidrolizado enzimático	53
8.12	Comparación de rendimientos de la producción de metano en condiciones estándar de presión y temperatura (1 atm, 0°C) en los reactores durante la fase de incremento de carga	54
8.13	Concentración de AGV en el efluente del reactor alimentado con hidrolizado ácido	55
8.14	Concentración de AGV en el efluente del reactor alimentado con hidrolizado enzimático	55

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Nombre de la tabla	Pag.
2.1	Composición química de algunos residuos lignocelulósicos	7
2.2	Comparación de los procesos químicos (ácido) y enzimáticos	13
6.1	Hidrólisis secuenciales empleadas	24
7.1	Medio de cultivo basal 10X	27
7.2	Solución de elementos traza	27
7.3	Preparación del medio para alimentación de reactores	27
7.4	Composición del medio para determinar la actividad metanogénica	28
7.5	Composición del medio para la determinación de toxicidad	28
7.6	Composición reactivo DNS	31
8.1	Actividad celulolítica del preparado enzimático	39
8.2	Parámetros y sus respectivos intervalos de prueba evaluados en la optimización de la hidrólisis enzimática	39
8.3	Diseño experimental 2^k de composición central con puntos axiales	40
8.4	Análisis de rendimientos de azúcares reductores por gramo de sustrato	45
8.5	Concentración de azúcares en los hidrolizados ácido y enzimático	46
8.6	Composición lignocelulósica proximal de los residuos de la hidrólisis	46
8.7	Cantidades de los diferentes componentes lignocelulósicos presentes en la paja de avena y en los residuos de cada hidrólisis	47
8.8	Eficiencias de remoción de las fracciones lignocelulósicas por etapa	47
8.9	Balance de carbono para el proceso secuencial de hidrólisis	48
8.10	Porcentaje de inhibición del hidrolizado ácido sobre el lodo granular metanogénico	48
8.11	Caracterización del inóculo metanogénico (lodo del digestor)	50
8.12	Balance de DQO en los reactores	56
9.1	Parámetros operacionales reportados para la sacarificación ácida	57
9.2	Condiciones de operación reportados para la sacarificación enzimática	58
9.3	Eficiencias de remoción reportadas de fracciones lignocelulósicas	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	Azúcares determinados por electroforesis capilar
AGV	Ácidos grasos volátiles
ANOVA	Análisis de varianza
APHA	American Public Health Association
AR	Azúcares reductores
AT	Azúcares totales
CMC	Celulosa microcristalina
COT	Carbono orgánico total
CSTR	Continuos stirred tank reactor
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
DQO	Demanda química de oxígeno
FDA	Fibra detergente ácida
FDN	Fibra detergente neutra
FPU	Filter paper unit
HA	Hidrolizado ácido
HMF	Hidroximetil furfural
LDA	Lignina detergente ácida
RAc	Reactor alimentado con hidrolizado ácido
REnz	Reactor alimentado con hidrolizado enzimático
SST	Sólidos totales
SSV	Sólidos volátiles
STP	Standard temperature presion
TCD	Thermal conductivity detector
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket

RESUMEN

Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano

Gómez Tovar Francisco

División de Ciencias Ambientales

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) 2008

Palabras clave: Residuos agrícolas, degradación anaerobia, sacarificación, metano

Los residuos agrícolas poseen un porcentaje alto de materia orgánica difícilmente biodegradable (lignina, celulosa y hemicelulosa) por microorganismos anaerobios. El objetivo de este trabajo fue implementar procesos secuenciales de hidrólisis química y enzimática de paja de avena que permitan obtener una tasa alta de conversión de las fracciones de hemicelulosa y celulosa en azúcares fermentables (sacarificación) y maximizar la producción de metano. Los azúcares presentes en la hemicelulosa se solubilizaron mediante una hidrólisis ácida (HCl 2%, 2 h, 90°C). La lignina presente en el residuo sólido de la hidrólisis ácida se removió por medio de una hidrólisis alcalina con NaOH 1% (24 h) y H₂O₂ 0.3% (24 h) ambas a temperatura ambiente. La celulosa presente en el residuo sólido de la hidrólisis alcalina se sometió a una hidrólisis enzimática, la cual fue optimizada mediante un modelo factorial complementado con un modelo de superficie de respuesta. Las condiciones óptimas encontradas fueron: concentración de enzima 0.9 mg/mL, 45°C, pH 4.5 y una concentración de sustrato de 40 g/L. Se obtuvieron hidrolizados ácidos y enzimáticos con altos valores de concentración de DQO (23.6 y 31.7 g DQO/L respectivamente) y de azúcares reductores (20.9 y 18.8 g/L respectivamente). Los hidrolizados líquidos, ácido y enzimático, fueron alimentados a dos reactores UASB metanogénicos (RAc y REnz, respectivamente). Se alcanzaron cargas de hasta 9 y 10 g DQO/L-d para el RAc y REnz respectivamente, a las cuales la producción de biogás y la remoción de DQO se mantuvieron estables. La tasa máxima de producción de metano fue de 3.2 y 3.6 L CH₄/L_{rx}-d (STP), para el RAc y REnz respectivamente. El rendimiento de metano obtenido en ambos reactores, 0.3 L CH₄/g DQO (STP), fue semejante al rendimiento teórico calculado por estequiometría. Asimismo, al comparar el rendimiento obtenido, pero en base a SSV (0.5 L CH₄/gSSV), para ambos reactores, se encontró que fue más alto a los reportados en la literatura para la digestión anaerobia de otros tipos de pajas sin pretratamientos (0.2-0.4 L CH₄/gSSV (STP)).

ABSTRACT

Chemical and enzymatic sequential pre-treatment methods of agricultural residues for methane production

Gómez Tovar Francisco

División de Ciencias Ambientales

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) 2008

Key words: agricultural residues, anaerobic degradation, saccharification, methane

Agricultural residues have a high percentage of hardly biodegradable organic matter (lignin, cellulose and hemicellulose) by anaerobic microorganisms. The goal of this work was to implement chemical and enzymatic sequential saccharification processes of oat straw, in order to obtain a high conversion ratio of the cellulose and hemicellulose fractions to fermentable sugars (saccharification) to maximize the methane production. Sugars present in hemicellulose fraction were solubilized by means of acid hydrolysis (HCl 2%, 2 h, 90°C). The lignin present in solid residue of the acid hydrolysis was solubilized by alkaline hydrolysis with NaOH 1% (24 h) and H₂O₂ 0.3% (24h) both at ambient temperature. The cellulose present in the solid residue of alkaline hydrolysis was subjected to enzymatic hydrolysis, which was optimized through a factorial model complemented with a surface response model. Optimal conditions found were: enzyme concentration 0.9 mg/mL, temperature 45°C, pH 4.5 and concentration of substrate of 40 g/L. Acid and enzymatic hydrolyzates contained high COD (23.6 and 31.7 g COD/L respectively) and reducing sugars (20.9 and 18.8 g/L respectively). The liquid hydrolyzates, acid and enzymatic, were fed to UASB methanogenic reactors (RAc and REnz, respectively). A maximum organic load of 9 and 10 g COD/L-d was reached for the RAc and REnz respectively, at which the production of biogas and the removal of COD were stable. The maximum methane production rates obtained were 3.2 and 3.6 L CH₄/Lrx-d (STP), for the RAc and REnz respectively. Methane yield values in both reactors, 0.3 L CH₄/gCOD (STP), which was similar to the theoretical yield calculated by stoichiometry. Comparing the yield obtained based on VSS (0.5 L CH₄/gSSV), in both reactors, we found that it was greater than the reported in the literature for anaerobic digestion of other straws without pretreatments (0.2-0.4 L CH₄/gVSS (STP)).

1. INTRODUCCIÓN

La población y el consumo mundial de energía han ido en aumento en las últimas décadas. En años recientes, el uso de fuentes renovables para la producción de energía han obtenido una gran importancia como alternativa a los combustibles fósiles (Karakashev *et al.*, 2007). Estas alternativas son apropiadas ya que permitirán una disminución del impacto ambiental que se está generando con la sobre explotación de los combustibles fósiles.

La producción sustentable de biocombustibles a partir de biomasa (metano, etanol, biodiesel o biohidrógeno) tiene un gran potencial para satisfacer la demanda mundial de energía. La biomasa puede ser obtenida tanto de residuos agrícolas, así como de cultivos energéticos (Mette, 2005).

Los cultivos energéticos son cultivos desarrollados específicamente para la producción de combustibles. Estos cultivos son seleccionados debido a su crecimiento rápido, alta resistencia a pesticidas y plagas, pero sobre todo que al ser cosechados rápidamente permite precios competitivos cuando dicho cultivo se usa como combustible (Kamm, 2004). Aunque hay que tener en cuenta que esto supone importantes impactos ambientales y sociales que implican extremar los cuidados acerca del modo en que estos cultivos se realizan. Los riesgos esenciales tienen que ver con el desplazamiento que pueden producir en cultivos destinados a producir alimentos y el incremento de la presión para expandir la frontera agrícola a diferentes ecosistemas.

Las actividades agropecuarias y agroindustriales dan origen a una amplia gama de residuos y subproductos los cuales son dispuestos de diversas maneras, principalmente como alimento para ganado o quemados *in situ*. Los residuos agrícolas derivados de las plantas de cultivo (granos y cereales en su mayoría) permanecen en el terreno después de cosechar el grano o la semilla. El uso de estos residuos es una alternativa menos controversial que el uso de cultivos energéticos (maíz, soya, caña) debido a que los residuos agrícolas se generan en cantidades mayores que los cultivos energéticos, no representan una amenaza al abasto de alimentos y tienen un menor costo (Faaij, 2006).

Los residuos agrícolas tienen una fracción importante de biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) que dificulta su biodegradación por procesos de digestión anaerobia (Dominik *et al.*, 2007). El uso de pretratamientos químicos y enzimáticos incrementa la biodegradabilidad de estos materiales, aunque ésta depende del tipo de pretratamiento utilizado, la concentración de reactivos, los métodos de separación a los que sean sometidos entre otros (Xiao y Clarkson, 1997).

La hidrólisis química (ácida) y enzimática son dos pretratamientos comunes para convertir la fracción lignocelulósica en azúcares solubles (sacarificación) (Curreli *et al.*, 2002). La sacarificación por hidrólisis ácida es un proceso simple y directo, se ha utilizado durante mucho tiempo, pero requiere energía (calor) para llevarse a cabo, además de que se ha reportado la producción de subproductos tóxicos (Vázquez *et al.*, 2007). En contraste, la sacarificación enzimática requiere menos energía, y no se ha reportado la generación de algún subproducto tóxico (Zhao *et al.*, 2008).

La degradación anaerobia ha sido utilizada para el tratamiento de una amplia gama de residuos orgánicos como son residuos agrícolas, ganaderos, urbanos, industriales, entre otros. El objetivo de la degradación anaerobia es la reducción de la cantidad de residuos orgánicos generados con la obtención de un gas combustible (Wise *et al.*, 1981).

El gas metano, principal constituyente del biogás producido durante la digestión anaerobia, tiene una gran variedad de usos. Principalmente como combustible o insumo en la actividad industrial y como combustible para el uso doméstico. La producción de metano tiene, como insumo industrial frente a otras fuentes de energía alternas (biohidrógeno, biodiesel), la principal ventaja de estar en fase de pleno desarrollo al ser una tecnología ampliamente utilizada para el tratamiento de diversos residuos, convirtiéndolo en una buena alternativa como biocombustible a partir de residuos agrícolas pretratados química y enzimáticamente.

2. ANTECEDENTES

2.1. La biomasa como fuente de energía

La sustentabilidad en el crecimiento económico requiere de recursos adecuados para la producción industrial. Hoy en día, el uso de los combustibles fósiles ya no es sustentable debido a que este recurso está limitado y no es amigable con el medio ambiente (Kamm y Kamm, 2006). Los recursos energéticos renovables han generado un gran interés en la comunidad internacional durante las últimas décadas. La biomasa es una fuente de energía prometedora la cual incluye desechos orgánicos, de animales, plantas de tratamiento de agua, residuos industriales y agrícolas así como cultivos energéticos los cuales pueden ser usados para la producción de biocombustibles (Antonopoulou *et al.*, 2008).

Los pretratamientos químicos (ácidos) y enzimáticos de residuos lignocelulósicos han sido utilizados por mucho tiempo para la obtención de azúcares fermentables y su aprovechamiento para la producción de biocombustibles, como ejemplos están el bioetanol (Cheng *et al.*, 2008) y el biohidrógeno (Antonopoulou *et al.*, 2008). Pocos reportes se han realizado sobre la producción de metano a partir de pretratamientos químicos y/o enzimáticos de residuos lignocelulósicos y menos aun sobre un proceso secuencial de pretratamientos para la producción del mismo. En trabajos realizados por varios grupos de investigación (Saha *et al.*, 1999, Mtui *et al.*, 2005 y Chung *et al.*, 2005) se han utilizado procesos secuenciales (químico-enzimático) de pretratamiento de residuos para eficientizar la extracción de azúcares fermentables pero no reportan el aprovechamiento de estos para producir biocombustibles.

La celulosa y hemicelulosa contenida en los residuos lignocelulósicos pueden ser modificadas por manipulaciones físicas, químicas y biológicas (Xiao y Clarkson, 1997), por tal motivo el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos (Figura 2.1) como sustratos en procesos biotecnológicos es una alternativa atractiva para la generación de biocombustibles (Viñals-Verde *et al.*, 2006).

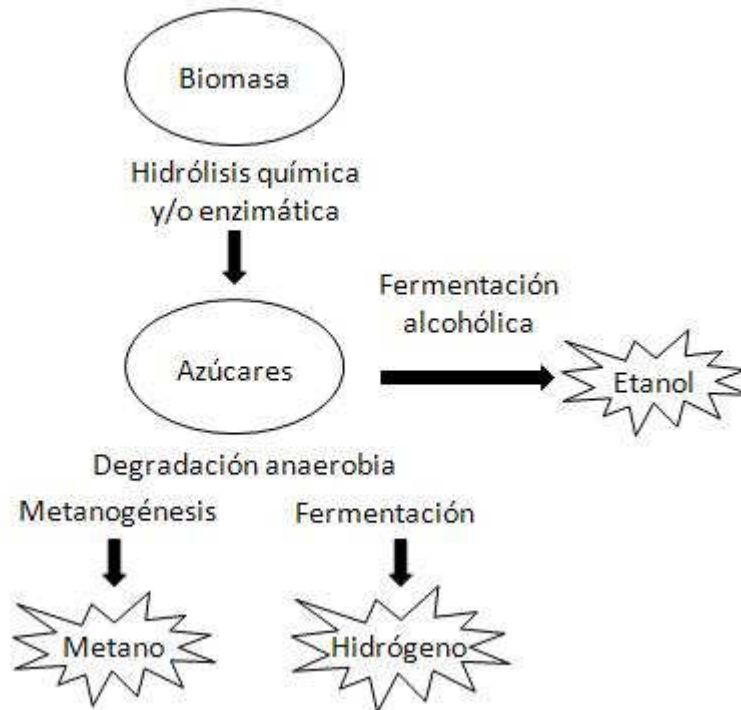


Figura 2.1. Aprovechamiento de la biomasa como energía mediante pretratamientos químicos y enzimáticos

Las dos rutas biológicas más utilizadas para la producción de biocombustibles son: la fermentación alcohólica para la producción de etanol a partir de los azúcares liberados por medio de las hidrólisis de los residuos lignocelulósicos, y la degradación anaerobia para la producción de biohidrógeno y metano.

2.1.1. Origen y tipos de biomasa

2.1.1.1. Residuos orgánicos

Los residuos orgánicos (residuos agrícolas, forestales, ganadería, etc.) poseen un alto potencial energético y una amplia gama de oportunidades para su mejor utilización como recurso energético (Figura 2.2). Sin embargo, hay un número importante de factores que deben ser considerados para usarlos en la producción de energía. Uno de los principales factores es el hecho de que estos residuos se emplean en diversas actividades tales como la alimentación de ganado, control de erosión en suelos, como fertilizantes, etc., lo cual hace controversial su uso (Faaij,

2006). Otro factor a tomar en cuenta es que los residuos tienen una fracción importante de biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) que dificulta su biodegradación por procesos de digestión anaerobia.



Figura 2.2. Residuos agrícolas y forestales

2.1.1.2. Cultivos energéticos

Los cultivos energéticos (Figura 2.3) son cultivados específicamente para la producción de alguna forma de energía. La energía puede ser generada por combustión directa o gasificación de los cultivos para generar electricidad y calor (mezclas de pastos con carbón), cultivos como el girasol, soya, maíz y caña de azúcar han sido procesados mediante tratamientos biológicos para la producción de biocombustibles (Lauder, 2002).

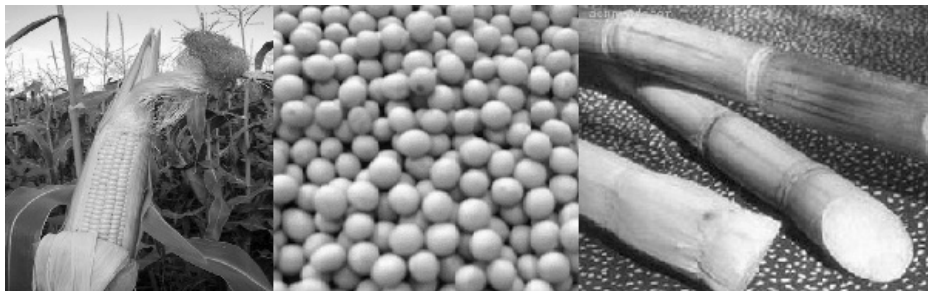


Figura 2.3. Cultivos energéticos

Los cultivos energéticos tienen un potencial considerable como recurso energético por ser un recurso renovable capaz para contribuir con la creciente demanda de energía en el mundo. El uso de estos recursos, actualmente, depende de muchos factores tanto políticos como comerciales, principalmente por

la controversia que genera el utilizar un recurso alimenticio como fuente de energía, además el uso de los mismos es un nuevo concepto para los agricultores, los cuales deben desarrollar plantaciones dedicadas solo a la generación de estos cultivos así como lograr que la bioenergía sea competitiva frente al uso de combustibles fósiles (Faaij, 2006).

Con el objetivo de hacer uso de estos recursos a gran escala, se deben desarrollar y optimizar las tecnologías que se tienen actualmente (pirolisis, gasificación, fermentación, etc.) para la producción de bioenergía y con esto, ser capaces de volverla competitiva como fuente alterna de energía contra el uso de combustibles fósiles.

2.1.2. Organización de polisacáridos en los residuos agrícolas

La biomasa forestal y agrícola está constituida fundamentalmente por los materiales lignocelulósicos de naturaleza fibrosa que forman parte de la pared celular que recubre las células vegetales, en cuya composición se distinguen tres tipos de biopolímeros: celulosa y hemicelulosa (polisacáridos) y lignina (Kumar *et al.*, 2008). Adicionalmente, las fracciones químicas más comunes presentes en biomasa forestal y agrícola son agua procedente básicamente de las condiciones ambientales, de los fluidos biológicos y del carácter higroscópico de los residuos, y cenizas procedentes fundamentalmente de las sales minerales.

Un análisis típico de la fracción lignocelulósica de estos residuos se muestra en la Tabla 2.1 en la cual también se aprecia la variabilidad que puede presentarse en su composición dependiendo de que residuo se trate:

Los polisacáridos desempeñan dos funciones biológicas principales: una para almacenar energía y otra como elementos estructurales. En la naturaleza, probablemente la cantidad de carbohidratos presentes es mayor que todo el resto de la materia orgánica junta, lo cual es debido en gran parte a la abundancia de estos polímeros en las plantas (Nelson y Cox, 2000).

Tabla 2.1. Composición química de algunos residuos lignocelulósicos

Residuo lignocelulósico	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
Arroz	24	32.1	18
Trigo	50	30	15
Trigo*	24.5	46.9	5.9
Maíz	35	45	15
Maíz*	47.8	25.7	3.2
Sorgo*	24.5	40.7	5.8
Avena*	21.5	38	4.6
Cebada*	31.9	37.9	6.4
Algodón	5-20	80-95	0
Bagazo de caña de azúcar	30	43	12

Fuente: Howard *et al.* 2003 y *Sánchez, 2007; * Datos obtenidos en base seca

La celulosa (Figura 2.4) es un polisacárido lineal constituido por unidades de glucosa (hexosa) unidas por un enlace β -1,4. Además, la estructura secundaria y terciaria incluyen enlaces intermoleculares de hidrógeno los cuales ocasionan que presente una estructura amorfa y cristalina (Peters, 2007).

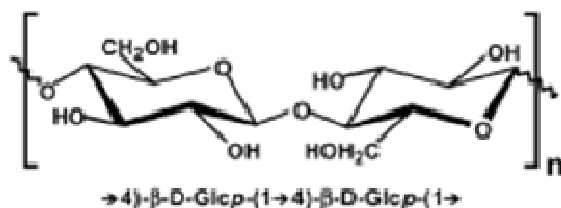


Figura 2.4. Estructura química de la celulosa (Knill y Kennedy, 2005)

La hemicelulosa (Figura 2.5) es un heteropolisacárido constituido por diversos monosacáridos (hexosas y pentosas), entre los que predomina la xilosa. La hemicelulosa es la segunda biomasa renovable mas abundante y compone aproximadamente el 25-35% de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003). La hemicelulosa es mucho mas fácil de hidrolizar que la celulosa debido a su estructura ramificada compuesta por diversos monosacáridos los cuales son mas susceptibles a separarse (Peters, 2007). Así como la celulosa, la hemicelulosa es también una fuente importante de recurso para la obtención de azúcares fermentables para la producción de energía (Kumar *et al.*, 2008).

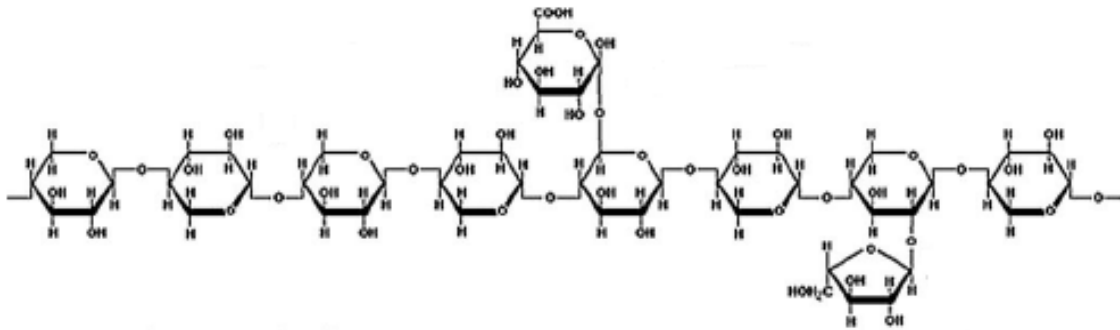


Figura 2.5. Estructura química de la hemicelulosa (Kumar, 2008)

La lignina (Figura 2.6) es un polímero entrecruzado constituido por unidades básicas de naturaleza variada, entre las que predominan los grupos aromáticos fenólicos (Saha, 2003). Además, es el compuesto orgánico natural más abundante en los materiales fibrosos. La importancia de la lignina en las plantas se debe principalmente a dos factores: a su contribución a la fuerza mecánica la cual es importante para el crecimiento de la planta, así como a la protección que brinda contra la degradación.

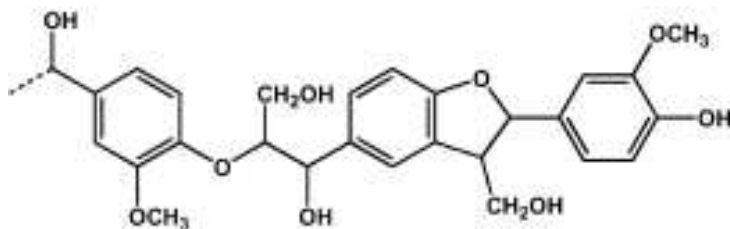


Figura 2.6. Estructura química de la lignina (Knill y Kennedy, 2005)

2.2. Generalidades de la degradación anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico, en el cual la materia orgánica es degradada por la acción de una serie de microorganismos bacterianos, que la transforman en una mezcla de gases, formada principalmente por metano y dióxido de carbono, y que se conoce como biogás (Svensson *et al.*, 2005). La composición del biogás puede variar ampliamente, pero el principal componente es el metano. Una composición típica es de 70% de metano, 25-30% de dióxido

de carbono y 0-5% de sulfuro de hidrógeno y trazas de otros gases (Svensson *et al.*, 2005; Peters, 2007).

El proceso de digestión anaerobia, frente a los procesos aerobios, transcurre con un menor desprendimiento calorífico, lo que determina un mayor contenido energético de los productos resultantes y consecuentemente, un mayor rendimiento energético del proceso. La fracción de la energía total disponible utilizada por los microorganismos para su propio crecimiento es mucho menor que en los sistemas aerobios (Dague *et al.*, 1966).

Las principales ventajas de la digestión anaerobia frente a la aerobia son: un mayor grado de estabilización, menor producción de lodos biológicos indicando una mayor conversión de materia orgánica en energía, menores requerimientos de nutrientes, no existe consumo de oxígeno, por tanto hay menores necesidades energéticas y producción de un gas combustible (Van Haandel *et al.*, 2006). Sin embargo la degradación anaerobia tiene inconvenientes debido a que es un proceso complejo, que requiere bastante control para asegurar un correcto funcionamiento. Se han descrito gran cantidad de tóxicos e inhibidores del proceso, lo que puede hacer que este no sea viable para el tratamiento de determinados sustratos. Además es bastante sensible a las sobrecargas orgánicas por lo que la alimentación deberá ser lo más homogénea posible.

2.2.1. Procesos microbianos involucrados en la degradación anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso complejo en el que intervienen diversos grupos de microorganismos que actúan consecutivamente (Figura 2.7). Esto implica que un fallo de un grupo de microorganismos por inhibición, por ejemplo, puede provocar el fallo del proceso global.

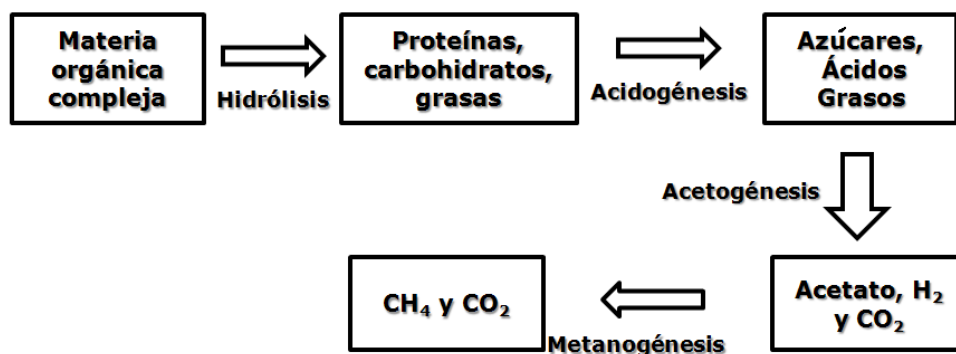


Figura 2.7. Esquema general de la degradación anaerobia

La digestión anaerobia consiste principalmente en 4 fases y el correcto funcionamiento del proceso anaerobio implica el mantenimiento del equilibrio entre las diferentes fases:

Hidrólisis: La materia orgánica compleja no puede ser utilizada directamente por los microorganismos a menos que estos se hidrolicen o fragmenten a compuestos más pequeños y solubles, que puedan atravesar la membrana celular fácilmente y así permitir la asimilación de ellos. Por ejemplo, los microorganismos rompen los enlaces glucosídicos de los polisacáridos para liberar azúcares, los cuales pasan a través de la membrana celular para su posterior asimilación.

Acidogénesis: Las moléculas orgánicas solubles son fermentadas por varios grupos de microorganismos formando compuestos como ácido acético y fórmico o compuestos orgánicos más reducidos como el H₂, ácido propiónico, butírico, etc. Éstos últimos, no pueden ser usados directamente por los microorganismos metanogénicos y tienen que ser transformados a acético antes de la fase de metanogénesis. Los microorganismos acidogénicos son los que presentan velocidades de crecimiento mayores, siendo del orden de 5 veces superiores a los metanogénicos; además, los microorganismos metanogénicos son más sensibles a la presencia de tóxicos y tienen una menor capacidad de adaptación a éstos en comparación a los microorganismos acidogénicos (Bagi *et al.*, 2007).

Acetogénesis: Los microorganismos acetogénicos transforman los compuestos orgánicos más reducidos (H₂, ácido propiónico, butírico, etc.) a ácido acético el cual puede ser usado por los microorganismos metanogénicos.

Metanogénesis: Este es el último paso en la degradación anaerobia. Consiste principalmente en la generación de metano y CO₂ como productos finales de la degradación de los compuestos de las fases anteriores.

Cualquier factor que impida el desarrollo adecuado de los microorganismos metanogénicos, por ejemplo un tóxico, provocará una acumulación de los productos de la acidogénesis, es decir ácidos grasos volátiles, bajando el pH, y empeorando aún más las condiciones para el desarrollo de las bacterias metanogénicas (De Mes *et al.*, 2003). En algunas ocasiones no es necesaria la existencia de un tóxico para producir la “acidificación del reactor”. Por ejemplo, una sobrecarga, la cual consiste en un gran aporte de materia orgánica fácilmente degradable facilitará que los microorganismos acidogénicos se desarrollen muy rápidamente, produciendo una gran cantidad de ácidos grasos volátiles, que los microorganismos metanogénicos no son capaces de metabolizar por completo, debido a su menor velocidad de crecimiento. La acumulación de ácidos deteriorará las condiciones de crecimiento de los organismos metanogénicos, pudiendo llegar a una situación irreversible, donde la población metanogénica prácticamente desaparezca.

2.2.2. Reactores anaerobios

El reactor UASB (por sus siglas en inglés *upflow anaerobic sludge blanket*) es el sistema más ampliamente utilizado para el tratamiento anaerobio de agua residual (Van Haandel *et al.*, 2006).

El concepto de un reactor UASB es extremadamente simple. El reactor consiste en un recipiente en el cual el flujo de agua asciende desde la parte inferior del reactor y entra en contacto con la cama de lodo en la cual se encuentran las comunidades microbianas encargadas de la degradación (Figura 2.8). El efluente tratado sale por la parte superior del reactor. El gas producido causa turbulencia hidráulica dentro de la cama de lodo permitiendo un adecuado mezclado del sistema eliminando con esto la necesidad de incorporar un mezclador mecánico. El lodo se mantiene dentro del reactor mediante el

separador trifásico, colocado en la parte superior, donde la fase acuosa se separa del lodo y del gas.

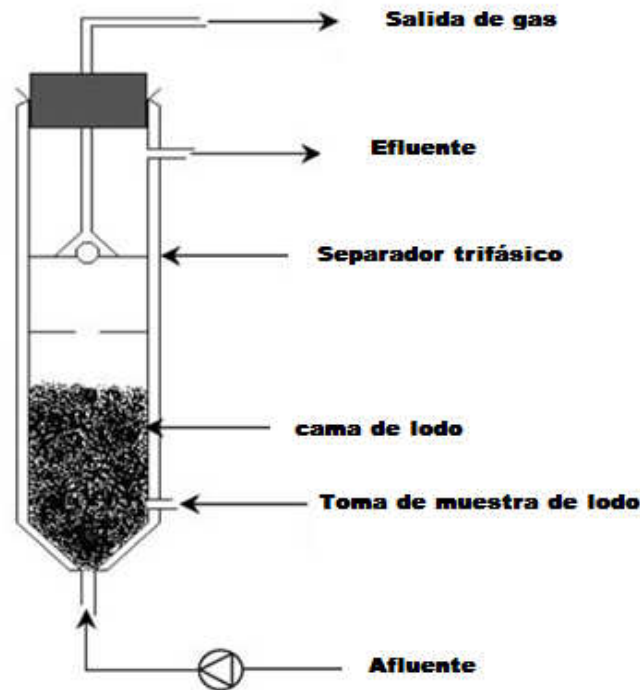


Figura 2.8. Esquema de un reactor UASB (modificado de Van Haandel *et al.*, 2006)

2.3. Procesos de solubilización de azúcares

Debido al interés que ha generado la utilización de la biomasa como fuente de energía se ha generado el desarrollo de distintos procesos biológicos para su tratamiento. Sin embargo, estos procesos presentan un inconveniente, la fracción lignocelulósica es difícil de degradar por medios anaerobios, por tal motivo se requiere que la fracción de polisacáridos de la biomasa (celulosa y hemicelulosa) sean hidrolizados a monómeros de azúcares (Chung *et al.*, 2005). La biomasa debe ser pretratada permitiendo así un rendimiento mayor de azúcares fermentables para la producción de energía (Wyman *et al.*, 2005).

Los pretratamientos químicos y enzimáticos son procesos usados para la solubilización de azúcares, en la Tabla 2.2 se muestra una comparación entre la hidrólisis ácida y enzimática

Tabla 2.2. Comparación de los procesos químicos (ácidos) y enzimáticos

Parámetro	Hidrólisis ácida	Hidrólisis enzimática
Pretratamiento	Puede ser	Necesario
Velocidad de hidrólisis	necesario	Baja (h)
Temperatura	Rápida (min)	Baja (45°C)
Producción de sub-productos	Alta ($\geq 100^\circ\text{C}$)	No
	Si	

Fuente: Chandra *et al.*, 2007

2.3.1. Procesos químicos

Se ha comprobado que un sistema de pretratamiento ácido/alcalino es adecuado para mejorar el rendimiento de producción de monosacáridos a partir de las fracciones lignocelulósicas de los residuos agrícolas (Saha y Bothast, 1999). Sin embargo, el uso de varios químicos en procedimientos de pretratamiento puede afectar la economía de la bioconversión de la biomasa lignocelulósica (Kuman *et al.*, 2008). Se han descrito diferentes pretratamientos químicos, estos incluyen tanto el uso de bases fuertes como el hidróxido de sodio, potasio o de amonio (Galbe y Zacchi, 2007; Zhao *et al.*, 2008), como el uso de ácidos fuertes como el ácido clorhídrico, perclórico, sulfúrico, nítrico o ácidos débiles como el fórmico y acético (Xiao y Clarkson, 1997; Curreli *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008).

2.3.1.1. Producción de hidrolizados ácidos

La hidrólisis ácida de la celulosa y hemicelulosa es el rompimiento de las cadenas largas de polisacáridos a segmentos más pequeños como oligosacáridos, disacáridos o monosacáridos.

La hidrólisis ácida se lleva a cabo generalmente por calentamiento con una solución diluida de ácido, a temperaturas que van desde 90-200°C por un cierto periodo que puede ser de unos cuantos minutos a horas. Con este pretratamiento, la hemicelulosa es hidrolizada y principalmente se obtienen monómeros de azúcares fermentables (Galbe y Zacchi, 2007).

2.3.1.1.1. Mecanismos de sacarificación ácida

Las reacciones con medios ácidos son muy complejas, principalmente porque el sustrato se encuentra en fase sólida y el catalizador en la fase líquida (Figura 2.9). Los mecanismos de reacción de la hidrólisis ácida para la solubilización de azúcares incluyen:

- (1) La difusión de protones a la matriz lignocelulósica.
- (2) La protonación del oxígeno en un enlace éter entre los monosacáridos.
- (3) El rompimiento de este enlace.
- (4) La generación de carbo-cationes (moléculas protonadas) como intermediarios.
- (5) La solvatación de los carbo-cationes con agua.
- (6) La regeneración del carbo-catión a un monosacárido, oligosacárido o polisacárido dependiendo de la posición del enlace.
- (7) La difusión del producto de la reacción en la fase líquida (Carrasco y Roy, 1992; Gámez *et al.*, 2006)

Sin embargo, el modelamiento de la hidrólisis de un polisacárido es muy complicado y comúnmente se usan modelos empíricos (Conner, 1984). Múltiples factores están relacionados con los materiales lignocelulósicos (tamaño, forma de la partícula, estructura, etc.) así como las condiciones de extracción (tipo de ácido, concentración, temperatura, tiempo, etc.) (Carrasco y Roy, 1992).

Otros factores que también pueden interferir en la determinación de la reacción son la cantidad de material, la interferencia con otros compuestos, presencia de diferentes tipos de enlaces, estructura cristalina o amorfa de la matriz (Aguilar *et al.*, 2002).

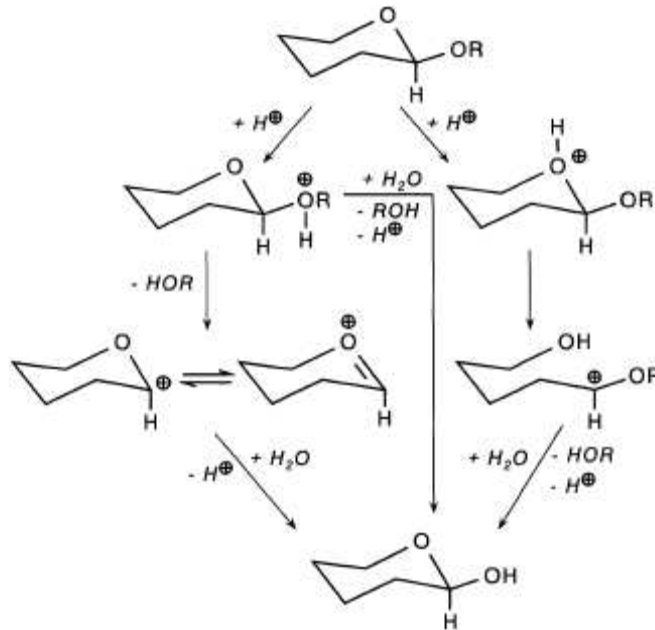


Figura 2.9. Mecanismo de sacarificación ácida (Klemm *et al.*, 1998)

2.3.1.1.2. Destrucción de lignina mediante proceso alcalino

El pretratamiento alcalino rompe los enlaces éster entre la lignina y los carbohidratos (así como a la lignina misma) incrementando la porosidad y el área superficial de la biomasa; además, disminuye el grado de polimerización y cristalización de la misma, permitiendo que los carbohidratos estén más accesibles a un ataque químico (ácido) o enzimático (Zhao *et al.*, 2008). Este proceso es llamado deslignificación. Es mas efectivo en residuos agrícolas y cultivos herbáceos que en materiales leñosos los cuales contienen menos lignina (Galbe y Zacchi, 2007).

2.3.1.1.3. Generación de inhibidores

La biomasa lignocelulósica es recalcitrante a la descomposición y el uso de pretratamientos, ya sea con diluciones ácidas y alcalinas, es necesario para permitir la accesibilidad de la fibra a la degradación enzimática (Modig *et al.*, 2008). Sin embargo, los pretratamientos ácidos y alcalinos propician la generación de subproductos que inhiben ciertos procesos biológicos como la fermentación

alcohólica y la metanogénesis. Inhibidores típicos presentes en los hidrolizados son: el furfural y el hidroximetil-furfural (HMF) (Figura 2.10), además de ácidos grasos como el fórmico, acético y levulínico y compuestos fenólicos en altas concentraciones (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

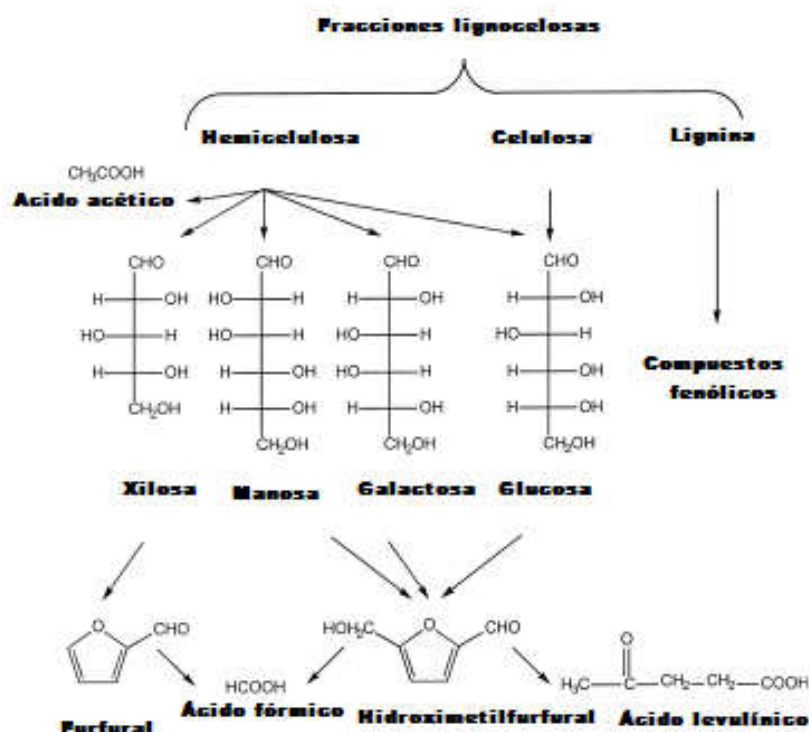


Figura 2.10. Compuestos generados a partir de la hidrólisis de material lignocelulósico y principales inhibidores que pueden afectar la actividad microbiana (Modificado de Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000)

2.3.1.2. Producción de biogás a partir de hidrolizados ácidos

Poco se ha reportado sobre la producción de metano a partir de hidrolizados químicos. Wise *et al.* en 1981 utilizó un proceso alcalino con paja de arroz para la obtención de hidrolizados. Evaluó diferentes concentraciones de NaOH así como diferentes tiempos de reacción con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de sacarificación y evaluar la digestibilidad del mismo en un reactor metanogénico. Xiao y Clarkson en 1997 utilizaron diferentes residuos de oficina optimizando un proceso de hidrólisis ácida mediante el uso de ácido acético y de

una mezcla ácido acético-nítrico para la obtención de hidrolizados y su posterior alimentación a un reactor metanogénico. Dentro de los inconvenientes que se observaron en ambos trabajos fue que el pH (ácido y alcalino) que presentaban estos hidrolizados era muy alto, lo que implicaba un mayor control de los parámetros funcionales de los reactores debido a que el proceso metanogénico es muy susceptible al cambio de pH, por lo que el ajuste mediante reguladores o amortiguadores (carbonato de calcio) de los reactores es muy importante. Otro factor limitante a destacar es que solo aplicaron un proceso químico (ya sea alcalino o ácido) y no ambos, lo cual hubiera permitido una mayor deslignificación de los compuestos y por lo tanto una mejor disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa.

2.3.2. Procesos enzimáticos

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por seres vivos. Estos catalizadores biológicos aceleran las reacciones bioquímicas a temperaturas alrededor de 37°C (para el caso de organismos mesófilos). El incremento de temperatura puede provocar un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, ya que después de aproximadamente 45° C se comienza a producir la desnaturalización térmica de la enzima. (Rodríguez, 1999).

Las enzimas catalizan reacciones bajo condiciones suaves: temperaturas relativamente bajas, presión atmosférica y pH casi neutro. Un aspecto único de la catálisis enzimática es la susceptibilidad del control de su actividad. Cada enzima tiene una temperatura óptima a la que actúa con su máxima eficiencia. Debido a que las enzimas son proteínas, los valores de la temperatura óptima dependen del pH y de la fuerza iónica. Si la temperatura se incrementa más allá de la temperatura óptima, la actividad enzimática desciende bruscamente. La temperatura óptima de una enzima normalmente está cerca de la temperatura óptima de crecimiento del organismo del que procede. Del mismo modo, cada enzima presenta un intervalo de concentración de sustrato óptimo. Inicialmente, un aumento de la concentración de sustrato produce un aumento rápido de la

velocidad de reacción, pero si se sigue aumentando la concentración de sustrato, la velocidad de reacción comienza a disminuir (García y Navarrete, 1999).

2.3.2.1. Producción de celulasas

Un método común de convertir compuestos lignocelulósicos a compuestos de fácil biodegradación (azúcares fermentables) es mediante hidrólisis. Pueden utilizarse enzimas puras o una combinación de ellas para llevar a cabo el proceso de hidrólisis (Wyman *et al.*, 2005). El grupo enzimático más importante que lleva a cabo este proceso son las celulasas y en menor grado las hemicelulasas. Una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias y hongos, producen celulasas. Sin embargo, solo un número pequeño de estos grupos producen celulasas en grandes cantidades (Mansfield *et al.*, 1999). Dentro de las bacterias celulolíticas más estudiadas se encuentran las pertenecientes a los géneros *Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Thermomonospora* y *Clostridium* (Halsall y Gibson, 1986; Damude *et al.*, 1996). En cuanto a hongos lignocelulolíticos se han estudiado principalmente los géneros *Pleurotus*, *Phanerochaete*, y *Trichoderma* (Robinson, 1984; Kerem *et al.*, 1992; Bailey y Tähtiharju, 2003; Albores *et al.*, 2006).

2.3.2.2. Uso de celulasas para la sacarificación de materiales lignocelulósicos

La naturaleza compleja de los materiales lignocelulósicos ha propiciado el desarrollo de nuevas propuestas biotecnológicas, siendo una de ellas la aplicación de enzimas, como una alternativa para maximizar la utilización de estos materiales. Las celulasas que tienen la capacidad de degradar los polisacáridos que constituyen la pared celular de los tejidos vegetales tales como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, reciben en la actualidad mayor atención (Saucedo y Soto, 1999).

En las últimas décadas, en particular los preparados celulolíticos comerciales y los preparados con actividad múltiple, se han aplicado con éxito para facilitar y aumentar la liberación de productos de interés y para mejorar el proceso

tecnológico mediante la predigestión enzimática de la pared celular de los tejidos vegetales (Pérez *et al.*, 2002).

2.3.2.2.1. Mecanismos de sacarificación

La hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos es llevada a cabo por un sistema de enzimas llamadas celulasas. Este sistema está compuesto por una mezcla de endo y exo β -glucanasas, β -celobiohidrolasas y β -glucosidasas (Berlin *et al.*, 2006).

Las celulasas rompen los enlaces de la celulosa y celobiosa para posteriormente liberar las fracciones de glucosa mediante la β -glucosidasa (Figura 2.11). Las celulasas pueden llegar a ser inhibidas por la celobiosa y la glucosa (Philippidis *et al.*, 1993). La producción de compuestos inhibidores de las enzimas disminuye la eficiencia de la hidrólisis. En ocasiones se pueden presentar inhibiciones por exceso de éstos (sustrato o producto) debido a que a cierto nivel de concentración, pueden llegar a retardar el tiempo de reacción hasta que predomina la inhibición (Saucedo y Soto, 1999).

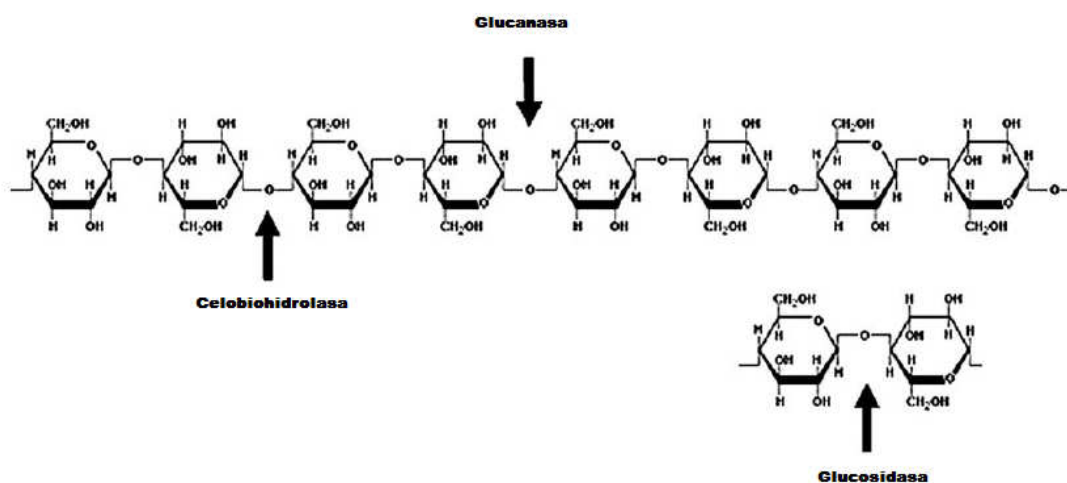


Figura 2.11. Hidrólisis enzimática (modificado de Kumar, 2008)

La hidrólisis enzimática tiene un mayor rendimiento de producción de monosacáridos que una hidrólisis ácida, debido a que las enzimas son específicas

para convertir la celulosa a azúcares sin las reacciones de degradación de éstos (Parisi, 1989). Las enzimas son compuestos biodegradables y por lo tanto ambientalmente amigables (Berlin *et al.*, 2006)

2.3.2.2.2. Producción de hidrolizados a partir de residuos lignocelulósicos

El uso de enzimas en la biotecnología ha tomado mucha importancia en los últimos años tanto en la industria alimentaria como en la energética, pero esto no indica que esta tecnología sea nueva. De hecho, se ha utilizado por mucho tiempo para el tratamiento de diferentes residuos y para diversos fines. Cabe mencionar que la aplicación de enzimas no se realiza directamente sobre los residuos lignocelulósicos, ya que antes deben ser pretratados física o químicamente con el objetivo de hacer más disponible la fracción de celulosa al ataque enzimático.

Se han reportado muchos trabajos acerca de la solubilización de azúcares mediante tratamientos químicos y enzimáticos con la finalidad de obtener azúcares fermentables para posteriores procesos o simplemente para evaluar actividades enzimáticas de diferentes clases de cepas de microorganismos lignocelulósicos. Saha y Brothast (1999), Chung *et al.*, (2005), Rodríguez *et al.*, (2005) realizaron ensayos que les permitieron evaluar diferentes tipos de pretratamiento a diferentes residuos (residuos municipales, residuos agrícolas, entre otros). Evaluaron pretratamientos físicos (tratamiento térmico en autoclave) y químicos (ácidos y alcalinos) que permitieran un mejor rendimiento de conversión de la celulosa residual a monosacáridos. Se demostró que el pretratamiento secuencial permite un mayor aprovechamiento de las fracciones lignocelulósicas.

En base a lo anterior se han desarrollado trabajos semejantes a los pretratamientos de residuos y su posterior degradación por métodos biológicos para obtener biocombustibles. Wyman (1999), Golias *et al.*, (2000), Mtui y Nakamura (2005), González y Molina (2006) y Karakashev *et al.*, (2007) reportaron procesos de sacarificación y fermentación simultánea de diferentes residuos agrícolas. También se han realizado seguimientos cinéticos de las sacarificaciones químicas y enzimáticas para obtener condiciones óptimas para la

posterior fermentación mediante cepas productoras de etanol (*Saccharomyces cerevisiae*) (Van Wyk *et al.*, 2000).

Por último, Sonakya *et al.*, (2001) reportan mediante procesos secuenciales de co-cultivos (con hongos lignocelulolíticos) y pretratamiento enzimático, un proceso de dos etapas para la producción de biohidrógeno y metano, enriqueciendo el consorcio bacteriano de este último por cepas puras de *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, los rendimientos de producción encontrados no fueron los esperados ya que durante el proceso tuvieron algunos inconvenientes con los reactores y con el proceso en general. Al momento de intentar enriquecer el cultivo microbiano se observó un efecto de inhibición en la producción de metano

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de materiales de desecho como fuente de energía renovable es una alternativa viable para sustentar el desabasto energético actual que se tiene con los combustibles fósiles. El uso de la biomasa como fuente de energía (biogás, biohidrógeno, bioetanol, biodiesel) ha tomado mucho interés en los últimos años provocando que las tecnologías de conversión de biomasa aumenten considerablemente. Los cultivos energéticos son cultivos desarrollados específicamente para la producción de combustibles; sin embargo, hay que tener en cuenta que esto supone importantes impactos ambientales y sociales que implican extremar los cuidados acerca del modo en que estos cultivos se realizan. Los residuos agrícolas derivados de las plantas de cultivo son una alternativa menos controversial que el uso de cultivos energéticos. Debido a que los residuos agrícolas poseen un porcentaje alto de materia orgánica (lignina, celulosa y hemicelulosa) difícilmente biodegradable por microorganismos anaerobios, la eficiencia de conversión de estos tipos de materiales en energía (biogás) es baja. En varios estudios se ha demostrado que los pretratamientos químicos (ácidos) y enzimáticos permiten obtener eficientemente azúcares solubilizados de estos materiales permitiendo así una mayor conversión de la materia orgánica en energía.

4. HIPÓTESIS

Es posible que mediante pretratamientos secuenciales de hidrólisis ácida y enzimática de los residuos agrícolas (paja de avena) se pueda obtener una mayor eficiencia en la producción de biogás en un reactor anaerobio.

5. OBJETIVO

Implementar procesos secuenciales de sacarificación química y enzimática de paja de avena que nos permita obtener una tasa alta de conversión de las fracciones de celulosa y hemicelulosa a azúcares fermentables para maximizar la producción de metano.

5.1. Objetivos específicos

- (1) Implementar el protocolo de hidrólisis ácida para la sacarificación de la hemicelulosa y caracterizar químicamente el hidrolizado ácido.
- (2) Realizar pruebas de producción de metano en un reactor UASB utilizando hidrolizados ácidos.
- (3) Implementar el protocolo de hidrólisis enzimática para la sacarificación de la celulosa y caracterizar químicamente el hidrolizado enzimático.
- (4) Realizar pruebas de producción de metano en un reactor UASB utilizando hidrolizados enzimáticos.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los residuos de paja de avena se someterán a hidrólisis secuenciales (Tabla 6.1). Posteriormente los hidrolizados ácidos y enzimáticos serán caracterizados químicamente para conocer su composición de azúcares y determinar su demanda química de oxígeno (DQO). El hidrolizado alcalino no será utilizado debido a que no es un sustrato rico en azúcares solubles y solo se tomará en cuenta al momento de realizar los balances de masa y carbono sobre el proceso secuencial de hidrólisis. A la fracción residual sólida de cada hidrólisis se le determinará el contenido de carbono orgánico total y la cantidad de hemicelulosa, lignina y celulosa.

Tabla 6.1. Hidrólisis secuenciales empleadas

Hidrólisis	Fracción hidrolizada	Hidrolizado	Residuo
Ácida	Hemicelulosa	Ácido (azúcares)	Celulosa, lignina, remanente de hemicelulosa
Alcalina	Lignina	Alcalino	Celulosa, remanentes de lignina y hemicelulosa
Enzimática	Celulosa	Enzimático (azúcares)	Remanentes de celulosa, lignina y hemicelulosa

Los hidrolizados ácido y enzimático serán utilizados como sustrato para la alimentación de dos reactores metanogénicos (UASB) con el objetivo de investigar si es posible producir metano a partir de estos (Figura 6.1). Los reactores se iniciaron con un inóculo anaerobio al cual se le determinó su actividad metanogénica. Antes de alimentar los reactores se realizaron pruebas de toxicidad al hidrolizado ácido. Así mismo, se realizaron pruebas para definir las condiciones óptimas para efectuar la hidrólisis enzimática.

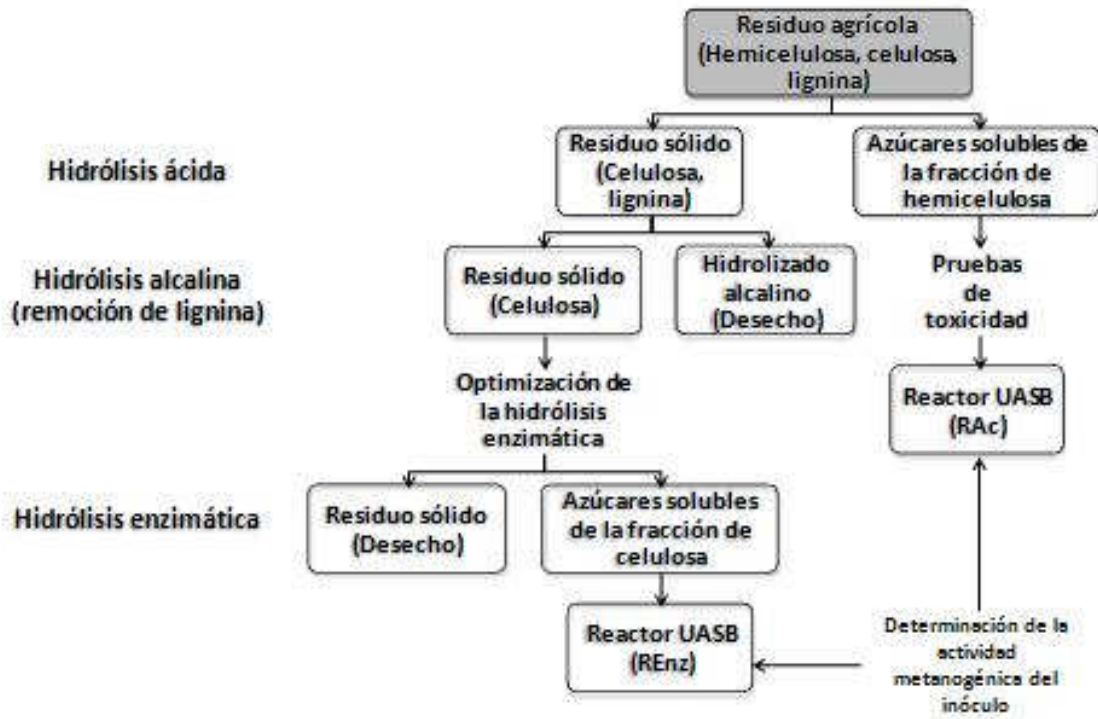


Figura 6.1. Estrategia experimental para hidrolizar la hemicelulosa, celulosa y lignina presentes en los residuos agrícolas

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales

7.1.1. Sustrato lignocelulósico

Se utilizó paja de avena la cual se obtuvo con un distribuidor comercial de forrajes. La paja de avena fue lavada con agua y secada a 50°C. A continuación se molió y mediante un tamizado por 3 diferentes tamaños de malla (6, 8 y 18) se obtuvo un tamaño de partícula promedio de 1 cm de largo.

7.1.2. Enzimas

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando una preparación comercial de celulasas (Celluclast 1.5L[®], Novozyma, No. de Catálogo: C2730-50ML) la cual contenía 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan y 4-glucano-hidrolasa.

7.1.3. Fuente de inóculo

Para los reactores y las pruebas de toxicidad se utilizó un lodo metanogénico proveniente de un reactor anaerobio industrial de tratamiento de aguas residuales generadas durante el procesamiento de la malta en la cervecería Cuauhtémoc, ubicada en la ciudad de Grajales, Puebla. La actividad del lodo se evaluó de acuerdo al ensayo descrito en la sección 7.2.4.1.

7.1.4. Medios de cultivo

7.1.4.1. Medio para alimentación de reactores

El medio de cultivo basal utilizado para la alimentación de ambos reactores se preparó a partir de un medio de cultivo basal diez veces concentrado conteniendo macronutrientes (Tabla 7.1) y una solución de elementos traza mil veces concentrada (Tabla 7.2). Los sustratos utilizados como fuente de carbono fueron glucosa, xilosa o el hidrolizado ácido o enzimático según se indica posteriormente. Se ajustó al pH deseado (7.5) con bicarbonato de sodio y NaOH. La composición final del medio se muestra en la Tabla 7.3.

Tabla 7.1. Medio de cultivo basal 10X

Reactivo	Cantidad (g)
NH ₄ Cl	3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15
KH ₂ PO ₄	2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.98
KCl	2.5
Agua destilada	cbp 1 L

Tabla 7.2. Solución de elementos traza 1000X

Reactivo	Cantidad (g)
Resazurina 500X	1 (mL)
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.75
MnCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
EDTA	0.25
H ₃ BO ₃	0.031
ZnCl ₂	0.035
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.018
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.02
NiCl ₃ ·6H ₂ O	0.012
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.035
CuCl ₂ ·6H ₂ O	0.01
HCl 36%	0.5 (mL)
Na ₂ SeO ₃	0.05
Agua destilada	cbp 500 mL

Tabla 7.3. Preparación del medio para alimentación de reactores

Solución	Cantidad
Medio basal 10X	100 mL
Sol. elementos traza 1000X	1 mL
Sustrato	(*)
Extracto de levadura	0.2 g
Agua destilada	cbp 1 L

(*) Se agregó el sustrato (xilosa, glucosa o hidrolizado) necesario según la carga orgánica requerida

Se utilizó una DQO teórica de 1.067 g DQO/ g xilosa o glucosa.

Se ajusta el pH de la alimentación a 7.5 con bicarbonato de sodio y NaOH.

7.1.4.2. Medio para determinar la actividad metanogénica

Tabla 7.4. Composición del medio para determinar la actividad metanogénica

Reactivo	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	0.25
NH ₄ Cl	0.28
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1
NaHCO ₃	5
Extracto de levadura	0.02
Elementos traza (1000X)	1 (mL)
Agua destilada	cbp 1 L

El medio se utiliza inmediatamente.

7.1.4.3. Medio para determinación de toxicidad

Tabla 7.5. Composición del medio para la determinación de toxicidad

Reactivo	Cantidad (g/L)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.703
K ₂ HPO ₄	0.6
NH ₄ Cl	0.28
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.111
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.006
Extracto de levadura	0.02
Agua destilada	cbp 1 L

El pH se ajusta a 7 con bicarbonato de sodio.

7.2. Métodos

7.2.1. Obtención de hidrolizados

7.2.1.1. Hidrolizado ácido

La hidrólisis ácida se llevó a cabo mediante la digestión de 50 g de paja de avena, seca y tamizada, con un litro de una solución de HCl al 2% por 2 horas a 90°C (Curreli *et al.*, 2002). La fracción líquida (hidrolizado ácido) fue filtrada y el residuo sólido fue lavado con agua destilada hasta pH neutro y secado a 50°C. El hidrolizado se caracterizó químicamente mediante la determinación de la DQO, pH, carbono orgánico total (COT) y azúcares presentes, estos últimos mediante electroforesis capilar y por azúcares reductores. El residuo sólido se caracterizó

mediante la determinación de las fracciones lignocelulósicas (lignina, celulosa, hemicelulosa) y COT.

7.2.1.2. Hidrolizado alcalino

El residuo seco de la hidrólisis anterior se sometió por 24 horas a una hidrólisis alcalina (ajustando a una concentración de 60 g/L del residuo) empleando una solución de NaOH 1% a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente se agregó H₂O₂ a una concentración de 0.3% del volumen total de solución y se mantuvo en las mismas condiciones de temperatura y agitación por otras 24 horas. La fracción líquida (hidrolizado alcalino) se filtró y el residuo sólido se lavó una vez con una solución 10 mM de ácido acético y posteriormente con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro (Curreli *et al.*, 2002). El residuo fue secado a 50°C para someterlo posteriormente a una hidrólisis enzimática. También se caracterizó mediante la determinación de las fracciones lignocelulósicas (lignina, celulosa, hemicelulosa) y COT.

7.2.1.3. Hidrolizado enzimático

La optimización de la hidrólisis enzimática se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.3, utilizando celulosa microcristalina (CMC) como sustrato. Una vez definidas las condiciones óptimas de la hidrólisis, se realizó la hidrólisis enzimática del residuo sólido proveniente de la hidrólisis alcalina. Aunque el método de optimización sugirió una concentración de residuo de 80 g/L, en la práctica se empleó solo la mitad de dicha concentración, debido a la naturaleza higroscópica del residuo, la cual provocaba problemas de agitación. El residuo seco, obtenido de la hidrólisis alcalina (40 g/L), se sometió a una hidrólisis enzimática utilizando regulador de citratos 50 mM a pH 4.5. Se utilizó una concentración de enzima de 0.9 mg/mL a una temperatura de 45°C por 10 horas. La fracción líquida (hidrolizado enzimático) se filtró y se caracterizó químicamente mediante la determinación de DQO, pH, COT y azúcares presentes, estos últimos mediante electroforesis capilar y por azúcares reductores. El residuo sólido fue

secado a 50°C y se caracterizó mediante la determinación de las fracciones lignocelulósicas (lignina, celulosa, hemicelulosa) y COT.

7.2.2. Caracterización de los hidrolizados

7.2.2.1. Determinación de azúcares

La identificación de los azúcares presentes en los hidrolizados y su concentración se llevó a cabo mediante electroforesis capilar. Una muestra de hidrolizado se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm. Se preparó una dilución 1:10 del sobrenadante y esta dilución fue filtrada a través de una membrana Millipore de 0.25 y colocada en viales para su determinación. Las condiciones de análisis para la electroforesis capilar se indican en la sección 7.2.5.3.

7.2.2.2. Toxicidad del hidrolizado ácido

Se llevaron a cabo pruebas de toxicidad del hidrolizado ácido (debido a la formación de subproductos tóxicos durante la hidrólisis ácida) siguiendo el protocolo estándar reportado por Angelidaki *et al.*, (2007). En dicho protocolo, un lodo metanogénico activo se expone al inhibidor y posteriormente se determina el porcentaje de inhibición mediante una prueba estándar de actividad metanogénica. Cada botella contenía 25 mL de medio (ver sección 7.1.4.3) y se inocularon con 0.6- 0.7 g de lodo granular metanogénico lo que equivale a una concentración de 2 g sólidos volátiles de lodo por litro de medio (2 g SSV/L), previamente lavado con una solución de NaCl al 0.95%. Se adiciona una concentración de sustrato equivalente a 2 g DQO/L de una solución de glucosa-xilosa a cada botella. Con el propósito de obtener un lodo activo las botellas se incubaron por 72 horas a 35°C y con agitación a 100 rpm. Cumplido este tiempo se agregó 1 g DQO/L de glucosa-xilosa (1:1 en base DQO) al ensayo control y diferentes volúmenes de hidrolizado ácido a los ensayos experimentales. Estos volúmenes fueron 25, 5, 2.5, 0.5 y 0.25 mL de hidrolizado, correspondientes a 100, 20, 10, 2 y 1% respectivamente con respecto al volumen inicial total de medio (ver Tabla 8.7). Se midió el volumen acumulado de metano que se generó, por medio de un dispositivo de desplazamiento de volumen (ver sección 7.2.5.1.)

7.2.3. Optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática utilizando CMC

7.2.3.1. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de enzima se evaluó determinando la concentración de proteína por el método de Bradford descrito por Kruger (1996). Se utilizó un kit comercial de reactivo de Bradford. Se adicionaron 200 μ L de una solución de enzima (dilución 1:100) a un tubo eppendorf, posteriormente se agregaron 600 μ L de agua destilada y 200 μ L de reactivo de Bradford. Se mezcla cuidando de no producir espuma y se deja reposar por 5 minutos. Finalmente se lee la absorbencia a 595 nm.

7.2.3.2. Determinación de azúcares reductores

Para evaluar la tasa de hidrólisis de la CMC se utilizó el método de determinación de azúcares reductores (medidos como glucosa) a 600 nm propuesto por Miller (1959) utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La Tabla 7.6 muestra la composición del reactivo DNS.

Tabla 7.6. Composición reactivo DNS

Reactivo	Cantidad
	g
NaOH	7
Fenol	2.7
Metabisulfito de sodio	2.45
Tartrato de sodio y potasio	14.5
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	0.5

Preparación: se disuelven en 400 mL de agua destilada los componentes indicados en la Tabla 7.6 y se afora a 500 mL con agua destilada, protegiendo de la luz desde la preparación. La solución es de color amarillo oro. Si presenta precipitación la solución ya no se puede emplear.

7.2.3.3. Ensayo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica

Para evaluar la actividad celulolítica del preparado enzimático comercial (Celluclast), usado en la hidrólisis enzimática de la paja de avena, se empleó un ensayo estándar descrito a continuación. Se cortaron tiras de papel filtro Wattman de 1 x 6 cm (50 g) y se colocaron en un tubo de ensayo, posteriormente, se agregó 1 mL de regulador de citratos 50 mM el cual se preparó pesando 10.504 g de ácido cítrico monohidratado y aforándolo a un litro de agua destilada. Se ajusta el pH de la solución con NaOH hasta el pH de 4.8. Posteriormente se agrega 0.5 mL de enzima concentrada al tubo y se incuba a 50°C por una hora. Cumplido el tiempo se agregaron 3 mL de reactivo DNS y se calentó en baño María a ebullición por 5 minutos. Se determinó la concentración de azúcares liberados con una curva estándar con glucosa (sección 7.2.3.2) y la concentración de proteína mediante el método de Bradford (sección 7.2.3.1).

7.2.3.4. Diseño experimental para la optimización de la hidrólisis enzimática

Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en experimentos en los que intervienen varios factores o parámetros para estudiar el efecto conjunto de éstos sobre una variable de respuesta. El diseño 2^k es particularmente útil en las primeras fases del trabajo experimental ya que conlleva a un menor número de corridas con las cuales pueden estudiarse k parámetros en un diseño factorial completo. El diseño anterior se complementa con un modelo de superficie de respuesta. El método factorial 2^k es clasificado como un método simultáneo, siendo utilizado en la etapa de optimización. Su aplicación permite seleccionar la combinación de condiciones óptimas en la obtención de la mejor respuesta para una situación dada.

Se empleó un modelo de superficie de respuesta para optimizar las condiciones para efectuar la hidrólisis enzimática de sustratos lignocelulósicos, utilizando CMC como sustrato modelo. La variable de respuesta fue la máxima tasa de hidrólisis medida como azúcares reductores liberados. Las variables que

se optimizaron incluyeron el pH, la temperatura, la concentración de enzima y de sustrato (ver Tabla 8.4.), lo que generó un modelo factorial 2^4 de composición central con puntos axiales y 4 ensayos como controles o puntos intermedios, que equivale a realizar 28 ensayos (ver Tabla 8.2.).

Para calcular la tasa máxima de azúcares reductores producidos en los ensayos, los datos fueron ajustados mediante el modelo de Gompertz (ver Figura 8.1) (Tang *et al.*, 2008). El análisis de los datos y la generación de las superficies de respuesta se realizaron mediante el software *Statgraphics Plus*.

Después de que se determinaron las condiciones óptimas mediante el modelo, éstas fueron nuevamente evaluadas, dejando fijos 3 de los 4 parámetros óptimos predichos por el modelo, con el objetivo de comprobar analíticamente las condiciones (ver Figuras 8.8-8.10). Finalmente, tras haber determinado las condiciones óptimas, se procedió a efectuar la hidrólisis enzimática utilizando el residuo sólido proveniente de la hidrólisis alcalina, rico en celulosa, como sustrato.

7.2.4. Reactores metanogénicos

Se utilizaron dos reactores UASB de vidrio con un volumen de 1.13 L, diámetro interno de 5.4 cm y una relación altura/diámetro de 10.5 aproximadamente. Inicialmente los reactores se alimentaron con una mezcla de sustratos modelo (en este caso se utilizó una mezcla 1:1 de glucosa y xilosa en base DQO) para adaptar al inóculo y posteriormente se sustituyó dicha mezcla por el hidrolizado. Uno de los reactores fue alimentado con hidrolizado ácido (RAc) mientras que el otro se alimentó con hidrolizado enzimático (REnz). Los detalles de las diferentes fases de alimentación se describen en la sección 8.6.1 y 8.6.2. Para alimentar ambos reactores se utilizó un flujo de alimentación de 0.8 mL/min y un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 24 horas.

7.2.4.1. Ensayo de la actividad metanogénica del inóculo

Las pruebas en lote para la determinación de la actividad metanogénica del lodo usado como inóculo se realizaron en base al protocolo propuesto por Tarvin y Buswell (1934). Cada botella contenía 25 mL de medio (ver sección 7.1.4.2) y una

concentración de 2 g SSV/L de lodo (equivalente a 0.6-0.7 g lodo granular por botella), previamente lavado con una solución de NaCl al 0.95%. Como sustrato a cada botella se le adiciona el equivalente a 2 g DQO/L de una solución stock de acetato, además se incluyó un control sin sustrato. Las botellas se incubaron por 72 horas a 35°C con agitación a 100 rpm. Cumplido este tiempo se agregó el equivalente a 1 g DQO/L de acetato a cada botella, excepto al control, posteriormente se midió el volumen acumulado de metano generado, por medio de un dispositivo de desplazamiento de volumen (ver sección 7.2.5.1.)

7.2.4.2. Condiciones de operación

7.2.4.2.1. Reactor ácido (RAc)

El reactor fue alimentado inicialmente con una mezcla de sustratos modelo (glucosa/xilosa, 1:1 en base DQO) a una concentración total de 0.5 g DQO/L. Después de 14 días de operación, la carga de la alimentación fue incrementada a 1 g DQO/L con la misma mezcla con el propósito de aclimatar el lodo a una carga orgánica más alta. Cuando la producción de metano se estabilizó, la mezcla glucosa/xilosa fue sustituida paulatinamente con hidrolizado ácido; la sustitución variaba desde una relación 1:9 (en base DQO) de hidrolizado ácido y sustrato modelo en la alimentación, hasta la completa sustitución del sustrato modelo por hidrolizado en la misma. Una vez que se sustituyó en su totalidad la mezcla de sustratos modelo, se procedió a incrementar la carga orgánica con hidrolizado ácido solamente, hasta alcanzar la carga máxima a la cual el reactor se desestabilizó. Esto último se observó cuando la cama de lodo comenzó a flotar provocando taponamiento en la salida del gas y del efluente. Las diferentes etapas de alimentación del reactor se muestran en la Figura 8.11. Para el ajuste del pH de la alimentación y la alcalinidad del reactor, primero se adicionaba una cantidad adecuada de bicarbonato de sodio que permitiera mantener el pH del reactor en un valor de 7.5 (± 0.2) después de un día de operación. Esta cantidad varió de 1.0 a 4.0 g/L de bicarbonato de sodio aproximadamente cuando la concentración de hidrolizado ácido se varió de 1 a 9 g DQO/L respectivamente. En general, era

necesario ajustar el pH final de la alimentación a un valor de 7.5 con una solución de NaOH.

7.2.4.2.2. Reactor enzimático (REnz)

El reactor fue alimentado inicialmente con una mezcla de glucosa/xilosa (1:1 en base DQO) a una concentración total de 1.5 g DQO/L. Después de 79 días de operación y cuando la producción de metano se estabilizó, la mezcla glucosa/xilosa fue sustituida paulatinamente con hidrolizado enzimático; la sustitución variaba desde una relación 1:1 (en base DQO) de hidrolizado enzimático y sustrato modelo en la alimentación, hasta la completa sustitución del sustrato modelo por hidrolizado en la misma. Posteriormente se incrementó la carga orgánica alimentando solamente con hidrolizado enzimático hasta alcanzar la carga máxima a la cual el reactor se desestabilizó de la misma forma que el reactor ácido. Las diferentes etapas de alimentación del reactor se muestran en la Figura 8.12. El pH de la alimentación fue neutralizado como se describió para el reactor ácido.

7.2.4.3. Desempeño del reactor

El desempeño del reactor se evaluó mediante el seguimiento del pH y la alcalinidad para evitar eventos de acidificación del reactor; la producción y composición del biogás (CH_4/CO_2) para comprobar que la actividad metanogénica se mantenía estable y la remoción de DQO en el efluente así como la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y azúcares residuales en el mismo, de acuerdo a los métodos descritos en la siguiente sección.

7.2.5. Determinaciones analíticas

7.2.5.1. Determinación del volumen de metano producido

La determinación del volumen de gas producido se realizó mediante el método de desplazamiento de volumen (Figura 7.1), el cual consiste en hacer pasar el gas por una trampa de NaOH al 3% la cual captura el CO_2 producido dejando libre el

CH₄ como gas principal y por desplazamiento del volumen en la trampa se calcula el volumen correspondiente al gas producido.



Figura 7.1. Método de desplazamiento de volumen. El metano producido se cuantifica por desplazamiento de volumen en la trampa de NaOH

7.2.5.2. Cromatografía de gases

Se tomaron muestras del biogás producido en los reactores para determinar la composición del mismo (relación CH₄:CO₂) por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo marca Agilent, modelo 6890N equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna de Hysep D (mesh 100/120, 3 m de largo, 1/8 de pulgada de diámetro externo) utilizando nitrógeno (30 mL/min) como gas acarreador.

7.2.5.3. Electroforesis capilar

Para el análisis de azúcares totales en los hidrolizados, azúcares residuales y AGV en el efluente de los reactores se utilizó un equipo de electroforesis capilar Agilent, modelo 1600A con un capilar de 72 cm de longitud efectiva y un electrolito básico (pH=12.01). Para la cuantificación se utilizó el software Chemstation B.01.03.204 así como estándares de azúcares (glucosa, xilosa, manosa, galactosa, arabinosa), AGV (acético, propiónico y butírico) y de citrato.

7.2.5.4. Demanda química de oxígeno (DQO)

Para la determinación de la concentración de materia orgánica presente en los hidrolizados ácido y enzimático se obtuvo la DQO como está descrito en el método de reflujo cerrado propuesto por la American Public Health Association (APHA) en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005).

7.2.5.5. pH

Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro marca Thermo modelo Orion 5 Star

7.2.5.6. Alcalinidad

Para la determinación de alcalinidad (capacidad de amortiguamiento de pH) en los reactores se utilizó el método de titulación potenciométrica propuesto por la APHA en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005).

7.2.5.7. Caracterización de compuestos lignocelulósicos

7.2.5.7.1. Carbono orgánico total (COT)

Se realizaron determinaciones de carbono orgánico total en la paja de trigo y en los residuos sólidos y líquidos (hidrolizados) obtenidos después de la hidrólisis ácida, alcalina y enzimática, para realizar un balance del carbono presente tanto en las fracciones sólidas así como en las fracciones líquidas obtenidas en cada hidrólisis. Se empleó un analizador de Carbono Orgánico Total para muestras sólidas y líquidas Shimadzu modelo TOC-VSCN que utiliza un método de oxidación por combustión interna a 900°C y O₂ como gas acarreador y a 680°C y aire como gas acarreador, respectivamente.

7.2.5.7.2. Determinación de fibras

La determinación de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA) en la paja de avena y en los residuos sólidos obtenidos después del tratamiento ácido, alcalino y enzimático se llevó a cabo mediante una versión simplificada del procedimiento secuencial ANKOM con

bolsas de poliéster y el método tradicional de Van Soest (Figura 7.2), reportado por Keys *et al.* (1969) basado en la determinación de los constituyentes de paredes celulares de origen vegetal (celulosa, hemicelulosa, lignina).

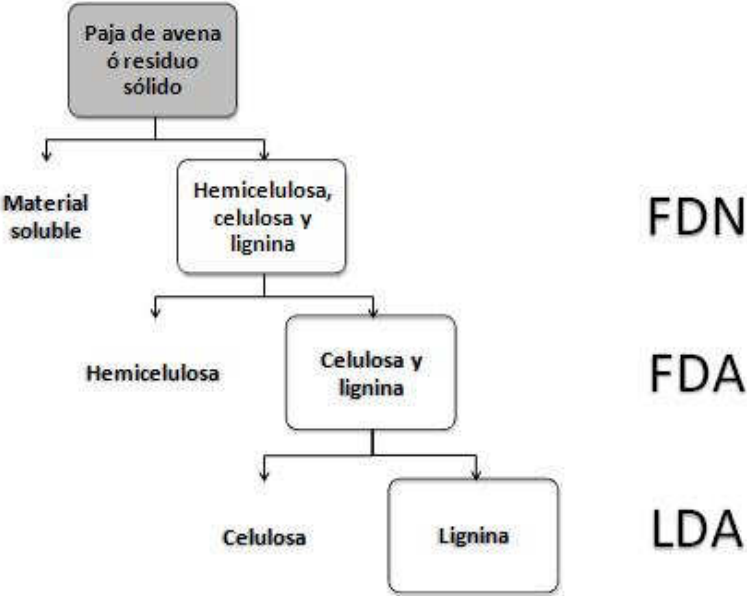


Figura 7.2. Método tradicional de Van Soest para determinación de fibras. Los cuadros de la derecha indican la fibra residual, mientras que del lado izquierdo de los cuadros se muestra la fibra solubilizada en cada proceso. La determinación de cada fracción lignocelulósica se hace por diferencia de peso: Lignina= LDA; Celulosa=FDA-LDA; Hemicelulosa= FDN-FDA; Material soluble= Muestra original- FDN

8. RESULTADOS

8.1. Determinación de la actividad celulolítica del preparado enzimático

La Tabla 8.1 muestra los resultados de la actividad celulolítica del preparado enzimático Celluclast, expresada como unidades de papel filtro hidrolizado (FPU por sus siglas en inglés) por miligramo de enzima. Una FPU se definió como la cantidad necesaria de enzima para producir 1 μ mol de azúcares reductores por minuto y por gramo de sustrato (Nordmark *et al.*, 2007).

Tabla 8.1. Actividad celulolítica del preparado enzimático

	Proteína (mg)	Actividad celulolítica (FPU)	Actividad celulolítica específica (FPU/mg)
Enzima	40.7 \pm 0.29	718.5 \pm 2.64	17.6 \pm 0.78

8.2. Optimización de las condiciones de la hidrólisis enzimática

Los parámetros que se optimizaron se muestran en la Tabla 8.2. Como parámetro de respuesta se midió la máxima tasa de hidrólisis evaluada como azúcares reductores liberados (expresados como glucosa) a partir de la CMC. Los resultados se muestran en la Tabla 8.3, en la cual se observa que a condiciones cercanas al límite óptimo inferior de temperatura y pH se obtiene una mejor respuesta de producción de azúcares reductores. Además, se observa la misma situación para condiciones cercanas al límite óptimo superior de enzima y sustrato.

Tabla 8.2. Parámetros y sus respectivos intervalos de prueba evaluados en la optimización de la hidrólisis enzimática

Parámetros	Límite óptimo inferior	Valor central	Límite óptimo superior	Valores adicionales (Puntos axiales)	Unidades
pH	4.5	5.0	5.5	4 y 6	
Temperatura	45	50	55	40 y 60	°C
[Enzima]*	0.1	0.3	0.5	0.7	mg proteína/mL de medio
[Sustrato]**	20	40	60	80	g/L

* [Enzima]: concentración de enzima; **[Sustrato]: concentración de sustrato

Los datos generados por los ensayos mostrados en la Tabla 8.3 se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (Figura 8.1). Dicho ajuste permitió determinar la tasa máxima de producción de azúcares reductores (AR) generada en cada uno de los ensayos. Este parámetro se utilizó para generar las gráficas de superficie de respuesta. En la Figura 8.1 se muestran como ejemplo algunos ensayos así como el ajuste obtenido.

Tabla 8.3. Diseño experimental 2^k de composición central con puntos axiales

Ensayo	pH	Temperatura °C	Enzima (mg proteína/mL)	Sustrato (g/L)	Máxima Producción de AR* (mg/mL)	Tasa máxima de producción (mg AR*/mL- h)
1	4.5	45	0.1	20	8.7	1.1
2	5.5	45	0.1	20	7.8	0.9
3	4.5	55	0.1	20	7.1	1.0
4	5.5	55	0.1	20	4.2	0.4
5	4.5	45	0.5	20	11.6	1.6
6	5.5	45	0.5	20	10.0	1.3
7	4.5	55	0.5	20	9.4	1.5
8	5.5	55	0.5	20	7.6	1.1
9	4.5	45	0.1	60	11.0	1.3
10	5.5	45	0.1	60	9.5	1.1
11	4.5	55	0.1	60	10.2	0.9
12	5.5	55	0.1	60	7.2	1.2
13	4.5	45	0.5	60	19.1	2.4
14	5.5	45	0.5	60	14.7	2.1
15	4.5	55	0.5	60	6.9	1.3
16	5.5	55	0.5	60	17.7	2.2
17	4	50	0.3	40	14.5	2.2
18	6	50	0.3	40	16.1	1.1
19	5	40	0.3	40	10.8	0.8
20	5	60	0.3	40	10.2	1.9
21	5	50	0	40	0	0
22	5	50	0.7	40	17.8	1.2
23	5	50	0.3	0	0	0
24	5	50	0.3	80	17.8	1.8
25	5	50	0.3	40	18.2	1.1
26	5	50	0.3	40	17.1	1.3
27	5	50	0.3	40	17.0	1.2
28	5	50	0.3	40	16.1	1.2

* AR: azúcares reductores medidos como glucosa

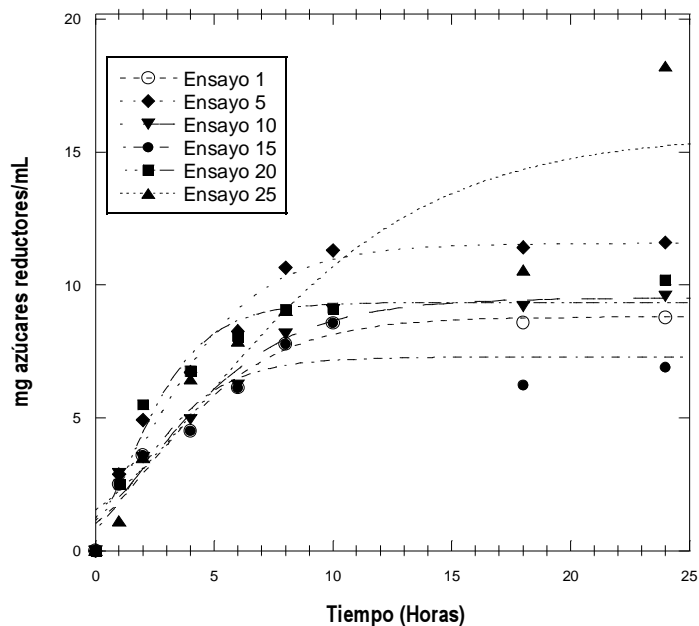


Figura 8.1. Ajuste de los datos obtenidos en algunos ensayos para la optimización de condiciones para la hidrólisis enzimática. El número de ensayo corresponde al de la Tabla 8.3 y las líneas discontinuas representan el ajuste mediante el modelo de Gompertz.

La Figura 8.2 muestra el comportamiento que se presentó al variar la temperatura y el pH, manteniendo constante la concentración de sustrato (60 g/L) y enzima 0.5 mg/mL. Se observa que al disminuir la temperatura y el pH, la tasa de producción de AR se incrementa. La mayor tasa de producción (2.4 mg AR/mL-h) se observa a 45°C y pH de 4.5, aunque por la tendencia de la superficie dicho máximo podría presentarse a pH y temperaturas más bajas pero hay que tomar en cuenta que esto es solo una predicción del modelo.

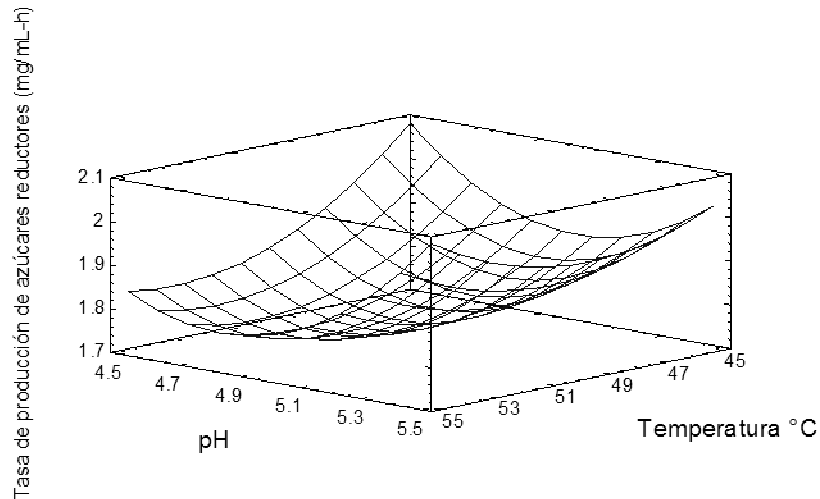


Figura 8.2. Modelo de superficie de respuesta de la tasa de producción de azúcares reductores al variar la temperatura y pH. Concentración de enzima= 0.9 mg/mL, concentración de sustrato=60 g/L

Se procedió a generar otra superficie de respuesta (Figura 8.3) variando las concentraciones de enzima y sustrato manteniendo constante el pH y la temperatura en los valores que produjeron la máxima actividad de acuerdo a la Figura 8.2. Se observa que a concentraciones más altas de sustrato y enzima la tasa de producción se incrementa, encontrándose un máximo a 80 g/L de sustrato y 0.7 mg/mL de enzima.

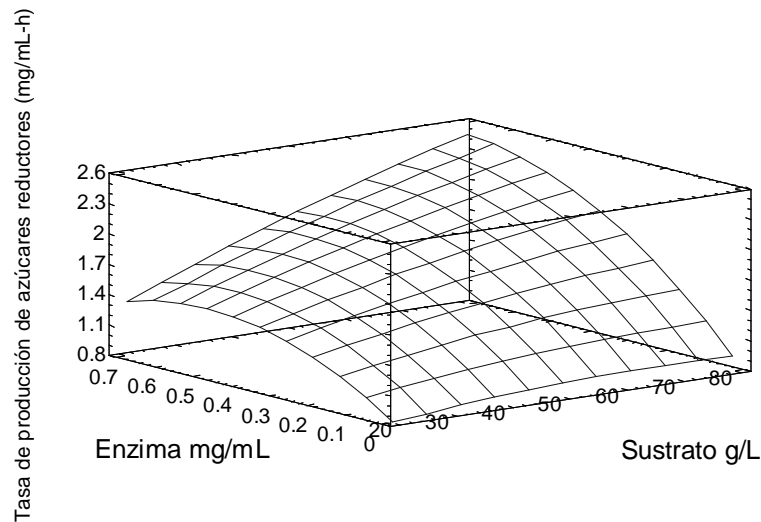


Figura 8.3. Modelo de superficie de respuesta de la tasa de producción de azúcares reductores al variar la concentración de enzima y sustrato. Temperatura=45°C, pH=4.5.

El análisis de varianza (ANOVA) de los resultados generados con el modelo 2^k permite determinar cual de los parámetros tiene mayor o menor significancia en el proceso (Anexo A). Debido a que la temperatura resultó ser el factor menos significativo, estadísticamente hablando, se fijó a 45°C (Figuras 8.4 a 8.6) y se procedió a evaluar analíticamente las condiciones óptimas predichas por las gráficas de superficie de respuesta, dejando fijos 3 de los 4 parámetros predichos por el modelo de superficie de respuesta. La Tabla 8.4 muestra el cálculo de rendimiento de cada una de las evaluaciones.

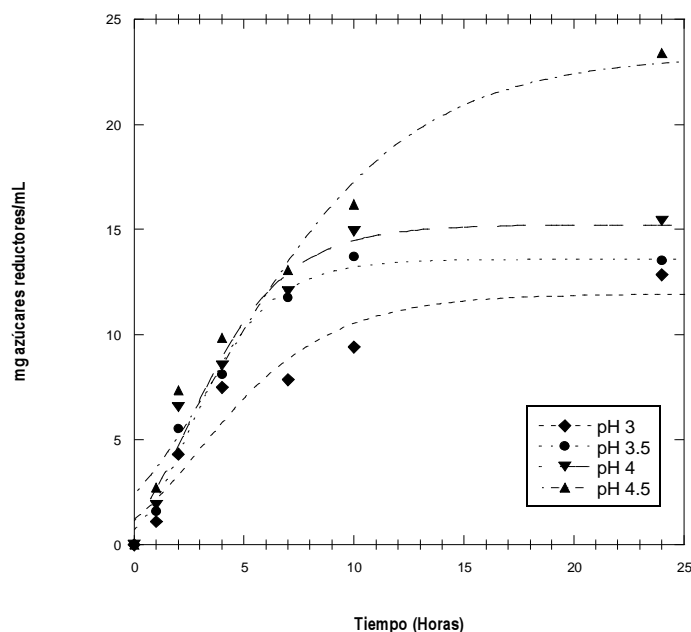


Figura 8.4. Efecto del pH sobre la producción de azúcares (temperatura= 45°C, concentración de enzima= 0.5 mg/mL, y sustrato= 60 g/L)

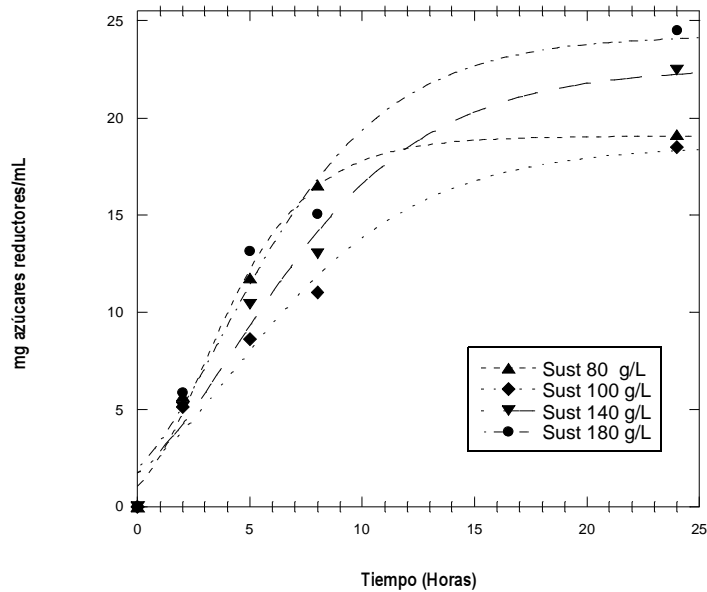


Figura 8.5. Efecto de la concentración de sustrato en la producción de azúcares (pH=4.5, temperatura= 45°C, concentración de enzima= 0.5 mg/mL)

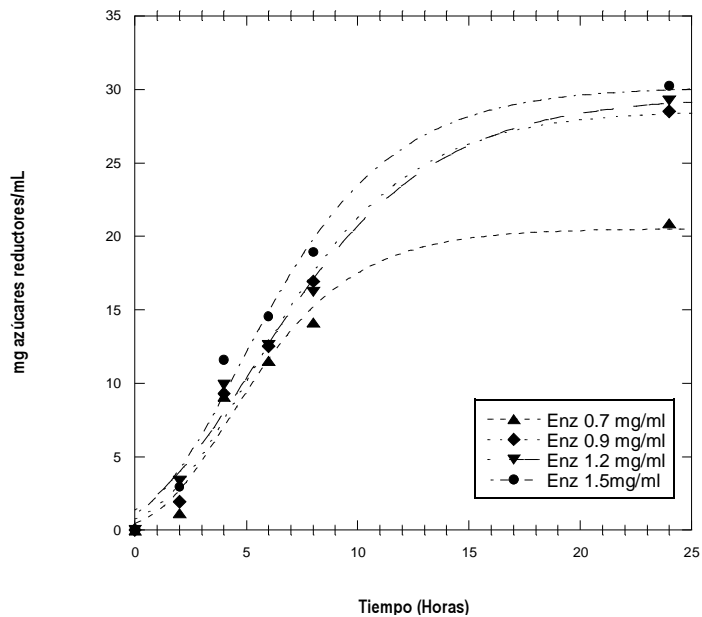


Figura 8.6. Efecto de la concentración de enzima en la producción de azúcares (pH=4.5, temperatura= 45°C, concentración de sustrato= 60 g/L)

Para determinar los parámetros óptimos de la hidrólisis enzimática se calculó el rendimiento para cada uno de los experimentos mostrados en las Figuras 8.4 a 8.6. En la Tabla 8.4 se muestran dichos rendimientos. Debido a que no se encontró diferencia considerable entre los rendimientos obtenidos con las

diferentes concentraciones de enzima ensayadas a concentraciones mayores o iguales que 0.9 mg de enzima/mL, se decidió utilizar esta concentración como la óptima.

Tabla 8.4. Análisis de rendimientos de azúcares reductores por gramo de sustrato

Parámetro a evaluar	Condiciones (pH:Temp:Sust:Enz)	Producción máxima (mg AR/mL)	Rendimiento (mg AR/g sustrato)
pH	3 : 45 : 60 : 0.7	12.8	214.2
	3.5 : 45 : 60 : 0.7	13.5	225.3
	4 : 45 : 60 : 0.7	15.4	256.8
	4.5 : 45 : 60 : 0.7	23.4	390.0
	4.5 : 45 : 80 : 0.7	32.2	353.3
Concentración sustrato	4.5 : 45 : 100 : 0.7	37.1	294.1
	4.5 : 45 : 120 : 0.7	34.6	232.5
	4.5 : 45 : 140 : 0.7	41.5	189.3
	4.5 : 45 : 60 : 0.7	20.8	347.9
Concentración enzima	4.5 : 45 : 60 : 0.9	28.5	475.1
	4.5 : 45 : 60 : 1.2	29.2	487.0
	4.5 : 45 : 60 : 1.5	30.2	503.7

AR: azúcares reductores medidos como glucosa; Temp: temperatura (°C); Sust: concentración de sustrato (g/L); Enz: concentración de enzima (mg/mL)

De acuerdo a la tabla anterior las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática de la paja de avena son: pH 4.5, temperatura 45°C, sustrato 80 g/L y 0.9 mg/mL de enzima. Cabe aclarar que aunque la concentración óptima de sustrato fue de 80 g/L, se presentaron problemas con la agitación de los medios de reacción al utilizar el residuo sólido de la hidrólisis ácida, motivo por el cual se uso una concentración de sustrato igual a 40 g/L.

8.3. Caracterización química de los hidrolizados

La caracterización química de los hidrolizados (ácido y enzimático) consistió en la determinación del pH (1.2 y 4.6 respectivamente), DQO total (23.6 y 31.7 g DQO/L respectivamente), concentración de azúcares (estimados mediante electroforesis capilar) y concentración de azúcares reductores de cada uno de ellos, estos últimos se muestran en la Tabla 8.5.

Tabla 8.5. Concentración de azúcares en los hidrolizados ácido y enzimático

Hidrolizado	Manosa (mg/L)	Xilosa (mg/L)	Arabinosa (mg/L)	Glucosa (mg/L)	Galactosa (mg/L)	AEC mg/L	AR mg/L
Ácido	876.7 (±263.5)	2188.3 (±223.5)	1528.4 (±517.8)	2213.2 (±654.6)	478.2 (±123.7)	7284.8	20978 (±859)
Enzimático	0	1306.5 (±861.1)	0	2902.9 (±958.2)	224.2 (±388.2)	5162.4	18839 (±478)

AEC: suma de las concentraciones de azúcares determinados por electroforesis capilar; AR: azúcares reductores medidos por el método del ácido DNS

8.4. Determinación de fibras residuales

Se realizó un análisis proximal de las fracciones de hemicelulosa, celulosa y lignina (Tabla 8.6) en la paja de avena y en los residuos sólidos de las hidrólisis. Se puede apreciar como la fracción soluble, la hemicelulosa y la celulosa son los componentes mayoritarios, mientras que la lignina se encuentra en una pequeña proporción. Después de haber aplicado la hidrólisis ácida una proporción importante de la hemicelulosa fue solubilizada con el consecuente enriquecimiento de las fracciones de celulosa y lignina. Para el caso del residuo de la hidrólisis alcalina se aprecia que una fracción de lignina fue removida con el consecuente enriquecimiento de la celulosa, aunque la remoción no fue tan importante como se esperaba. Después de la hidrólisis enzimática, la fracción de celulosa disminuye en el residuo sólido y se enriquecen ligeramente las fracciones remanentes de lignina y hemicelulosa.

Tabla 8.6 Composición lignocelulósica proximal de los residuos de las hidrólisis

Residuo	% Material soluble	%Hemicelulosa	%Celulosa	% Lignina
Paja de avena	34.3 (±4.20)	27.4 (±1.0)	35.0 (±2.18)	3.2 (±1.14)
Residuo ácido	24.9 (±1.53)	9.1 (±0.48)	55.3 (±2.60)	10.6 (±0.86)
Residuo alcalino	6.6 (±1.51)	5.16 (±0.93)	80.8 (±1.35)	7.3 (±0.37)
Residuo enzimático	28.3 (±2.38)	6.9 (±1.55)	52.6 (±0.68)	12.1 (±2.97)

Los datos son el promedio de 4 análisis

La Tabla 8.7 muestra la cantidad de los diferentes componentes lignocelulósicos y la materia soluble (calculados a partir de la Tabla 8.6) presentes en la paja de avena antes de los procesos de hidrólisis y de los residuos después de cada etapa del proceso secuencial de hidrólisis. La Tabla 8.8 muestra la eficiencia de remoción de cada una de las fracciones después del proceso de hidrólisis respectiva. Dichas eficiencias se calcularon en base a los datos de la Tabla 8.7.

Tabla 8.7. Cantidades de los diferentes componentes lignocelulósicos presentes en la paja de avena y en los residuos sólidos de cada hidrólisis

Residuo	Peso muestra (g)	Mat. sol. (g)	Hemicelulosa (g)	Celulosa (g)	Lignina (g)
Inicial	90	30.9	24.6	31.5	2.8
Hidrólisis ácida	39.5	9.8	3.6	21.8	4.2
Hidrólisis alcalina	27.7	1.8	1.4	22.4	2.0
Hidrólisis enzimática	13.3	3.7	0.9	7.1	1.6

Tabla 8.8. Eficiencias de remoción de las fracciones lignocelulósicas por etapa

Tratamiento	%Remoción Hemicelulosa	%Remoción Celulosa	%Remoción Lignina
Hidrólisis ácida	85.3	30.8	0
Hidrólisis alcalina	60.3	0	51.3
Hidrólisis enzimática	34.9	68.6	20.6

La Tabla 8.9 muestra un balance de carbono para la hidrólisis secuencial del residuo de avena. El cálculo esta basado en 90 g de residuo el cual posee un porcentaje de carbono de 44.7%, equivalente a 40.2 g C.

Tabla 8.9. Balance de carbono para el proceso secuencial de hidrólisis

Etapa	Fracción sólida			Fracción líquida			Carbono total* (g)
	Residuo (g)	Carbono (%)	Carbono (g)	Hidrolizado (L)	Carbono (g/L)	Carbono (g)	
Inicial	90	44.7 (±0.53)	40.2				
Hidrólisis ácida	39.5	47.0 (±0.15)	18.5	1.6	9.8 (±0.43)	15.7	34.2
Hidrólisis alcalina	27.7	45.6 (±0.29)	12.6	0.6	8.8 (±0.52)	5.3	17.9
Hidrólisis enzimática	13.3	46.4 (±1.95)	6.2	0.6	8.3 (±0.28)	5	11.2

*: Suma del carbono en la fracción sólida más el carbono de la fracción líquida

8.5. Pruebas de toxicidad del hidrolizado ácido

Debido a la naturaleza tóxica que presenta el hidrolizado ácido al contener compuestos inhibidores generados durante el proceso de hidrólisis (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, (2000)), se realizaron pruebas para determinar la toxicidad del hidrolizado ácido sobre el lodo metanogénico. Como parte de dichas pruebas se realizó un ensayo control con una solución de glucosa-xilosa (1:1) para determinar la actividad anaerobia del lodo empleado y poder evaluar los porcentajes de inhibición con respecto a dicha actividad (Tabla 8.10; Figuras 8.7 y 8.8).

Tabla 8.10. Porcentaje de inhibición del hidrolizado ácido sobre el lodo granular metanogénico

Muestra	Metano producido (mL)	Inhibición (%)
Control glu-xil	12.2	0
100% HA*	5.2	57.4
20% HA	6.2	49.5
10% HA	8.7	28.7
2% HA	7.4	39.6
1% HA	9.6	21.8

* HA: hidrolizado ácido (ver explicación de las concentraciones del HA en la sección 7.2.2.2)

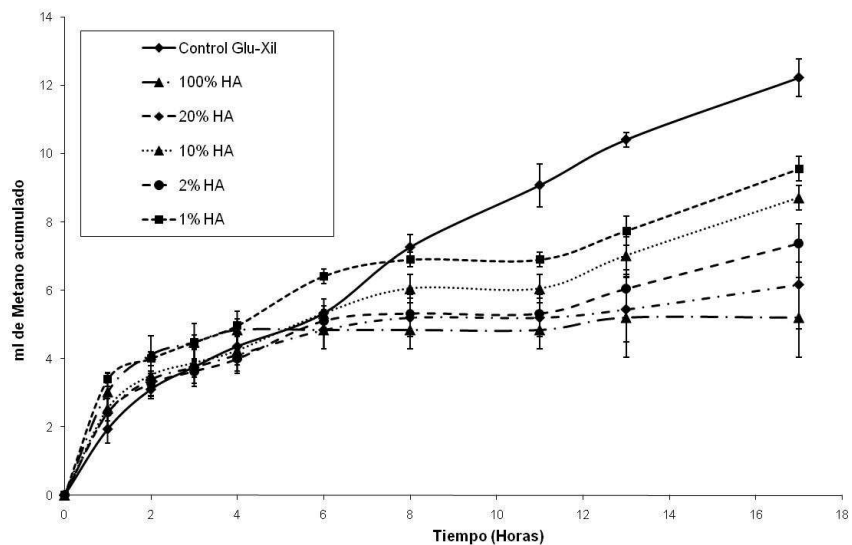


Figura 8.7. Producción de metano a diferentes porcentajes de hidrolizado ácido (pruebas de toxicidad). Se aprecia un efecto de inhibición de la actividad en los ensayos con hidrolizado ácido a partir de las 6 horas



Figura 8.8. Pruebas de toxicidad a diferentes porcentajes de hidrolizado ácido. Se puede apreciar un cambio de color (a oscuro) debido a la presencia del hidrolizado ácido en el medio.

8.6. Determinación de la actividad metanogénica del inóculo

La Figura 8.9 muestra el comportamiento en la producción de metano para la determinación de la actividad metanogénica. Dicha actividad se calculó a partir de la pendiente de la curva. La Tabla 8.11 muestra la caracterización realizada al lodo

metanogénico usado como inóculo así como la actividad específica metanogénica del mismo.

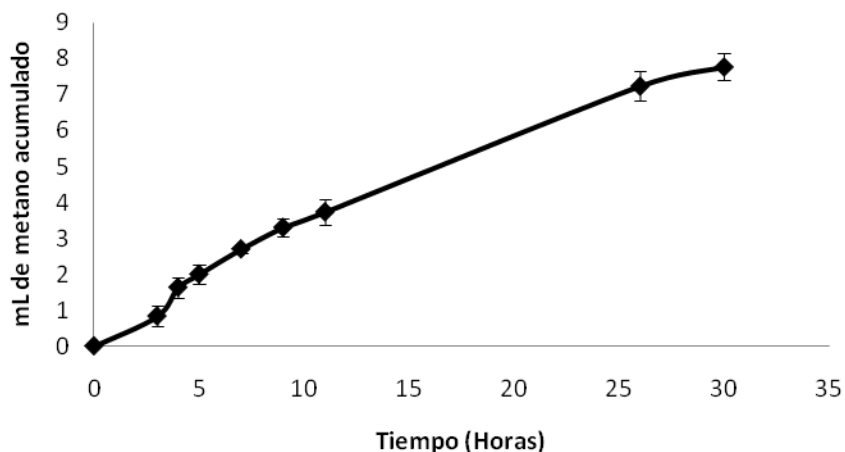


Figura 8.9. Cinética de producción de metano para la determinación de la actividad metanogénica del inóculo

Tabla 8.11. Caracterización del inóculo metanogénico (lodo de digestor).

Parámetros	Lodo Maltera
Sólidos Volátiles (SSV)	12.1%
Sólidos Totales (SST)	10.2%
Actividad metanogénica	0.4 g DQO-CH ₄ /gSSV-d (STP) 0.1 L CH ₄ /gSSV-d (STP)

8.7. Desempeño de los reactores

8.7.1. Reactor alimentado con hidrolizado ácido (RAc)

La Figura 8.10 muestra el resumen de las 5 fases operacionales del reactor RAc. Se operó el reactor por 260 días. La primera fase consistió en poner en marcha el reactor, en la cual el reactor se alimentó con una mezcla glucosa:xilosa (1:1 en base DQO) para la adaptación del lodo metanogénico, inicialmente con una carga orgánica de 0.5 g DQO y después de 14 días esta carga fue incrementada a 1g DQO/L-d, manteniendo la carga por 21 días más. Pasado este tiempo se optó por cambiar la carga orgánica en su totalidad por hidrolizado ácido (1g DQO/L-d) lo que provocó que a los pocos días ocurriera una acidificación del reactor y un cese de la actividad metanogénica del lodo. Se midió la alcalinidad del reactor, la cual

estaba muy baja (aprox. 400 mg CaCO₃/L), y se optó por alimentar nuevamente con sustrato modelo e incrementar la cantidad de bicarbonato en el medio (fase de recuperación) hasta su estabilización.

Cuando la producción de biogás y el pH del reactor se estabilizaron se prosiguió con la siguiente fase, la sustitución gradual de los sustratos modelo por hidrolizado hasta su totalidad. Además, se puso atención en la adición de bicarbonato para otorgarle la suficiente capacidad amortiguadora al reactor y evitar el suceso anterior.

Después de 124 días de operación del reactor y habiendo sustituido por completo los sustratos modelo por hidrolizado ácido se procedió a incrementar la carga orgánica del reactor (fase de incremento). No se siguió un orden de incremento en la carga orgánica en particular, en un principio el incremento era de 0.2, 0.3, 0.5 g DQO/L pero como no se observaba una desestabilización significativa en el reactor y tomando en cuenta que se necesitaba determinar la carga máxima de alimentación del reactor, los incrementos fueron mas altos (1, 2, 3 g DQO/L). Cabe aclarar que entre cada incremento se dejaba por lo menos 6 días de estabilización hasta el siguiente incremento. Cuando la carga orgánica llegó a los 12 g DQO/L-d (día 211) se observaron problemas en la operación del reactor. La cama de lodo flotaba hasta la parte superior del reactor, debido a la alta producción de biogás, tapando la salida de éste y desestabilizando el sistema. Debido a esto se disminuyó la carga orgánica a 7 g DQO/L-d (día 223) y nuevamente se incrementó de forma gradual hasta la carga máxima que soportó el reactor (fase de estabilización). La fase de estabilización duró más de 50 días. En un principio se estableció una carga orgánica máxima de 9.5 g DQO/L-d (día 245) pero a los pocos días se desestabilizó de igual forma que en la fase anterior. Por lo tanto, se optó por disminuir la carga orgánica a 9 g DQO/L-d, manteniendo una producción estable de biogás de 2.8 L CH₄/L_{rx}-día (STP), un pH de 7.4 y un rendimiento estable de 0.3 L CH₄/g DQO (STP) por más de 15 días.

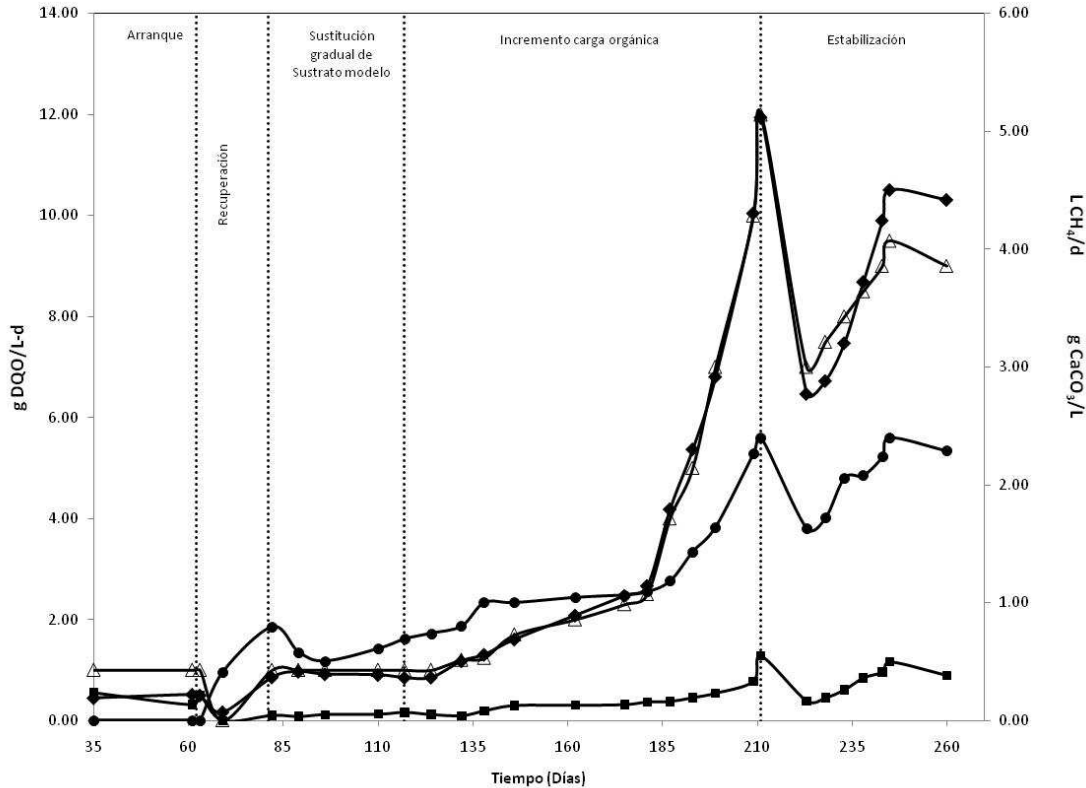


Figura 8.10. Fases operacionales del reactor; RAc, alimentado con hidrolizado ácido: metano producido (◆), alcalinidad (●), DQO entrada (Δ), DQO salida (■), SM: sustrato modelo

8.7.2. Reactor alimentado con hidrolizado enzimático (REnz)

La Figura 8.11 muestra las 4 fases operacionales aplicadas al reactor REnz. El reactor se operó por 164 días, en los cuales solo se presentaron 4 fases operacionales. Los primeros 80 días (fase de arranque) se alimentó con los sustratos modelo glucosa:xilosa (1:1 en base DQO) a una carga orgánica de 1.5 g DQO /L-d. Cabe resaltar que la fase de arranque fue mas larga, comparada con la del reactor ácido, debido a que las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática aún se estaban determinando. Así mismo, en esta ocasión se puso mucha atención en la cantidad de bicarbonato adicionado al reactor para no presentar un evento de acidificación semejante al presentado en el reactor RAc.

La siguiente fase operacional, donde se realizó la sustitución gradual de la carga orgánica por hidrolizado enzimático, ocurrió sin ningún problema. Esto quizás se debió a que en esta ocasión la capacidad amortiguadora del reactor fue la adecuada o la toxicidad del hidrolizado enzimático fue menor o nula, o a una

combinación de ambas. Adicionalmente, para el incremento gradual de la carga orgánica se siguió el método propuesto por Creson *et al.*, en el 2007, el cual consistió en aplicar un factor de incremento diario igual a 0.1 g DQO/d en los primeros 7 incrementos, 0.2 g DQO/d en los siguientes 9 incrementos, 0.3 g DQO/d en los siguientes 6 incrementos, 0.4 g DQO/d en los siguientes 3 incrementos, 0.5 g DQO/d en los siguientes 3 incrementos y finalmente 0.6 g DQO/d en los últimos 2 incrementos. Los incrementos se llevaron a cabo a lo largo de 30 días, partiendo de 1.5 g DQO/L-d hasta lograr una carga máxima establecida de 10 g DQO/L-d. Durante el desarrollo de esta fase no se apreció ningún problema sino hasta que empleando el mismo factor de incremento, por arriba del valor establecido con anterioridad (10 g DQO/L-d) se llegó hasta 11.3 g DQO/L-d. Al llegar a esta carga, surgieron los mismos problemas que en el reactor ácido, es decir, la cama de lodo comenzó a flotar obstruyendo las salidas de gas y desestabilizando el sistema, por lo que se optó por disminuir la carga orgánica a 10 g DQO/L-d (fase de estabilización).

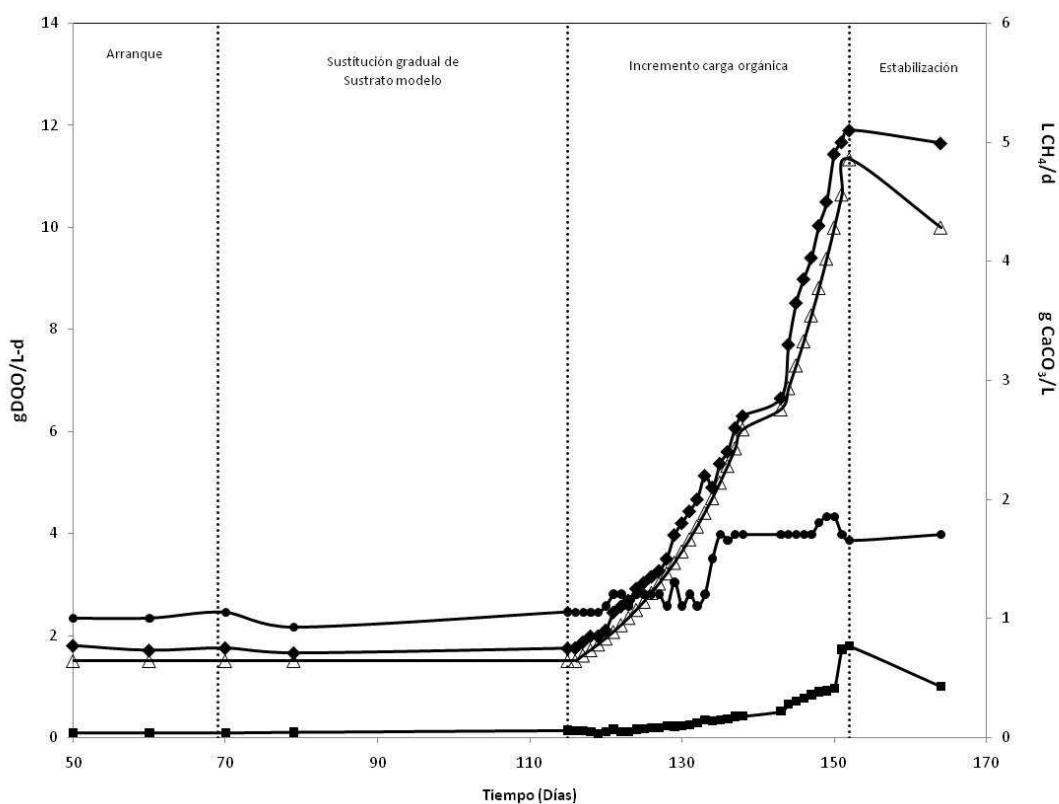


Figura 8.11. Fases operacionales del reactor, REnz, alimentado con hidrolizado enzimático: metano producido (♦), alcalinidad (●), DQO entrada (Δ), DQO salida (■), SM: sustrato modelo

La fase de estabilización se mantuvo por 12 días, en la cual la producción de metano fue de 3.1 L/L_{rx}-día (STP), el pH igual a 7.4 y el rendimiento se mantuvo estable en un valor de 0.3 L CH₄/g DQO (STP).

La Figura 8.12 muestra la comparación de los rendimientos en las diferentes fases operacionales en ambos reactores. Se observa que el reactor ácido alcanza un rendimiento máximo cercano a 0.3 L CH₄/g DQO (STP) con una carga 2.5 g DQO/d mientras que el reactor enzimático alcanza el mismo rendimiento a una carga de 8.8 g DQO/d. Los valores de los rendimientos en condiciones de presión y temperatura estándar (1 atm y 0°C) fueron cercanos al rendimiento máximo teórico.

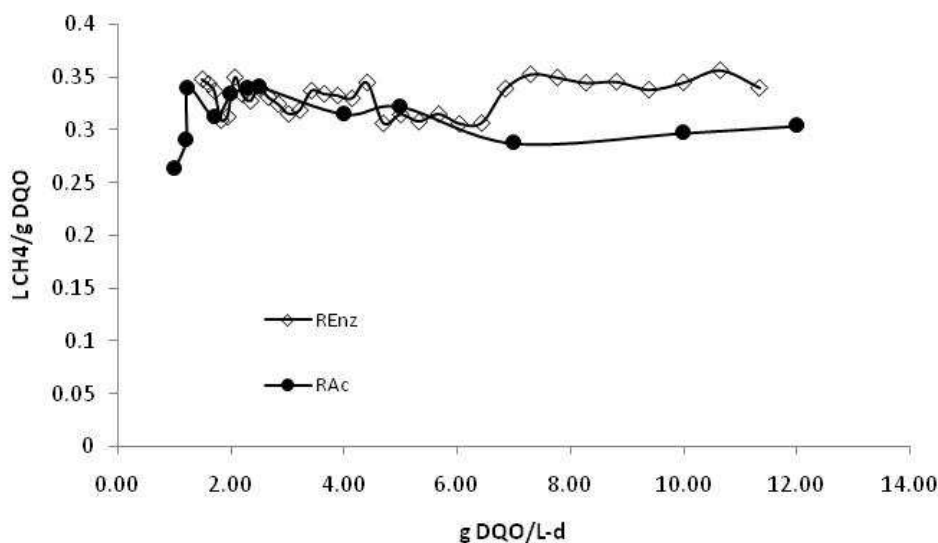


Figura 8.12. Comparación del rendimiento de la producción de metano en condiciones estándar de presión y temperatura (1 atm, 0°C) en los reactores durante la fase de incremento de carga

Las Figuras 8.13 y 8.14 muestran la concentración promedio de AGV (acético, propiónico, butírico) a lo largo de todas las fases operacionales, presentes en el efluente de ambos reactores. En general se pudieron apreciar valores menores a 160 mg/L de AGV durante la operación de ambos reactores.

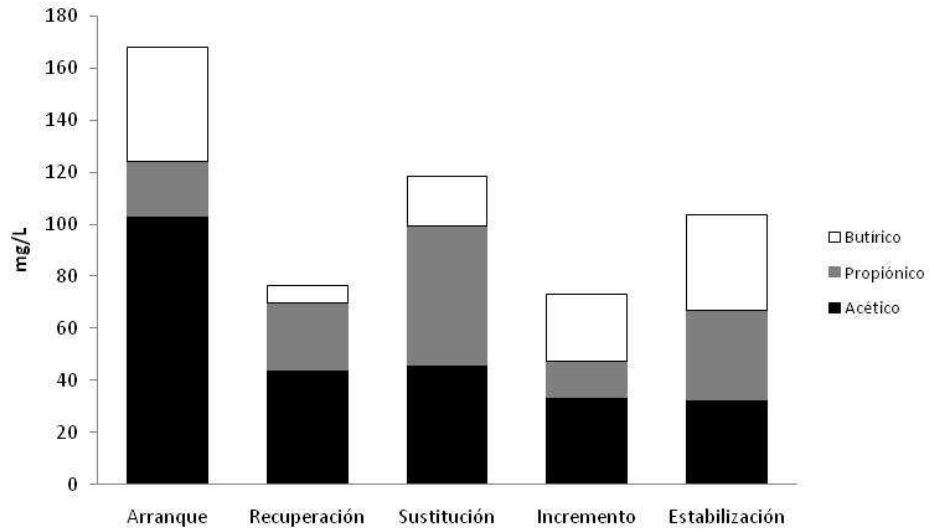


Figura 8.13 Concentración de AGV en el efluente del reactor alimentado con hidrolizado ácido

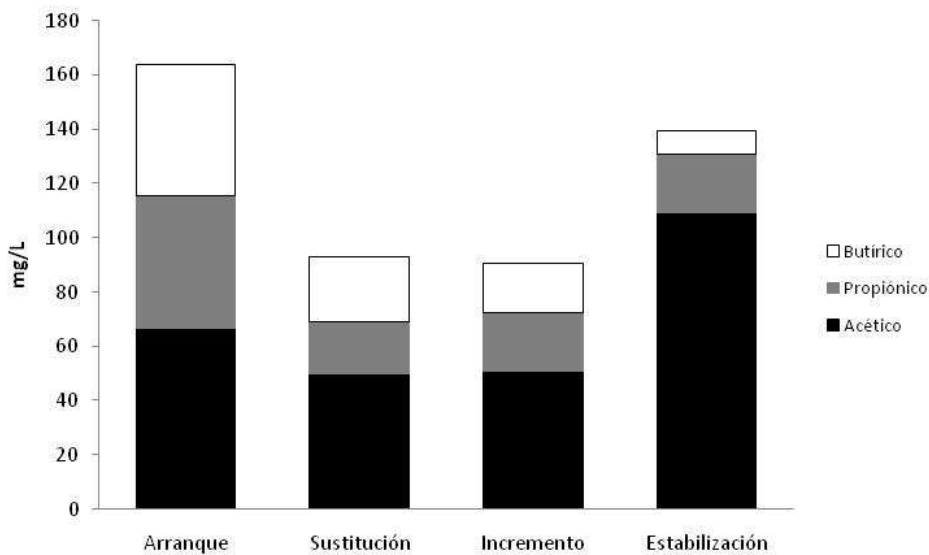


Figura 8.14 Concentración de AGV en el efluente del reactor alimentado con hidrolizado enzimático

8.8. Balance de DQO en los reactores

La Tabla 8.12 muestra el balance de DQO calculado en base a los compuestos cuantificados experimentalmente en cada fracción: los azúcares reductores presentes en ambos hidrolizados, el citrato presente tanto en el hidrolizado enzimático como en el efluente correspondiente, los AGV presentes en el efluente de ambos reactores y finalmente el CH₄ presente en el biogás. Para realizar el

balance se tomó como base de cálculo un día de operación. Se puede apreciar de la tabla que se tiene 5 y 20% de diferencia entre la DQO de entrada y la de salida de los reactores RAc y REnz respectivamente, debido a que no pudieron ser cuantificados en su totalidad los compuestos presentes en los hidrolizados así como en los efluentes correspondientes.

Tabla 8.12. Balance de DQO en los reactores

Reactor	Entrada			Salidas			
	Azúcares reductores (g DQO)	Citrato (g DQO)	g DQO Total	AGV (g DQO)	CH ₄ (g DQO)	Citrato (g DQO)	g DQO Total
RAc	9.4	0	9.4	0.2	8.7	0	8.9
REnz	6.8	2.3	9.1	0.1	10.2	1	11.3

La DQO para el citrato, metano y los AGV se calcularon considerando la estequiometría de la reacción de DQO para cada uno de ellos y la cantidad de dicho compuesto medidos en el afluente, el efluente o en el biogás. La DQO de los azúcares reductores fueron expresados como glucosa.

9. DISCUSIÓN

La hidrólisis ácida es el pretratamiento químico más utilizado en la sacarificación química de compuestos lignocelulósicos. Se ha reportado el uso de distintos ácidos a diferentes concentraciones y temperaturas. La Tabla 9.1 resume algunos ejemplos las condiciones bajo las cuales se llevan acabo hidrólisis ácidas de diversos residuos agrícolas.

Tabla 9.1. Parámetros operacionales reportados para la sacarificación ácida

Referencia	Sustrato	Condiciones de operación	Rendimiento de azúcares producidos
Saha y Bothast, 1999	Paja de maíz	H ₂ SO ₄ : 0.5%, 151°C, 1 h	286.5 mg AT/g residuo
Curreli <i>et al.</i> , 2002	Paja de sorgo	H ₂ SO ₄ : 2%, 90°C, 2h	400 mg AR/ g residuo
Chung <i>et al.</i> , 2005	Pasto	H ₂ SO ₄ : 1.2%, 180°C, 5 min	791 mg AT/g residuo
Cheng <i>et al.</i> , 2007	Bagazo de caña	H ₂ SO ₄ : 1.25%, 121°C, 2 h	635 mg AT/ g residuo

AR: azúcares reductores; AT: azúcares totales

La hidrólisis ácida de la paja de avena en el presente trabajo mostró un rendimiento de 419.5 mg AR/g residuo el cual se encuentra dentro de los valores reportados por Curreli *et al.*, 2002. Sin embargo, cabe recordar que no se cuantificaron en su totalidad todos los azúcares presentes mediante electroforesis capilar.

En cuanto a la hidrólisis enzimática, se han reportado condiciones de operación muy diversas. La Tabla 9.2 muestra algunos reportes de las diferentes condiciones empleadas para la hidrólisis, el tipo de sustratos utilizados y las tasas de producción de azúcares obtenidas. Las condiciones de reacción empleadas en nuestro caso (enzima: 0.9 mg/mL; sustrato: 40 g/L, pH: 4.5; temperatura: 45°C) son semejantes a las condiciones de reacción descritas en la Tabla 9.2. Sin embargo se puede apreciar la variabilidad que presentan las condiciones de operación y como esto se ve reflejado en sus tasas de producción. Por lo tanto, cabe resaltar la importancia de aplicar un método de optimización de dichas

condiciones para llevar a cabo una eficiente sacarificación enzimática del residuo particular estudiado.

Tabla 9.2. Condiciones de reacción reportados para la sacarificación enzimática

Referencia	Sustrato	Pre-tratamiento	Condiciones de reacción (fuente de enzima)	Concentración de sustrato y enzimas	Tasa de producción
Sakata <i>et al.</i> , 1985	Celulosa micro-cristalina	Ninguno	pH:4.8; temperatura: 40°C (<i>Trichoderma viride</i>)	Sustrato: 52.7 g/L (calculados como celobiosa); Enzima: 1 mg/mL	1.3 mg/mL-h (calculados como celobiosa)
Saha y Bothast, 1999	Paja de maíz	Químico	pH: 4.5, temperatura: 50°C (<i>Trichoderma reesei</i>)	Enzima: 1 mL/100g sustrato	3 mgAT/mL-h
Van Wyk <i>et al.</i> , 2000	Papel reciclado	Ninguno	pH: 4.5, temperatura: 50°C (<i>Trichoderma reesei</i>)	Sustrato: 20 g/L Enzima: 0.5 mg/mL	4.7 mgAR/mL-h
Curreli <i>et al.</i> , 2002	Paja de sorgo	Químicos	pH:5, temperatura: 40°C (<i>Trichoderma reesei</i>)	Sustrato: 75 g/L Enzima: 1 mg/mL	3 mgAR/mL-h
Chung <i>et al.</i> , 2005	Pasto	Químico	pH: 5, temperatura: 50°C (<i>Trichoderma reesei</i>)	Sustrato: 100 g/L (medidos como celulosa) Enzima: 15 FPU/g celulosa	1.0 mgAT/mL-h

AR: azúcares reductores; AT: azúcares totales

En los reportes antes mencionados, no se reporta un trabajo previo de optimización en las condiciones de operación para la hidrólisis enzimática. Krishna *et al.*, (2000) reportó la optimización de los parámetros enzimáticos utilizando caña de azúcar y diferentes compuestos celulósicos como sustratos modelo. Los ensayos se llevaron a cabo de forma analítica utilizando enzimas celulolíticas provenientes de una cepa mutada del hongo *Trichoderma reesei*. Las condiciones óptimas presentadas en su trabajo están dentro de las reportadas como óptimas en la literatura. Hasta donde se revisó la literatura, no se han utilizando métodos

factoriales y de superficie de respuesta para la optimización de hidrólisis enzimáticas.

El utilizar un modelo factorial complementado por un análisis de superficie de respuesta nos permitió definir valores inferiores o superiores a lo reportado en la literatura como es el caso de la concentración de enzima, sustrato y la temperatura. Es por esto que en la optimización se determinó una concentración de sustrato óptima de 80 g/L, superior a la reportada en otros trabajos. Sin embargo, el modelo predijo condiciones óptimas sin tomar en cuenta otros factores físicos que interfieren en el proceso. Un ejemplo de esto fue el hecho de que el residuo tratado tiene una capacidad higroscópica muy alta, formando una solución pastosa al utilizar concentraciones altas de sustrato (>80 g/L) lo cual dificultó su agitación. Se optó por utilizar solo la mitad del valor óptimo de concentración de sustrato (40 g/L). Esta concentración de sustrato, la cual estaba dentro de los valores reportados en la literatura (más cercana al valor reportado por Curreli *et al.*, 2007), nos permitió tener un rendimiento de producción de azúcares adecuado y una tasa de producción de azúcares de 2.4 mg AR/mL-h que es semejante a los valores mostrados en la Tabla 9.2.

Es importante remarcar el hecho de que la optimización de la hidrólisis enzimática se hizo en base a tres criterios: inicialmente se buscaron definir las condiciones para obtener la mayor tasa de producción (Figuras 8.2 y 8.3). Esto con la finalidad de obtener la concentración más alta de azúcares en el menor tiempo posible y con esto prevenir la degradación de la enzima durante el proceso de sacarificación. El segundo criterio fue obtener el mayor rendimiento de azúcares reductores por gramo de sustrato (Tabla 8.4). Esto con la finalidad de solubilizar la máxima cantidad de azúcares por gramo de sustrato. Finalmente, se busco utilizar la menor cantidad posible de enzima en la hidrólisis enzimática para ahorrar costos del proceso (Tabla 8.4; concentración de enzima).

La caracterización química de los hidrolizados ácido y enzimático, nos permitió determinar algunos de los diferentes compuestos presentes en ellos. En el caso de la hidrólisis ácida y de acuerdo a lo descrito por Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000), al ser éste un proceso químicamente complejo, se espera la formación de

diversos compuestos que incluyen ácidos grasos, furfural, hidroximetil-furfural y azúcares, entre otros. Sin embargo, no se lograron cuantificar en su totalidad todos los compuestos observados mediante electroforesis capilar al no contar con los estándares adecuados para la determinación de compuestos tales como el furfural, el hidroximetilfurfural, el ácido levulínico, compuestos fenólicos y algunos otros azúcares. En cuanto a la presencia de azúcares en el hidrolizado ácido y en concordancia con lo reportado por Nápoles *et al.*, (2006), Cheng *et al.*, y Vázquez *et al.*, (2007), se detectó mayoritariamente la presencia de glucosa y xilosa, seguido por la arabinosa y cantidades minoritarias de manosa y galactosa. En contraste, en la hidrólisis enzimática no ocurre la formación de diversos compuestos, como en la hidrólisis ácida, debido a que la hidrólisis enzimática es muy selectiva, produciéndose únicamente azúcares, disacáridos y probablemente algunos oligosacáridos aunque estos últimos no fueron cuantificados. En el hidrolizado enzimático nuevamente se determinaron a la glucosa y xilosa como azúcares mayoritarios. Cabe destacar que la presencia de xilosa en el hidrolizado pudo deberse a que la sacarificación enzimática además de la fracción de celulosa, hidrolizó parte de la hemicelulosa residual aun presente en el material sometido a hidrólisis enzimática.

En base a la concentración de azúcares obtenidos mediante electroforesis capilar (Tabla 8.5) y la estequiometría de la oxidación de éstos, se estimó que el 30% de la DQO total del hidrolizado correspondía a los azúcares cuantificados por electroforesis. Por otra parte en base a la concentración de azúcares reductores del hidrolizado (Tabla 8.5) se estimó que dichos azúcares correspondían al 90% de la DQO total. Esto indica que hubo un 60% de azúcares reductores no identificados. Este 60% probablemente corresponda a disacáridos y oligosacáridos subestimados como azúcares reductores. Una mejor estimación de estos di y oligosacáridos sería por medio de la determinación de azúcares totales. También se desconoce la concentración de compuestos inhibidores y de otros compuestos generados por la hidrólisis ácida, los cuales podrían corresponder al 10% remanente de la DQO total determinada en el hidrolizado.

Con respecto al hidrolizado enzimático, se estimó que 14% de la DQO total correspondía a azúcares cuantificados por electroforesis capilar (Tabla 8.5). De igual forma se estimó mediante el análisis de azúcares reductores que el 60.1% de la DQO total correspondería a los azúcares presentes en el hidrolizado (Tabla 8.5) indicando que hay un 46.1% de azúcares reductores no identificados. Este 46.1% probablemente corresponda también a disacáridos y oligosacáridos subestimados como azúcares reductores. Por otro lado, el citrato aportó una importante fracción de DQO biodegradable la cual se estimó cercana al 20% de la DQO total presente en el hidrolizado. Se desconoce la concentración de otros compuestos generados en la hidrólisis enzimática, principalmente restos de proteína enzimática, los cuales podrían corresponder al 19.9% remanente de la DQO total determinada en el hidrolizado.

La estimación del potencial de producción de metano a partir del residuo de paja de avena permite evaluar la cantidad de metano esperado por kilogramo de dicho residuo. Esta estimación se realizó en base a la cantidad de sólidos volátiles y de azúcares totales contenidos en ambos hidrolizados (ácido y enzimático). El factor de conversión de $\text{g SSV}_{\text{residuo}}/\text{g DQO}$ (0.689) se determinó experimentalmente. El factor de litros de $\text{CH}_4/\text{g DQO}$ fue el teórico (0.35) así como el factor de $\text{g azúcares totales}/\text{g DQO}$ (0.937). Los valores encontrados para dicho potencial fueron 164.3 y 76.1 LCH_4/Kg de residuo (STP) para el hidrolizado ácido y enzimático respectivamente, lo que corresponde a una producción total de 240.4 LCH_4/Kg de residuo (STP) ó 276.4 $\text{LCH}_4/\text{Kg SSV}_{\text{residuo}}$ (STP), los cuales están dentro de los rangos reportados por Angelidaki y Ellergaard (2003) para diferentes residuos agrícolas (pajas).

La determinación de la cantidad de cada una de las diferentes fracciones lignocelulósicas obtenidas después de cada hidrólisis (Tabla 8.7) nos permitieron determinar las eficiencias de solubilización o remoción de cada una de la fracción lignocelulósicas correspondiente a cada tratamiento (Tabla 8.8). El mayor porcentaje de remoción se observó en el tratamiento ácido al remover cerca del 85.3% de la hemicelulosa presente en la paja de avena y un 30.7 % de la celulosa, seguido del tratamiento enzimático con un porcentaje de remoción de celulosa del

68.6% y 34.9% de hemicelulosa residual. Finalmente mediante el tratamiento alcalino se removió el 51.3% de lignina y 34.9% de la hemicelulosa residual. Lo anterior indica que cada hidrólisis no es específica, ya que además de remover la fracción sobre la que principalmente debería actuar (ver Tabla 6.1 y Figura 6.1) también se observó una remoción considerable de las fracciones residuales en cada proceso.

La Tabla 9.3 muestra algunas eficiencias de remoción reportadas para cada una de las fracciones tratadas. En los datos reportados por Rodríguez *et al.*, (2005) se puede apreciar que al usar concentraciones altas de ácido sulfúrico se favorece la disponibilidad de la celulosa a tratamientos enzimáticos. Sin embargo, se ha reportado que al utilizar condiciones mas severas de hidrólisis ácida se favorece la formación de sub-productos inhibitorios (Gámez *et al.*, (2006) y Vázquez *et al.*, (2007)). Las eficiencias de remoción obtenidas en este trabajo (Tabla 8.8) son mayores para la hidrólisis ácida y la alcalina que las eficiencias reportadas en la Tabla 9.3. La eficiencia de remoción de la hidrólisis enzimática encontrada en este trabajo (Tabla 8.8) es menor que la reportada por Rodríguez *et al.*, (2005) pero mucho mayor que la reportada por Curreli *et al.*, (2002). Las eficiencias de remoción total para cada una de las fracciones lignocelulósicas fueron: hemicelulosa 96.3%, celulosa 77.4% y lignina 42.8%.

Tabla 9.3 Eficiencias de remoción reportadas de fracciones lignocelulósicas

Referencia	Sustrato	Condiciones tratamiento ácido (% remoción hemicelulosa)	Condiciones tratamiento alcalino (% remoción lignina)	Condiciones tratamiento enzimático (% remoción celulosa)
Curreli <i>et al.</i> , 2002	Paja de trigo	H ₂ SO ₄ 2%; 90°C; 2h (40-45%)	NaOH 1%; temperatura: ambiente; 48 h (11-31%)	pH:5; 40°C (N.D.)
Zhao <i>et al.</i> , 2008	Malezas	H ₂ SO ₄ 3%; 120°C; 2h (32%) (N.A)	NaOH 10%, 110°C; 2h (27.3%) (N.A.)	(N.D.)
Jing <i>et al.</i> , 2007	Cascarilla de chicharos			pH: 4.8; 50°C (10.9%)
Rodriguez <i>et al.</i> , 2005	Desechos municipales	H ₂ SO ₄ 72%; 30°C; 1h (N.D.)	(N.A.)	pH: 5.5; 50°C (80%)

N.D: no determinado; N.A: no aplica

Por último se realizó un balance de carbono para el proceso secuencial de hidrólisis (Tabla 8.9), en el que se aprecia una pérdida considerable de carbono después de la hidrólisis ácida. Esto probablemente es debido a la presencia de un material particulado muy fino generado en la hidrólisis ácida que se pierde por el poro de la manta cuando se filtra. No ocurre lo mismo en las otras hidrólisis al no generarse tanto material particulado.

La prueba de determinación de la actividad metanogénica nos permitió evaluar la calidad del inóculo en cuanto a su actividad para producir metano (ver Tabla 8.11), para su uso posterior en los reactores alimentados con los hidrolizados. La actividad metanogénica del inóculo empleado se encuentra en el intervalo de actividad reportada en la literatura $0.1 \text{ L CH}_4/\text{gSSV-d}$ (Gorris *et al.*, 1988).

La hidrólisis enzimática, al tener un mecanismo de acción específico sobre el sustrato no produce compuestos tóxicos semejantes a los producidos durante la hidrólisis ácida. Debido a lo anterior, solo se evaluó la toxicidad del hidrolizado ácido, sobre la actividad metanogénica del inóculo. Se pudo observar que a bajos porcentajes de hidrolizado (1-20% (v/v)) se presentó un porcentaje de inhibición de la actividad metanogénica de entre 20 a 50% a las pocas horas (Tabla 8.10). El porcentaje de inhibición fue incrementándose conforme aumentó la concentración del hidrolizado hasta alcanzar 57% de inhibición a un porcentaje de hidrolizado de 100% v/v. Debido a lo anterior, se esperaría que a un porcentaje alrededor del 20% de hidrolizado ácido en la alimentación no suscitaría problemas de inhibición de la actividad del reactor. Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000) y Almeida *et al.*, (2007) atribuyen esta inhibición a la presencia de compuestos tóxicos provenientes de la deshidratación de pentosas (furfural) y hexosas (HMF) además de ácidos grasos provenientes de la desacetilación de la hemicelulosa como son el ácido fórmico o el acético a concentraciones cercanas a 2000 ppm (Kalle y Menon, 1984) y del rompimiento del hidroximetil-furfural (ácido levulínico) o de los compuestos fenólicos provenientes de la ruptura de la lignina. Estos compuestos tienen diversos efectos tóxicos: destruyen la membrana celular, modifican rutas metabólicas (glucólisis), propician la acumulación de aniones en la célula, por lo que pueden provocar agotamiento del ATP, inhibición del crecimiento celular de

los microorganismos. Además alteran la estructura granular del lodo metanogénico (Skiadas *et al.*, 2003).

Durante los primeros días de operación (30-35) del reactor RAc se presentó un problema de acidificación debido a la poca capacidad amortiguadora (alcalinidad) que poseía el reactor (aproximadamente 400 mgCaCO₃/L). La alcalinidad en un reactor es muy importante, ya que es la que provee la capacidad de amortiguar cambios de pH y debe ser suficiente para evitar variaciones bruscas de pH que podrían provocar la acidificación del reactor, como por ejemplo en el caso de acumulación de AGV. Para solucionar el problema anterior se evaluaba de forma experimental la cantidad necesaria de bicarbonato de sodio para cada uno de los incrementos de carga orgánica de los reactores, que permitiera una capacidad de amortiguamiento adecuada evitando la acidificación del mismo. Se encontró que una alcalinidad de 2.3 gCaCO₃/L era adecuada para una carga orgánica de 9 g DQO/l-d bajo la cual el RAc operó en forma estable. Adicionalmente, el problema de acidificación del reactor RAc ocurrió al cambiar totalmente la alimentación de una mezcla de sustratos modelo al hidrolizado ácido. Esto se hizo ya que la sustitución total de los sustratos modelo por el hidrolizado ácido correspondía a una adición de 40 ml del hidrolizado por litro de alimentación. Esto equivalía a tener un 4% de hidrolizado en la alimentación, lo cual, de acuerdo a los datos de toxicidad (Tabla 8.10) correspondería a una 30-40% de inhibición. Sin embargo, este cambio abrupto provocó un efecto tóxico sobre la actividad metanogénica del reactor, lo cual originó una acumulación de AGV que combinada con la baja alcalinidad provocó el fallo del reactor. Para evitar esto se optó por sustituir gradualmente el porcentaje de hidrolizado ácido y sustrato modelo (en base DQO) permitiendo así la adaptación del inóculo a la presencia de los compuestos inhibidores dentro del hidrolizado. Se comenzó con una relación hidrolizado ácido: sustrato modelo de 1:9 (en base a DQO), correspondiente a una dilución cercana al 0.4% (equivalente a 4 mL de hidrolizado por litro de medio, aproximadamente) hasta llegar a la sustitución total de los sustratos modelo por hidrolizado ácido, evitándose así el efecto de inhibición mostrado con anterioridad. Esto demostró que la incorporación gradual del hidrolizado en la alimentación es una buena

alternativa para la adaptación del inóculo a los compuestos inhibitorios presentes en el hidrolizado ácido.

Hacia el final de la fase de incremento de carga orgánica (211 días) los gránulos de lodo aparentemente disminuyeron su capacidad de sedimentación, ya que la cama de lodo tendía a flotar. Existen varios factores que pueden influir sobre la capacidad de sedimentación de los gránulos del lodo. Entre los factores que se han reportado con mayor frecuencia se encuentran: la temperatura (Brito *et al.*, 1997), el pH y alcalinidad o capacidad de amortiguamiento de pH del reactor (McHugh *et al.*, 2003), variaciones bruscas en la concentración de la carga orgánica, concentraciones inhibitorias debido a la presencia de AGV (Kalle y Menon, 1984), el aumento en la concentración de cationes y aniones (Skiadas *et al.*, 2003), la presencia y acumulación de tóxicos presentes en la alimentación (Tiwari *et al.*, 2006), entre otros. En conjunto o por separado, estos factores provocan la inestabilidad en los gránulos y la consecuente inestabilidad del reactor debido a la pérdida de sedimentación adecuada de la cama de lodo.

Hasta ahora no se ha encontrado explicación a la pérdida de sedimentación de los gránulos en ambos reactores teniendo en cuenta que el pH estaba controlado, la concentración de AGV estaba por debajo de los límites máximos inhibitorios y que la presencia de cationes debido a la alcalinidad no estaban cerca de los valores máximos inhibitorios (5-10 gNa/L y mayor a 3 gCa/L (Skiadas *et al.*, 2003)).

El uso de un factor de incremento diario en la carga orgánica del reactor alimentado con hidrolizado enzimático nos permitió alcanzar valores altos de carga orgánica en tiempos más cortos manteniendo una eficiencia de remoción alta, similar a lo reportado por Creson *et al.*, (2007). Para el caso del reactor RAc se logró llegar a la carga orgánica máxima en 85 días, mientras que en el REnz se logró en 30 días.

Mediante un balance de DQO en los reactores (Tabla 8.12) se aprecia que existe una diferencia entre la DQO del afluente y el efluente igual a 5% en el reactor RAc. Aunque esta discrepancia es pequeña y podría indicar que el balance de DQO prácticamente cierra, cabe aclarar que debido a problemas metodológicos

los compuestos de tipo furfural y fenólicos formados durante la hidrólisis ácida no se cuantificaron ni en la entrada ni en la salida del reactor. Así mismo, los azúcares reductores medidos subestiman la concentración de azúcares disponibles para la producción de metano. Debido a lo anterior los balances de DQO mostrados en la Tabla 8.12 son aproximados. También se aprecia en la misma tabla, que para el caso del reactor REnz existe una diferencia del 24% entre la DQO de entrada y la de salida. Como en el caso anterior, la concentración de azúcares disponibles para la producción de metano esta subestimada y no se determinó la contribución de la enzima residual, empleada en la hidrólisis, a la DQO del afluente y efluente. A pesar de que los balances de DQO mostrados son aproximados, indican que una buena parte de la DQO consumida se convirtió en metano. La fracción de DQO subestimada, como azúcares reductores, quizás corresponde a la síntesis de biomasa.

No existen en la literatura trabajos con los que se puede hacer una comparación directa en cuanto a la producción de metano a partir de sustratos pretratados química y/o enzimáticamente. Antonopoulou *et al.*, (2008) evaluaron la producción de hidrógeno y metano utilizando paja de sorgo a la cual le realizaron un pretratamiento con agua a 30°C por una hora. De este modo obtuvieron un licor con una concentración de DQO de 18.5 g DQO/L la cual es una concentración mas baja comparada con las obtenidas mediante tratamientos químicos y enzimáticos (26 y 32 g DQO/L respectivamente). El licor obtenido fue alimentado a un reactor CSTR (por sus siglas en inglés *Continuous Stirred Tank Reactor*) acidogénico para la producción de hidrógeno y el efluente del mismo (principalmente AGV) fue alimentado posteriormente a otro reactor CSTR metanogénico, el cual mantenía las mismas condiciones operacionales en cuanto a TRH y temperatura que el reactor acidogénico, obteniendo porcentajes de remoción altos (cercaos al 90%) en el reactor metanogénico. Comparando el rendimiento mostrado en dicho reactor metanogénico (0.1 L CH₄/g DQO) y los obtenidos a condiciones estándar de temperatura y presión (STP) en los reactores RAc y REnz (0.3 L CH₄/g DQO para ambos reactores) se aprecia que a pesar de

tener una remoción cercana al 90%, los rendimientos reportados por Antonopoulou *et al.* (2008) son bajos.

Las Figuras 8.13 y 8.14 muestran la concentración de AGV presentes en los efluentes de ambos reactores a lo largo de las fases de operación más importantes. Se presentaron valores semejantes entre ambos reactores (entre 0.06 y 0.1 g/L). Estos valores están muy por debajo de las concentraciones inhibitorias reportadas que son cercanas a 2 g/L (Kalle y Menon, 1984)

10. CONCLUSIONES

Se observó que el rendimiento obtenido en los reactores fue semejante al rendimiento teórico calculado por estequiometría ($0.35 \text{ L CH}_4/\text{g DQO (STP)}$) para ambos reactores).

Así mismo, al comparar el rendimiento obtenido, pero en base a SSV ($0.5 \text{ L CH}_4/\text{gSSV (STP)}$), para ambos reactores, se encontró que fue más alto a los reportados en la literatura para la digestión anaerobia de otros tipos de pajas sin pretratamientos ($0.2\text{-}0.4 \text{ L CH}_4/\text{gSSV (STP)}$). Por lo tanto, los hidrolizados ácido y enzimático de la paja de avena permitieron una mayor eficiencia de conversión a biogás.

La sacarificación ácida fue un proceso eficiente de extracción de azúcares al solubilizar 85.3% de la hemicelulosa contenida en la paja de avena, además de solubilizar 30% de la celulosa. La sacarificación enzimática solubilizó 68.6% de la celulosa remanente después del tratamiento alcalino. El tratamiento alcalino solo solubilizó el 51.3% de la lignina.

Considerando en conjunto los tres tratamientos secuenciales de hidrólisis de paja de avena se encontró que las eficiencias de remoción totales fueron de 96.3%, 77.4% y 42.8% para hemicelulosa, celulosa y lignina, respectivamente.

Se logró la producción de metano en reactores UASB alimentados con hidrolizados ácidos o enzimáticos manteniendo cargas orgánicas altas (9 y 10 g DQO/L-d respectivamente) y porcentajes de remoción de DQO alrededor del 90% en ambos reactores. Debido a la alta remoción de DQO en ambos reactores, la concentración de AGV en el efluente fue baja y no se observó presencia de los azúcares identificados en el hidrolizado.

11. PERSPECTIVAS

Dentro de los aspectos a considerar en futuras investigaciones está la caracterización química completa que incluya la determinación de furfurales, compuestos fenólicos, enzima residual y azúcares totales permitiéndonos de esta manera realizar balances de carbono y DQO completos.

Con el objeto de optimizar aún más la sacarificación enzimática, se requiere el estudio de los aspectos hidrodinámicos del proceso de sacarificación que permitan el uso de una mayor concentración de sustrato manteniendo una agitación del medio de reacción adecuada. Esto es debido a que a mayor cantidad de sustrato la solución se hace viscosa provocando con esto una mala agitación en el sistema.

Mejorar la remoción de lignina incrementando con esto el porcentaje de hidrólisis enzimática de la celulosa. Esto puede llevarse a cabo por medio de la adición de enzimas como son lacasas y peroxidases; otra forma sería optimizar el método de hidrólisis alcalina optimizando las concentraciones de peróxido y compuesto alcalino (oxidación avanzada).

Aún falta optimizar el tiempo de retención hidráulico de los reactores. Así como analizar el efecto que tienen el ión sodio y el ión cloruro, en la pérdida de capacidad de sedimentación en los gránulos.

Por último, es necesario realizar un estudio de factibilidad económica de los procesos secuenciales de pretratamientos ácido y enzimático de la paja de avena comparándolos con la codigestión anaerobia de residuos semejantes. Esto último requiere de estudios a nivel piloto.

12. REFERENCIAS

1. Aguilar, R., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* **55**, 309–318.
2. Albores, S., Pianzola, M.J., Soubo, M., Cerdeiras, M.P. (2006). Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus spp* for its use as ruminant feed. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**, 215-220.
3. Almeida, J.R.M., Petersson, A., Hahn-Hägerdel, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**, 340-349.
4. American Public Health Association (APHA) (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21^a ed. Washington, D.C.
5. Angelidaki, I., Alves, M., Campos, L., Balzonella, D., Borzacconi, L. (2007). Anaerobic biodegradation, activity and inhibition (ABAI). *Institute os Environment and Resources*. Technical University of Denmark.
6. Angelidaki, I., Ellegaard, L. (2003). Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants: Status and future trends. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **109**, 95-105
7. Antonopoulou, G., Gavala, H., Skiadas, I. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology* **99**, 110-119.
8. Bagi, Z., Ács, N., Bálint, B., Harváth, L., Dobó, K., Perei, K.R., Rákhely, G., Kovács, L. (2007), Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbial Biotechnology* **76**, 473-482.
9. Bailey, M.J., Tähtiharju, J. (2003). Efficient cellulose production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer controlled feeding strategy. *Applied Microbiol and Biotechnology* **62**, 156-162.

10. Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J. (2006). Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **97**, 287-296.
11. Brito, A.G., Rodrigues, A.C., Melo, L.F. (1997). Granulation during the start-up of a UASB reactor used in the treatment of low strength wastewaters. *Biotechnology Letters* **19**, 363-367.
12. Carrasco, F., Roy, C. (1992). Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. *Wood Science Technology* **26**, 189–208.
13. Cheng, K., Cai, B., Zhang, J. (2008). Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal* **38**, 105-109
14. Chung, Y., Bakalinsky, A., Penner, M. (2005). Enzymatic saccharification and fermentation of xylose-optimized dilute acid-treated lignocellulosic. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**, 947-961.
15. Conner, A.H. (1984). Kinetic modelling of hardwood prehydrolysis. Part I: Xylan removal by water prehydrolysis. *Wood and Fiber Science* **16**, 268–277.
16. Cresson, R., Escudié, R., Steyer, J.P., Delgenès, J.P., Bernet, N. (2008). Competition between planktonic and fixed microorganism during the start-up of methanogenic biofilm reactors. *Water Research* **42**, 792-800.
17. Curreli, N., Agelli, M., Pisu, B. (2002). Complete an efficient enzymic hydrolysis of pretreatment wheat straw. *Process Biochemistry* **37**, 937-941.
18. Dague, R.R., McKinney, R.E., Pfeffer, J.T. (1966). Anaerobic activated sludge. *Journal of Water Pollution. Control Federation* **38**, 220-225.
19. Damude, H.G., Ferro, V., Whitters, S.G., Warren R.A.J. (1996). Substrate specificity of endoglucanase a from *Cellulomonas fimi*: fundamental difference between endoglucanases and exoglucanases from family 6. *Journal of Biochemistry* **315**, 467-472.
20. De Mes, T.Z.D., Stams, A.J.M., Reith, J.H.; Zeeman, G. (2003). *Biomethane and Biohydrogen*. Dutch Biological Hydrogen Foundation.

21. Dominik, A., Vladimir, V.Z., Wolfgang, H.S. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbial Biotechnology* **77**, 23-35.
22. Faaij, A. (2006). Modern biomass conversion technologies. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* **11**, 343-375.
23. Fan, Y., Zhang, Y., Zhang, S. (2006). Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology* **97**, 500-505.
24. Galbe, M., Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology* **108**, 41-65.
25. Gámez, S., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M., 2006. Hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid at autoclave pressure. *Journal of Food Engineering* **74**, 78–88.
26. García, C.G., Navarrete, T.A. (1999). *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
27. Golias, H., Dumsday, G.J., Stanley, G.A., Pamment, N. B. (2000). Characteristic of cellulase preparations affecting the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Biotechnology Letters* **22**, 617-621.
28. González, F.J., Molina, C.M. (2006). Estudio de los factores que afectan la hidrólisis enzimática y el proceso fermentativo para la producción de alcohol a partir de papa (*Solanum tuberosum*). *Ingeniería* **16**, 29-39.
29. Halsall, D.M., Gibson, A.H. (1986). Comparison of two *Cellulomonas* strains and their interaction with *Azospirillum brasiliense* in degradation of wheat straw and associated nitrogen fixation. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 855-861.
30. Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. **2**, 602-619.

31. Jing, D., Li, P., Xiang, X., Wang, L. (2007). Optimization of cellulose complex formulation for peashrub biomass hydrolysis. *Applied Microbiol Biotechnology* **75**, 793-800.
32. Kamm, J. (2004). A new class of plants for a biofuel feedstock energy crop. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113**, 55-70.
33. Kamm, B., Kamm, M. (2006). Biorefineries: Multi product processes. *Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology* **105**, 175-204.
34. Karakashev, D., Thomson, A.B., Angelidaki, I. (2007). Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnology Letters* **29**, 1005-1012.
35. Kerem, Z., Fiesem, D., Hadar, Y. (1992). Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1121-1127.
36. Keys, J.E., Van Soest, P.J., Young, E.P. (1969). Comparative study of the digestibility of forage cellulose and hemicellulose ruminants and nonruminants. *Journal of Animal Sciences* **29**, 11-15.
37. Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W. (1998). *Comprehensive cellulose chemistry Volume 1: Fundamentals and analytical methods*. WILEY-VCH, Weinheim, Alemania.
38. Kraemer, J.T., Bagley, D.M. (2005). Continuous fermentative hydrogen production using two-phase reactor system with recycles. *Environmental Sciences and Technology* **39**, 3819-3825.
39. Krishna, S.H., Rao, K.C., Babu, J.S., Reddy, D.S. (2000) Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioprocess Engineering* **22**, 467-470.
40. Kruger, N.J. (1996). *The Bradford method for protein quantitation. The protein protocols Handbook*. Human Press, Totowa, New Jersey.
41. Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35**, 377-391.

42. Launder, K. (2002). *Energy crops and their potential development in Michigan*. Michigan Biomass Energy Program. August 2002.
43. Liaw, E., Penner, M.H. (1990). Substrate-velocity relationships for the *Trichoderma viride* cellulase-catalyzed hydrolysis of cellulose. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2311-2318.
44. Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N. (1999). Substrate and enzyme characteristic that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress* **15**, 804.
45. McHugh, S., O'Reilly, C., Mahony, T., Colleron, E., O'Flaherty, V. (2003). Anaerobic granular sludge bioreactor technology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2**, 225-245.
46. Mette, H.T. (2005). Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbial Biotechnology* **68**, 508-606.
47. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.
48. Modig, T., Almeida, J.R.M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G. (2008). Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocelluloses hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering* **100**, 423-429.
49. Mtui, G., Nakamura, Y. (2005). Bioconversion of lignocellulosic waste from selected dumping sites in Dar es Salaam, Tanzania. *Biodegradation* **16**, 493-499.
50. Nápoles, A.I., Ortiz, Y., Viñals, M., Manganelly, E., Acosta, E. (2006). Purification of sugarcane bagasse hydrolysates using active charcoal and ion-exchange resins. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* **5**, 124-128.
51. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishes. New York, N.Y.
52. Nordmark, T.S., Bakalinsky, A., Penner, M.H. (2007). Measuring cellulase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136**, 131-139.
53. Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* **74**, 17-24

54. Parisi, F. (1989). Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. *Advances in Biochemistry Engineering* **38**, 53-87.
55. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Industrial Microbiology* **5**, 53-63.
56. Peters, D. (2007). Raw materials. *Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology* **105**, 1-30.
57. Philippidis, G.P., Smith, T.K., Wyman, C.E. (1993). Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 846-853.
58. Robinson, P. D. (1984). Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Biotechnology Letters* **6**, 119-121.
59. Rodríguez, C., Hiligsann, S., Ongena, M., Charlier, R., Thonart, P. (2005). Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation* **16**, 415- 422.
60. Rodríguez, S. G. (1999). *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
61. Saha, B. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology* **30**, 279-291.
62. Saha, B., Bothast, R. (1999). Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **76**, 65-77.
63. Sakata, M., Ooshima, H., Harano, Y. (1985). Effects of agitation on enzymatic saccharification of cellulose. *Biotechnology Letters* **7**, 689-694.
64. Sánchez Carrasco, I.N. (2007). *Producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas por vía fermentativa*. Tesis de maestría, División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), S.L.P., México.
65. Saucedo, C.G., Soto, C.O. (1999). *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

66. Skiadas, I.V., Gavala, H.N., Schidt, J.E., Ahring, B.K. (2003). Anaerobic granular sludge and biofilm reactors. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **82**, 35-67.
67. Sonakya, V., Raizada, N., Kalia, V.C. (2001). Microbial and enzymatic improvement of anaerobic digestion of waste biomass. *Biotechnology Letters* **23**, 1463-1466.
68. Svensson, L.M., Christensson, K., Bjömsson, L. (2005). Biogas production from crop residues on a farm-scale level: is it economically feasible under conditions in Sweden? *Bioprocess and Biosystems Engineering* **28**, 139-148.
69. Tang, G., Huang, J., Sun, Z., Tang, Q., Yan, C., Liu, G. (2008). Biohydrogen production from cattle wastewaters by enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentative temperature and pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106**, 80-87.
70. Tarvin, D., Buswell, A.M. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *Journal of American Chemistry Society* **56**, 1751-1775.
71. Tiwari, M.K., Guha, S., Harendraneth, C.S., Tripathi, S. (2006). Influence of extrinsic factors on granulation in UASB reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**, 145-154.
72. Van Haandel, A., Kato, M.T., Cavalcanti, P.F.F., Florencio L. (2006). Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **5**, 21-38.
73. Van Wyk, J.P.H., Mogale, M.A., Seseng, T.A. (2000). Saccharification of used paper with different cellulases. *Biotechnology Letters* **22**, 491-494.
74. Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A. (2007). Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresource Technology* **98**, 3053-3060.
75. Viñals-Verde, M., Maciel de Mancilha, I., Batista de Almeida e Silva, J., Napoles Solenar, A.I. (2006). Purificación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la obtención de xilitol. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* **5**, 129-134.

76. Visser, A., Beekman, I., Van der Zee, F., Stams, A.J.M.; Lettinga, G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentration. *Applied Microbiology Biotechnology* **40**, 549-556.
77. Wyman, C.E. (1999). Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Reviews Energy Environmental* **24**, 189-226.
78. Wyman, C.E., Decker, S.R., Himmel, M.E., Brady, J.W., Skopec, C.E., Viikari, L. (2005). *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. Marcel Dekker, Inc.
79. Xiao, W., Clarkson, W.W. (1997). Acid solubilization of lignin and bioconversion of treated newsprint to methane. *Biodegradation* **8**, 61-66.
80. Wise, D.L., Boyd, W.D., Blanchet, M.J., Remedios, E.C., Jenkins, B.M. (1981). In situ methane fermentation of combined agricultural residues. *Resources and Conservation* **6**, 275-294.
81. Zhao, X., Lihua, Z., Liu, D. (2008). Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. *Bioresource Technology* **99**, 3729-3736.

ANEXO A

Analysis of Variance for Glucose

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: pH	0.387604	1	0.387604	2.29	0.1544
B: Temperature	0.0009375	1	0.0009375	0.01	0.9419
C: Enzyme	2.5676	1	2.5676	15.15	0.0019
D: Substrate	2.2755	1	2.2755	13.42	0.0029
AA	0.557388	1	0.557388	3.29	0.0929
AB	0.0885063	1	0.0885063	0.52	0.4828
AC	0.0390062	1	0.0390062	0.23	0.6394
AD	0.237656	1	0.237656	1.40	0.2576
BB	0.204888	1	0.204888	1.21	0.2916
BC	0.0105063	1	0.0105063	0.06	0.8073
BD	0.0150062	1	0.0150062	0.09	0.7708
CC	0.297594	1	0.297594	1.76	0.2080
CD	0.142506	1	0.142506	0.84	0.3759
DD	0.0182878	1	0.0182878	0.11	0.7478
Total error	2.20383	13	0.169526		

Total (corr.)	9.35501	27			
---------------	---------	----	--	--	--

R-squared = 76.4422 persen

R-squared (adjusted for d.f.) = 51.0723 percent

Standard Error of Est. = 0.411735

Mean absolute error = 0.204613

Durbin-Watson statistic = 2.51207 (P=0.0125)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.293327