



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

HIDRÓLISIS DE BIOMASAS CELULÓSICAS EMPLEANDO FLUIDO RUMINAL PARA LA
GENERACIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
MARTÍN BARRAGÁN TRINIDAD

TUTOR PRINCIPAL
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. GABRIELA E. MOELLER CHÁVEZ, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO DE
MORELOS
DR. ARMANDO GONZÁLEZ SÁNCHEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. NOVIEMBRE DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Armando Sadajiko Shimada Miyasaka

Secretario: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez

1 er. Vocal: Dr. Jorge Arreola Vargas

2 do. Vocal: Dr. Armando González Sánchez

3 er. Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Unidad Académica Juriquilla-Querétaro, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA

Se agradece el financiamiento de este trabajo de investigación a los proyectos CEMIE-Bio Cluster Biocombustibles Gaseosos 247006 y SENER CONACYT-Fondo de Sustentabilidad Energética 249590, DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN101716).

Se agradece a CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos quienes han estado conmigo de forma incondicional tanto en los momentos gratos como en los momentos difíciles. En especial a mi madre, quien ha dejado incluso sus problemas a un lado con tal de atender los míos, que ha estado allí siempre para darme palabras de aliento.

A mi padre fallecido, quien me enseñó a luchar por nuestros sueños, a nunca darme por vencido y a servir siempre a los demás. Hasta donde te encuentres, recibe estas palabras.

A mis hermanos: Norma, Melesio, Isaac y Raziel, siempre estando al pendiente de lo que me pasa y siempre dispuestos a ayudarme cuando lo requerí. Norma, gracias por qué mucho de lo que he hecho y alcanzado ha sido gracias a ti.

A todo mi ejército de sobrinos, quienes con sus travesuras han hecho más amena y divertida mi vida. Siempre tratando de darles un buen ejemplo y que vean el estudio profesional como una oportunidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada que me ha permitido realizar mis estudios de doctorado en el periodo 2014-2018.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por confiar en mí para la realización de este proyecto. Por su tiempos y apoyo dedicados a la realización del proyecto de tesis, siempre promoviendo mi crecimiento académico y personal.

A los miembros de mi comité tutor Dra. Gabriela Moeller Chávez y Dr. Armando González Sánchez, por su tiempo y compromiso a la realización de este proyecto.

A los doctores Jorge Arreola Vargas y Armando Shimada Miyasaka, sus comentarios permitieron enriquecer la discusión del presente trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Julián Carrillo Reyes, fuiste un Maestro Jedi para mí.

Al Dr. Ricardo Basurto por apoyarnos con las muestra de contenido ruminal.

A los maestros Jaime Pérez Treviña y Gloria Moreno por la asesoría técnica, siempre dando solución a mis problemas; así como también por la amistad brindada.

A Jacob Espinoza y su familia, por fungir como mi familia en Querétaro, siempre estando al pendiente de mi situación.

A los compañeros y amigos del laboratorio, con quienes tuve muchas vivencias: Roberto, Eduardo, Rodolfo, Lupita, Darío, Eliane, Diana, Felipe, Jonathan, Oswaldo, Sebastián, Nata, Mota, René, Lorena, Caro del Norte y Sur, Marisol, Adán y tantas personas más que desfilaron por el LIPATA.

Un gusto haber compartido con ustedes mis estudios de doctorado, los recuerdo con mucho cariño y aprecio.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	F
ÍNDICE DE FIGURAS	G
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	K
ABSTRACT	M
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	3
PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO DE BIOMASAS CELULÓSICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS Y EL POTENCIAL USO DE MICROORGANISMOS RUMINALES.....	3
1.1. INTRODUCCIÓN	4
1.2. COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL Y BAGAZO DE AGAVE.....	5
1.3 HIDRÓLISIS DE BIOMASA MICROALGAL.....	6
1.3.1. Hidrólisis enzimática de microalgas	6
1.3.1.1. <i>Una sola enzima</i>	7
1.3.1.2. <i>Cocteles enzimáticos</i>	11
1.3.2. Cultivos hidrolíticos	13
1.3.2.1. <i>Cultivos hidrolíticos axénicos</i>	14
1.3.2.2. <i>Consortios bacterianos</i>	15
1.3.2.3. <i>Consideraciones al emplear un cultivo hidrolítico</i>	15
1.4. HIDRÓLISIS BIOLÓGICA DE BAGAZO DE AGAVE Y RECUPERACIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS	20
1.4.1. Bioprocesos consolidados (CBP).....	20
1.5. PERSPECTIVAS DEL RUMEN COMO UNA FUENTE DE UN CULTIVO HIDROLÍTICO DE BIOMASAS CELULÓSICAS.....	21
1.5.1. Actividades enzimáticas presentes en rumen	22
1.5.2. Aplicaciones potenciales de los microorganismos ruminales en la producción de biocombustibles a partir de biomاسas celulósicas	24
1.5.3. Mantenimiento de la actividad de un cultivo ruminal.....	26
1.5.3.1. Reactor en flujo continuo	26
1.5.3.2. Reactor continuo de doble flujo	26
1.5.3.3. Reactor anaerobio bifásico	28
1.5.3.4. Reactor anaerobio discontinuo secuencial (AnSBR, por sus siglas en inglés).....	28
1.6. CONCLUSIONES	28

CAPÍTULO 2	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
2.1. HIPÓTESIS.....	29
2.2. OBJETIVOS	29
2.2.1. Objetivo general.....	29
2.2.2. Objetivos específicos	29
CAPÍTULO 3	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
3.1.1. Montaje del reactor hidrolítico	30
3.1.2. Hidrólisis de microalgas en un sistema discontinuo secuencial	30
3.1.3. Hidrólisis de bagazo de agave	30
3.2. MATERIALES CELULÓSICOS EMPLEADOS, FLUIDO RUMINAL E INÓCULO PRODUCTOR DE HIDRÓGENO Y METANO	31
3.2.1. Consorcio nativo de microalgas	31
3.2.2. Bagazo de agave	31
3.2.3. Fluido ruminal	32
3.2.4. Lodo productor de hidrógeno y metano	32
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	32
3.3.1. Medio para el crecimiento de microorganismos ruminales	32
3.3.2. Medio productor de hidrógeno	32
3.4. SÓLIDOS TOTALES (ST), SÓLIDOS VOLÁTILES (SV), SÓLIDOS SUSPENDIDOS VOLÁTILES (SSV) (APHA ET AL., 2005)	32
3.4.1. ST y SV.....	33
3.4.2. SSV.....	33
3.5. HIDRÓLISIS DE MATERIALES CELULÓSICOS Y PRODUCTOS SOLUBLES.....	33
3.5.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Hach, 2008)	33
3.5.2. Cuantificación de azúcares totales y reductores.....	34
3.5.2.1. Azúcares totales (DuBois et al., 1956).....	34
3.5.2.2. Azúcares reductores (Miller, 1959).....	34
3.5.3. Determinación de proteína por el método de Lowry et al. (1951) modificado	34
3.5.4. Cuantificación de AGVs y solventes (etanol, butanol y acetona)	34
3.6. CUANTIFICACIÓN DE BIOGÁS.....	35
3.6.1. Composición del biogás.....	35
3.6.2. Cinética de producción de biogás	35
3.7. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA	35
3.8. CUANTIFICACIÓN DE CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA.....	36
3.8.1. Fibra Detergente Neutro (FDN)	36

3.8.2. Fibra Detergente Ácido (FDA)	36
3.8.3. Lignina Detergente Ácido (LDA)	36
3.8.4. Determinación de cenizas y lignina.....	37
3.8.5. Relaciones entre FDN, FDA y LDA.....	37
3.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS	37
3.9.1. Extracción y secuenciamiento de ADN	37
3.9.2. Análisis de los datos del secuenciamiento.....	38
3.9.3. Análisis de las OTUs identificadas.....	38
CAPITULO 4	39
HIDRÓLISIS DE BIOMASA MICROALGAL EMPLEANDO MICROORGANISMOS RUMINALES COMO UN PRETRATAMIENTO PARA INCREMENTAR LA RECUPERACIÓN DE METANO	
39	
4.1. INTRODUCCIÓN	40
4.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
4.2.1. Evaluación de la actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales	42
4.2.2. Diseño de experimentos	42
4.2.2.1. <i>Enriquecimiento de bacterias hidrolíticas ruminales</i>	42
4.2.2.2. <i>Efecto de la relación inicial sustrato a inóculo (S_0/X_0) sobre la producción de metano</i>	43
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.3.1. Actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales.....	43
4.3.2. Enriquecimiento de microorganismos ruminales empleando reactores discontinuos secuenciales	45
4.3.3. Efecto de la relación inicial S_0/X_0	47
4.3.4. Análisis de la comunidad microbiana.....	51
4.3.4.1. <i>Composición inicial de la comunidad bacteriana</i>	51
4.3.4.2. <i>Enriquecimiento de la comunidad bacteriana</i>	52
4.3.4.3. <i>Efecto de la relación S_0/X_0 sobre la comunidad bacteriana</i>	53
4.4. CONCLUSIONES.....	54
CAPITULO 5	56
HIDRÓLISIS DE BIOMASA MICROALGAL POR MICROORGANISMOS RUMINALES Y LA SUBSECUENTE PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS	
56	
5.1. INTRODUCCIÓN	57
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	59
5.2.2. Diseño de experimentos	59
5.2.2.1. <i>Hidrólisis semi-continua de biomasa microalgal</i>	59
5.2.2.2. <i>Ensayos de producción de hidrógeno</i>	60

5.2.2.3. Potencial bioquímico de metano.....	61
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.3.1 Hidrólisis semi-continúa de biomasa microalgal	61
5.3.1.1. <i>Recuperación de azúcares</i>	61
5.3.1.2. <i>Pretratamiento de biomasa microalgal y producción de AGVs</i>	63
5.3.2. Análisis de la comunidad bacteriana.....	65
5.3.2.1. <i>Bacterias hidrolíticas responsables de la solubilización de azúcares</i>	65
5.3.2.2. <i>Bacterias productoras de AGVs</i>	65
5.3.3. Recuperación de biocombustibles gaseosos.....	66
5.3.3.1 <i>Producción de hidrógeno</i>	66
5.3.3.2 <i>Producción de metano</i>	68
5.4. CONCLUSIONES.....	70
CAPITULO 6	72
PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL PARA MEJORAR LA RECUPERACIÓN DE METANO....	72
6.1. INTRODUCCIÓN	73
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	75
6.2.1. Fluido ruminal	75
6.2.2. Efecto de la relación inicial bagazo de agave a fluido ruminal (S_0/X_0) sobre la producción de metano.....	75
6.2.2.1. <i>Pretratamiento del bagazo de agave con fluido ruminal</i>	75
6.2.2.2. <i>Producción de metano</i>	76
6.2.3. Caracterización cinética de la degradación de bagazo de agave por microorganismos ruminales.	76
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	77
6.3.1. Efecto de la relación S/X sobre la solubilización de bagazo de agave .	77
6.3.1.1. <i>Producción de biogás durante el pretratamiento</i>	77
6.3.1.2. <i>Solubilización de bagazo de agave por fluido ruminal</i>	78
6.3.1.3. <i>Cinética de producción de AGVs</i>	81
6.3.2. Análisis de la comunidad microbiana.....	83
6.3.2.1. <i>Comunidad microbiana (bacterias, arqueas y hongos) nativa del bagazo de agave e inóculo</i>	83
6.3.2.2. <i>Efecto de la relación S_0/X_0 sobre la comunidad microbiana</i>	84
6.3.3. Recuperación de metano a partir de los hidrolizados	85
6.4. CONCLUSIONES.....	88
REFERENCIAS.....	91
PRODUCTOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	115
ARTÍCULOS EN REVISTAS INDIZADAS	115

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ESTUDIOS RELEVANTES SOBRE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE MICROALGAS	9
TABLA 2. ESTUDIOS RELEVANTES SOBRE LA LISIS DE MICROALGAS POR CULTIVOS HIDROLÍTICOS.....	17
TABLA 3. ESPECIES FRECUENTES ENCONTRADAS EN RUMEN (RUSSELL Y RYCHLIK, 2001)	23
TABLA 4. ACTIVIDADES HIDROLÍTICAS QUE PUEDEN ENCONTRARSE EN EL RUMEN PARA EL PRETRATAMIENTO DE MICROALGAS Y MICROORGANISMOS QUE LAS EXPRESAN.....	27
TABLA 5. COMPOSICIÓN DEL BAGAZO DE AGAVE.....	31
TABLA 6. DQO SOLUBLE OBTENIDA AL TERCER DÍA PARA LA PRIMERA Y TERCERA INOCULACIÓN CONSIDERADO DQO TOTAL Y LA DQO EQUIVALENTE PARA AZÚCARES Y AGVs	47
TABLA 7. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE Y PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PRODUCCIÓN DE METANO DE LA FRACCIÓN SOLUBLE OBTENIDA DURANTE EL PRETRATAMIENTO DE BIOMASA MICROALGAL CON FLUIDO RUMINAL	50
TABLA 8. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE HIDRÓGENO DE LA BIOMASA MICROALGAL PRETRATADA Y FRESCA (CON Y SIN PRETRATAMIENTO).	67
TABLA 9. ESTUDIOS RELEVANTES DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE MICROALGAS.....	69
TABLA 10. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PRODUCCIÓN DE METANO DE MICROALGA FRESCA Y PRETRATADA CON FLUIDO RUMINAL	70
TABLA 11. COMPOSICIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE AGAVE Y SUS FRACCIONES ANATÓMICAS (% EN PESO SECO) (LI ET AL., 2012)	73
TABLA 12. ESTUDIOS RELEVANTES SOBRE EL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE. 80	
TABLA 13. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE OBTENIDA DEL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL.	80
TABLA 14. RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE METANO A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL	86
TABLA 15. COMPARACIÓN MÚLTIPLE CON DE R_{MAX} Y M_{MAX} OBTENIDOS BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS EMPLEANDO LA PRUEBA DE TUKEY*	87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. A) MODELO DE ESPOROPOLENINAS PRESENTES EN LA PARED DEL POLEN DE ARABIDOPSIS THALIANA (MORANT ET AL., 2007) Y B) LIGNINA PRESENTE EN LA MADERA (ZAKZESKI ET AL., 2010). C) AMBAS MOLÉCULAS PRESENTAS DERIVADOS FENILPROPANOIDES.....	14
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN SIMPLIFICADA DE LA INTERACCIÓN ENTRE DEGRADADORES PRIMARIOS DE MATERIAL FIBROSO Y OTROS MIEMBROS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA RUMINAL PRESENTE EN RUMEN (FLINT ET AL., 2008).	22
FIGURA 3. ACTIVIDAD HIDROÍTCA DEL FLUIDO RUMINAL EN PRESENCIA DE BIOMASA MICROALGA (3.5 G SV L ⁻¹) USANDO 20%(V/V) DE FLUIDO RUMINAL COMO INÓCULO. 44	44
FIGURA 4. ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS RUMINALES POR CULTIVOS POR LOTE REPETIDO. SE EMPLEÓ 1% (V/V) DE RUMEN Y MICROALGAS A 3.5 G ST L ⁻¹ (A) Y 7 G ST L ⁻¹ (B).	46
FIGURA 5. EFECTO DE LA RELACIÓN INICIAL MICROALGA A FLUIDO RUMINAL SOBRE LA SOLUBILIZACIÓN DE DQO.....	48
FIGURA 6. EFECTO DE LA RELACIÓN S ₀ /X ₀ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO	50
FIGURA 7. MAPA DE CALOR DE LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA, A NIVEL DE CLASE, RESULTANTE DEL PROCESO ENRIQUECIMIENTO (A); I = INÓCULO; ALGA= CONTROL DE BIOMASA ALGAL; X = XILANO; CMC = CABOXIMETILCELULOSA; 3.5 Y 7 G ST L ⁻¹ DE BIOMASA ALGAL.(B) ENSAYOS A DISTINTAS RELACIONES S ₀ /X ₀ : 0.33, 0.5, 1 Y 2; ASÍ COMO LOS CONTROLES: I = INÓCULO; ALGA = CONTROL DE BIOMASA ALGAL; Y CR = CONTROL DE FLUIDO RUMINAL.....	55
FIGURA 8. HIDRÓLISIS SEMI-CONTINÚA DE UN CONSORCIO NATIVO DE MCIROALGAS: A) ACTIVIDAD CARBOHIDROLASA Y, B) EFICIENCIA DE HIDRÓLISIS Y SOLUBILIZACIÓN DE AZÚCARES.	63
FIGURA 9. ACLIMATACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS HIDROLÍTICOS PRESENTES EN FLUIDO RUMINAL DURANTE LA HIDRÓLSIS SEMI-CONTINÚA DE BIOMASA MICROALGAL.	64
FIGURA 10. MAPA DE CALOR COMPARATIVO (A NIVEL DE FILO) DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN EL INÓCULO (I), EN LA MICROALGAL Y LA SELECCIONADA DESPUÉS DEL PRETRATAMIENTO. 12 D Y 18 D, HACEN REFERENCIA AL TRH APLICADO.	66
FIGURA 11. PERFIL DE AGVs RESULTANTES DE LA FERMENTACIÓN OSCURA DE BIOMASA MICROALGAL CON Y SIN PRETRATAMIENTO.	68

-
- FIGURA 12.** POTENCIAL BIOQUÍMICO DE METANO DE UN CULTIVO NATIVO DE MICROALGA FRESCA Y PRETRATADA CON FLUIDO RUMINAL. LAS LÍNEAS CONTINUAS REPRESENTAN LOS AJUSTES AL MODELO MODIFICADO DE GOMPERTZ. 70
- FIGURA 13.** PRODUCCIÓN DE BIOGÁS DURANTE EL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO CON FLUIDO RUMINAL A DISTINTAS RELACIONES S_0/X_0 . CR= CONTROL CON FLUIDO RUMINAL. LAS LÍNEAS CONTINUAS CORRESPONDEN AL AJUSTE AL MÓDELO DE GOMPERTZ (CONTROL DE BAGAZO) Y AL MÓDELO DE PRIMER ORDEN (PARA LAS DISTINTAS RELACIONES S_0/X_0 ENSAYADAS). 78
- FIGURA 14.** SOLUBILIZACIÓN DE BAGAZO DE AGAVE POR MICROORGANISMOS RUMINALES. 79
- FIGURA 15.** PRODUCCIÓN DE AGVs A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL ($S_0/X_0= 0.33$) Y SU RELACIÓN CON OTROS PARÁMETROS: A) PRODUCCIÓN DE METANO Y, B) ACTIVIDAD CMCASA. 82
- FIGURA 16.** ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA SELECCIONADA, A NIVEL DE FILO, DURANTE EL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL SOLO SE MUESTRAN LOS PHYLUM CON ABUNDANCIA RELATIVA MAYOR A 1%. B = BAGAZO; I = INÓCULO..... 84
- FIGURA 17.** HONGOS SELECCIONADOS DURANTE EL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL. SE CONSIDERARON SOLO AQUELLOS CON UNA ABUNDANCIA RELATIVA MAYOR AL 1%. 85
- FIGURA 18.** VOLUMEN ACUMULADO DE METANO DE HIDROLIZADOS DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL A DISTINTAS RELACIONES S_0/X_0 86

ABREVIATURAS

λ	Tiempo de la fase de latencia antes de la producción exponencial de biogás (metano o hidrógeno)
16S rADN	Gen que codifica para el 16S Ácido ribonucleico ribosomal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGVs	Ácidos Grasos Volátiles
ANOVA	Análisis de Varianza
AnSBR	Reactor Anaerobio Discontinuo Secuencial
BES	Ácido 2-Bromoetano Sulfónico
CBP	Bioproceso consolidado
CH ₄	Metano
CMC	Carboximetilcelulosa
CMCasa	Actividad carboximetilcelulasa o endoglucanasa
CO ₂	Dióxido de carbono
CHEES	Solución de extracto crudo de enzimas hidrolíticas extracelulares
CR	Control de fluido ruminal
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DQOp	Demanda Química de Oxígeno particulada
DQOs	Demanda Química de Oxígeno soluble
FDA	Fibra Detergente Ácida
FDN	Fibra Detergente Neutra
FID	Detector de Ionización de Llama (Flame Ionization Detection)
H ₂	Hidrógeno molecular (gas)
I	Inóculo
LDA	Lignina Detergente Ácida
LiP	Lignina Peróxidasa

MLVSS	Concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles en el Licor de Mezclado
MnP	Manganeso Peróxidasa
M_{\max}	Máxima cantidad de metano o hidrógeno
ORP	Potencial de Oxido-Reducción
OTU	Unidad Taxonómica Operacional (Operational Taxonomic Unit)
PNA	Nanofibra de Poliacrilonitrilo
$q_{s\max}$	Tasa específica de consumo de sustrato máxima
R_{\max}	Tasa de producción específica de metano o hidrógeno
S_0/X_0	Relación inicial sustrato a inóculo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos Volátiles
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
TCD	Detector de Conductividad Térmica (Thermal, Conductivity Detector)
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
TRS	Tiempo de Retención de Sólidos
UI	Unidades Internacionales de actividad enzimática
Xe	Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente
Y_{H_2}, Y_{CH_4}	Rendimiento de metano o hidrógeno

RESUMEN

El rumen alberga una de las comunidades microbianas más activas en la degradación de material lignocelulósico conocidas en la naturaleza y considerado como el segundo con mayor capacidad hidrolítica solo después del presente en el tubo digestivo de termitas. En esta cavidad, bajo condiciones anaerobias, el material fibroso es degradado a biogás (metano y dióxido de carbono) y ácidos grasos volátiles (AGVs): acetato, propionato y butirato, como metabolitos principales. La presente tesis tuvo como objetivo estudiar la capacidad del fluido ruminal como pretratamiento tanto de biomasa microalgal como de bagazo de agave con miras a incrementar la recuperación de biocombustibles gaseosos (metano e hidrógeno) con respecto a la biomasa cruda. Ambos sustratos celulósicos (microalga y bagazo de agave) se caracterizan por tener paredes celulares a base de polímeros (celulosa, hemicelulosa, lignina, principalmente) que dificultan su degradabilidad en digestores anaerobios, lo que hace necesario realizar un pretratamiento de estos materiales.

La primera etapa consistió en determinar en lote la mejor relación biomasa microalgal a fluido ruminal iniciales (sustrato/inóculo, S_0/X_0) que permitiera maximizar la eficiencia de hidrólisis y la recuperación de metano en una etapa posterior. Se encontró que con una relación S_0/X_0 de 0.5 se obtiene la mayor eficiencia de hidrólisis y rendimiento de metano. Se evaluó la posibilidad de propagar y enriquecer los microorganismos hidrolíticos ruminales empleando cultivos en lote secuenciales. Se encontró que después de 3 ciclos la actividad hidrolítica, medida como solubilización de DQO, incrementó 1.55 veces. Una vez concluida ésta etapa se caracterizó la comunidad bacteriana por secuenciación masiva de alta eficiencia, encontrando que *Pseudomonas spp.* es la bacteria alguicida (capaz de llevar a cabo la ruptura de la pared celular de microalgas y posteriormente lisis celular) más abundante.

La segunda etapa consistió en el montaje de un reactor hidrolítico para llevar a cabo la hidrólisis de biomasa microalgal con el propósito de estudiar la estabilidad del sistema y optimizar el tiempo de retención hidráulico (TRH). Se operó un reactor discontinuo con un TRH de 2 días y empleando fluido ruminal como inóculo. Esto permitió conservar el 21% y 18% de la actividad endoglucanasa y xilanasa iniciales, respectivamente. Bajo estas condiciones, se obtuvo una eficiencia de hidrólisis del 24% y 16% de liberación de azúcares. Posteriormente, éste hidrolizado se sometió a fermentación oscura, recuperando 49 mL H_2 g ST^{-1} (1.7 veces más con respecto a la biomasa microalgal sin pretratamiento). En el mismo reactor, se varió el TRH a fin de maximizar la eficiencia de hidrólisis y generación de metano en una etapa posterior. Para este fin, se encontró que un TRH de 8 días permite solubilizar el 60% de la biomasa microalgal y obtener un hidrolizado rico en AGVs (hasta un 75% de la demanda química de oxígeno soluble). Al llevar a cabo la metanización de éste hidrolizado se recuperaron 285 mL CH_4 g-DQO⁻¹ (2.9 veces más con respecto a la

biomasa fresca). Los rendimientos de metano e hidrógeno son competitivos con respecto a lo reportado con pretratamientos químicos y enzimáticos. El reactor hidrolítico se mantuvo en operación en modo discontinuo secuencial por 51 días.

En la tercera y última etapa, se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis en lote de bagazo de agave (un residuo agroindustrial de alta importancia en México) empleando fluido ruminal para evaluar el efecto de la concentración de bagazo sobre la producción de metano. Los resultados sugieren que empleando una relación S_0/X_0 de 0.33 se obtiene mayor eficiencia de hidrólisis (60%); sin embargo, la mayor productividad ($470 \text{ mL CH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$) se logró con una relación de 2, estos resultados son semejantes a lo reportado por otros autores que emplean enzimas comerciales como pretratamiento. Durante los ensayos, se puso de manifiesto que la microbiota nativa del bagazo de agave, con alta dominancia de *Clostridium* y *Bacteroides*, es capaz de producir hidrógeno, lo cual podría aprovecharse para incrementar la recuperación de biocombustibles gaseosos en mira de una biorefinería. Considerando que éste es el primer reporte sobre la aplicación del fluido ruminal en el pretratamiento de bagazo de agave, aún faltan parámetros a optimizar, por lo que se sugieren estudios en continuo, discontinuo o lote alimentado para dicho propósito.

ABSTRACT

The rumen contains one of the most active microbial communities for the degradation of the lignocellulosic material known in nature and is considered as the second having hydrolytic capacity only after the one present in the gut of termites. In this cavity, under anaerobic environments, the fibrous material is degraded into biogas (methane and carbon dioxide) and volatile fatty acids (VFAs): acetate, propionate and butyrate, as main metabolites. The aim of this thesis was to study the capacity of the ruminal fluid as pretreatment of both microalgal biomass and agave bagasse in order to increase the recovery of gaseous biofuels (methane and hydrogen) with respect to raw biomass. Both cellulosic substrates (microalgae and agave bagasse) are characterized by having cell walls based on polymers (cellulose, hemicellulose, lignin, mainly) that hinder their degradability in anaerobic digesters, which makes it necessary to pretreat these materials.

The first stage was performed to determine in batch the best initial microalgal biomass to ruminal fluid ratio (substrate/inoculum, S_0/X_0) that would maximize the efficiency of hydrolysis and the recovery of methane at a later stage. It was found that with an S_0/X_0 ratio of 0.5, the highest hydrolysis efficiency and methane yield is obtained. The possibility of propagating and enriching the hydrolytic microorganisms using sequential batch cultures was evaluated. It was found that after 3 cycles the hydrolytic activity, measured as COD solubilization, increased 1.55 times. Once this stage was completed, the bacterial community was characterized by high-throughput sequencing, finding that *Pseudomonas spp.* is the most abundant algicidal bacteria (capable of carrying out the disruption of the microalgal cell wall and subsequently cell lysis).

The second stage was performed in the set up of a hydrolytic reactor to carry out the hydrolysis of microalgal biomass with the purpose of studying the stability of the system and optimizing the hydraulic retention time (HRT). A discontinuous reactor was operated, using the ruminal fluid as inoculum, with a HRT of 2 days. This allowed to conserve 21% and 18% of the initial endoglucanase and xylanase activity, respectively. Under these conditions, a hydrolysis efficiency of 24% and 16% sugar release was obtained. Subsequently, this hydrolyzed was submitted to dark fermentation, recovering 49 mL H_2 g TS^{-1} (1.7 times more with respect to the microalgal biomass without pretreatment). In the same reactor, TRH was varied in order to maximize hydrolysis efficiency and methane generation at a later stage. For this purpose, it was found that a HRT of 8 days allows to solubilize 60% of the microalgal biomass and obtain a hydrolyzed rich in VFAs (up to 75% of the soluble chemical oxygen demand). When the methanization of this hydrolyzed was carried out, 285 mL CH_4 g-COD⁻¹ were recovered (2.9 times more with respect to the raw biomass). The methane and hydrogen yields are competitive with those reported with chemical and enzymatic pretreatments. The hydrolytic reactor was maintained in sequential batch mode for 51 days.

In the third and final stage, batch hydrolysis tests of agave bagasse (an agroindustrial waste of high importance in Mexico) were carried out using ruminal fluid to evaluate the effect of bagasse concentration on methane production. The results suggest that using an S_0/X_0 ratio of 0.33, a higher efficiency of hydrolysis (60%) is obtained; however, the highest productivity was achieved with a ratio of 2, 470 mL CH₄ L⁻¹d⁻¹, these results are similar to that reported by other authors who use commercial enzymes as pretreatment. During the tests, it was revealed that the native microbiota of the agave bagasse, with a high dominance of *Clostridium* and *Bacteroides*, was capable of producing hydrogen, which could be used to increase the recovery of gaseous biofuels in view of a biorefinery. Considering that this is the first report on the application of ruminal fluid in the pretreatment of agave bagasse, there are still missing parameters to optimize, so continuous studies are suggested for this purpose.

INTRODUCCIÓN

La escasez de combustibles fósiles, el cambio climático y el deterioro medioambiental hacen necesaria la búsqueda, desarrollo e implementación de tecnologías más limpias en la obtención de energía (Demirbas, 2009; Koh y Ghazoul, 2008). La biomasa es una fuente de energía renovable que ha despertado interés debido a su fácil manejo, a diferencia de la energía solar y eólica; además de que puede actuar como sumidero de CO₂, como es el caso de organismos fotosintéticos (Demirbas, 2009). En este sentido, los biocombustibles obtenidos a partir de residuos lignocelulósicos y de biomasa microalgal, también llamados biocombustibles de segunda y tercera generación, respectivamente, han demostrado ser una opción para la obtención de biocombustibles de manera sostenida.

En la actualidad, las microalgas –conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares y multicelulares simples, procariotas o eucariotas (Li et al., 2008) - están generando un gran interés como fuente de biomasa debido a que presentan productividades más elevadas que los cultivos terrestres tradicionales, gracias a su mayor eficiencia fotosintética; no compiten con cultivos alimentarios por tierra arable; además, pueden ser cultivadas utilizando aguas residuales como fuente de nutrientes, contribuyendo así a su depuración (Ahmad et al., 2011; Chisti, 2007; Park et al., 2011). Por su parte, el bagazo de agave, un residuo lignocelulósico de gran importancia local y regional en México, contiene un alto contenido de polisacáridos (hasta el 70% en peso seco) que pueden ser aprovechados para recuperar biocombustibles gaseosos (Li et al., 2012), promoviendo así su revalorización.

El uso de microalgas para la producción de biodiesel es considerado por varios autores como una alternativa ventajosa. Sin embargo, evaluaciones de ciclo de vida recientes indican que el cultivo de microalgas y uso para la producción de biodiesel consume más energía de la que puede ser obtenida del proceso (Lardon et al., 2009). Por otro lado, la producción de bioetanol a partir de bagazo de agave ha despertado interés; no obstante, su producción se ve limitada debido a la incapacidad de muchas levaduras de consumir tanto pentosas como hexosas (Young et al., 2010). En este sentido la digestión anaerobia ha emergido como una alternativa atractiva para la producción de biocombustibles gaseosos (hidrógeno o metano).

La conversión directa de la biomasa microalgal en biometano o biohidrógeno, no requiere del costoso secado de la biomasa requerido en la producción de biodiesel (González-Fernández et al., 2012a), además, que los cultivos mixtos anaerobios son capaces de metabolizar tanto hexosas como pentosas (Young et al., 2010). Sin embargo, la presencia de polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) en la pared celular de ambos (microalga y bagazo de agave) dificultan su

degradación en biodigestores anaerobios, lo que obliga a llevar a cabo un pretratamiento de estos sustratos (González-Fernández et al., 2012a; Passos et al., 2014). Dentro de estos, los pretratamientos biológicos, que implican el uso de enzimas o cultivos hidrolíticos (puros o mixtos), presentan ciertas ventajas: menor requerimiento energético, no requieren el uso de químicos corrosivos, se llevan a cabo en condiciones suaves de reacción y no hay generación de compuestos inhibitorios (Carrillo-Reyes et al., 2016; Demuez et al., 2015).

Los pretratamientos enzimáticos han sido ampliamente estudiados y su uso mejora significativamente los rendimientos de metano (Ciudad et al., 2014; Mahdy et al., 2016, 2014b), pero su aplicación a gran escala se ve limitada por el alto costo de las enzimas comerciales así como la incapacidad de poder reutilizarlas, despertando así el interés de los cultivos hidrolíticos (He et al., 2016; Muñoz et al., 2014). En este contexto, los cultivos hidrolíticos mixtos son más aptos desde el punto de vista energético, dado que no requieren previa esterilización del sustrato, un proceso con alta demanda energética; aunado a esto, en general estos sistemas presentan mayor estabilidad operacional (Carrillo-Reyes et al., 2016). En la naturaleza hay caracterizados varios cultivos mixtos con altas capacidades hidrolíticas, encontrando en el rumen uno de los consorcios microbianos más versátiles.

El rumen es la primera cavidad del tubo digestivo de los rumiantes y se encuentra habitado por una de las comunidades microbianas más activas en la degradación de material fibroso (Bayané y Guiot, 2011; Van Soest, 1994). En este proceso, anaerobio, bacterias, protozoarios, hongos y arqueas transforman el material lignocelulósico en ácidos grasos de cadena corta y biogás (22-29% metano y 65-69% CO₂) (Bayané y Guiot, 2011; Henderson et al., 2015; Seshadri et al., 2018), como metabolitos principales. Estudios recientes, han empleado el fluido ruminal para la conversión directa de biomasa microalgal en metano; sin embargo, la carencia de arqueas metanógenas acetoclásticas en el rumen (Bayané y Guiot, 2011; Van Soest, 1994) sugiere desacoplar el proceso en dos etapas: un pretratamiento empleando fluido ruminal como inóculo y la posterior recuperación de metano o hidrógeno.

Dada la similitud estructural de las paredes celulares (compuestas de complejos celulósicos) de las microalgas y el bagazo de agave y, asumiendo que la hidrólisis de estos polisacáridos es la etapa limitante en la conversión de estos materiales en biogás (hidrógeno o metano), se plantea el uso de microorganismos ruminales como una alternativa novedosa para el pretratamiento de estos sustratos. En este sentido, es necesario evaluar condiciones de proceso (tiempo de retención hidráulico, relación inicial sustrato a inóculo) para maximizar la producción de biocombustibles gaseosos.

CAPÍTULO 1

PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO DE BIOMASAS CELULÓSICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS Y EL POTENCIAL USO DE MICROORGANISMOS RUMINALES

Resumen

Los pretratamientos rompen los biopolímeros complejos presentes en la pared celular de biomasa celulósica, un proceso clave en la producción de biocombustibles gaseosos (metano o hidrógeno) a partir de microalgas y bagazo de agave. Los pretratamientos biológicos implican la degradación de la célula por enzimas purificadas; cócteles enzimáticos o por microorganismos con actividades enzimáticas capaces de hidrolizar la pared celular de biomasa celulósica. Esta revisión presenta resultados relevantes acerca de estos métodos que son menos demandantes energéticamente y, en algunos casos, más específicos que otras estrategias, tales como los pretratamientos químicos o físicos. Los pretratamientos enzimáticos son específicos y eficientes; en este sentido las enzimas con actividad celulasas, hemicelulasas, pectinasas, proteasas y amilasas son más exploradas. Para el pretratamiento de biomasa celulósica, los cócteles enzimáticos son más efectivos que una enzima sola, además es más factible obtener un extracto enzimático de uno o más microorganismos hidrolíticos que sus enzimas purificadas. En este capítulo se discute también el uso potencial de cultivos hidrolíticos para llevar a cabo la ruptura celular de biopolímeros complejos. Su uso es menos específico que los extractos enzimáticos, pero más económico. Se ha observado que los cultivos puros de bacterias hidrolíticas, muchos de los cuales tienen actividades carbohidrolasas, han incrementado la eficiencia en la conversión de biocombustibles a partir de microalgas y biomasa lignocelulósica. El uso de consorcios microbianos naturales con actividad hidrolítica, tales como los microorganismos ruminales, representan un potencial pretratamiento para las biomasa celulósicas. En esta revisión bibliográfica, se describen las actividades hidrolíticas comunes y son comparadas, y se discute el uso de microorganismos ruminales como una estrategia para la ruptura de la pared celular. Entender las condiciones operacionales aplicadas a un consorcio natural, como los microorganismos ruminales, favorecerá un sistema adecuado para la ruptura celular de microalgas y bagazo de agave que puede aumentar la recuperación biológica de hidrógeno y metano a partir de estas biomasa.

Este capítulo está basado en la siguiente publicación:

Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M., Buitrón, G., 2016. Biological pretreatments of microalgal biomass for gaseous biofuel production and the potential use of rumen microorganisms: A review. *Algal Res.* 18, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.004>

1.1. Introducción

Los biocombustibles derivados de biomásas celulósicas (microalgas y residuos lignocelulósicos), es decir de segunda y tercera generación, tienen algunas ventajas respecto a los de primera generación, ya que este tipo de biomásas no compiten con los cultivos alimentarios, tienen altas tasas de crecimiento, pueden emplearse suelos áridos o semiáridos para su crecimiento y requieren menos agua para su cultivo; incluso puede usarse agua residual (Li et al., 2008; Sims et al., 2010). Dentro de las biomásas lignocelulósicas, el bagazo de agave ha despertado gran interés debido a su elevado contenido de azúcares, altos volúmenes de producción como desperdicio y solo una pequeña porción se usa para preparar composta (Palomo-Briones et al., 2017).

La producción de biodiesel a partir de biomasa algal despertó gran interés; sin embargo, los procesos de cosecha y secado de microalgas ricas en lípidos son muy demandantes energéticamente, comprometiendo la eficiencia de producción de biodiesel derivado de microalgas (Wiley et al., 2011). Además de la producción de biodiesel, se han desarrollado estrategias para producción de otros biocombustibles, como el biogás, bioetanol y biohidrógeno, a través de la fermentación de biomasa algal y lignocelulósica (Davis et al., 2011; González-Fernández et al., 2012a; John et al., 2011; Lakaniemi et al., 2013; Palomo-Briones et al., 2017). La aplicación de estas tecnologías a gran escala depende de la optimización de los procesos de producción de biomásas celulósicas, cosechado y del proceso downstream. Una etapa limitante en el proceso downstream (procesos de separación y purificación) para la utilización de biomásas celulósicas es la liberación de biomoléculas de alto valor, tales como los carbohidratos que podrían emplearse en la producción de biocombustibles a través de la fermentación.

La importancia del pretratamiento de algas y bagazo de agave para la producción de biocombustibles ha sido revisada para la producción de bioetanol y metano (Harun et al., 2014; Palomo-Briones et al., 2017; Passos et al., 2014); así como desde un enfoque de biorefinería a partir de microalgas (Günerken et al., 2015). El propósito del pretratamiento es la ruptura de la pared celular con el propósito de mejorar la disponibilidad de las biomoléculas que constituyen estas biomásas celulósicas. Los pretratamientos son clasificados como biológicos, mecánicos o químicos, en base a la fuerza aplicada y al consumo de energía durante el proceso. Los pretratamientos biológicos se refieren a la degradación de la célula por enzimas purificadas, cocteles enzimáticos (ya sea como una mezcla de enzimas purificadas o como un extracto producido por microorganismos hidrolíticos), y al uso de cultivos de microorganismos con actividad hidrolítica en contacto directo con la microalga. En cuanto al consumo de energía, los pretratamientos químicos y enzimáticos no son muy demandantes y son selectivos en la recuperación de productos, esto tiene un impacto positivo en las etapas del proceso downstream. Sin embargo, los pretratamientos biológicos toman mayor tiempo que los mecánicos, y los químicos

y enzimáticos son costosos. Algunas aplicaciones del tratamiento enzimático para llevar a cabo la ruptura celular de bacterias y levaduras han sido demostradas en medicina, agricultura e industria de los alimentos (Salazar y Asenjo, 2007), sugiriendo su posible aplicación en la recuperación de bioproductos procedentes de microalgas. Los principales obstáculos asociados al uso de enzimas son los altos costos de producción, la alta especificidad al enzima-sustrato, y la gran diversidad en la composición y estructura de la pared celular presente en las biomásas celulósicas (Bohutskyi y Bouwer, 2013).

Por otro lado, la ruptura directa de la pared celular de microalgas por microorganismos hidrolíticos como un pretratamiento ha sido reportada para diferentes propósitos, tales como la producción de hidrógeno (Carver et al., 2011; Kim et al., 2006), metano (Lü et al., 2013; Muñoz et al., 2014), bioetanol (Jang et al., 2012) y biodiesel (Chen et al., 2013); mientras que para bagazo de agave aún no hay estudios con este enfoque, empleando cultivos hidrolíticos. El uso de bacterias hidrolíticas puede ser menos caro que usar enzimas purificadas; sin embargo, la recuperación de un producto específico puede verse comprometida. En este sentido, el uso de cepas o consorcios hidrolíticos es lo más cercano a los bioprocesos consolidados (CBP, por sus siglas en inglés), los cuales han sido detallados para materiales lignocelulósicos; en resumen, se puede llevar a cabo en mismo reactor la hidrólisis, sacarificación y fermentación (Yamada et al., 2013). La presente revisión compara los rendimientos de diferentes pretratamientos biológicos para la ruptura celular de microalgas y bagazo de agave, enfatizando en uso de potencial de consorcios naturales – como los microorganismos ruminales – con capacidad hidrolítica y de sacarificación.

1.2. Composición de la biomasa microalgal y bagazo de agave

Las microalgas están compuestas principalmente por carbohidratos (4-64%), proteínas (6-61%) y lípidos (2-40%) (Demirbas, 2010). Algunas especies acumulan carbohidratos en lugar de lípidos lo que las hace más atractivas para la recuperación de biocombustibles (Uggetti et al., 2014). Sin embargo, la composición de la biomasa microalgal puede variar según las condiciones medioambientales, afectando la producción de las diferentes macromoléculas (González-Fernández et al., 2012a).

Una de las características más excepcionales de la biomasa microalgal es la presencia de una pared celular compleja, dinámica y rica en polisacáridos (Popper y Tuohy, 2010). Ésta matriz extracelular proporciona protección física y microbiana a la célula y ayuda a la adhesión célula-célula en algunos casos. Entre algunas clases diferentes de algas verdes (Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Ulvophyceae), la estructura de la pared celular difiere en su composición. Sin embargo, un componente común es la celulosa, semejante a lo que ocurre en plantas superiores; también contienen típicamente otros polisacáridos tales como la

pectina y hemicelulosa (Domozych et al., 2012). Además, la presencia de algunos biopolímeros tales como la esporopoleninas y algeanos ofrecen una resistencia extra a la célula algal. La composición de las esporopoleninas no ha sido del todo comprendida debido inusual estabilidad química y resistencia a la degradación química. Los análisis revelan una mezcla de biopolímeros, principalmente ácidos grasos de cadena larga, fenilpropanoides, compuestos fenólicos y carotenoides (Leeuw et al., 2005). Los algeanos han sido caracterizados como macromoléculas alifáticas en las que los principales constituyentes descritos son ácidos grasos C30-34 mono o di-insaturados ω -hidroxilados, que se unen mediante una combinación de enlaces éter y éster (derivados del ácido triacontanoico y tetratriacontanoico). Ésta composición crea una estructura fuerte y recalcitrante que es similar a la cutina y carente de carotenoides, la cual se ha reportado que es resistente a ácidos, álcalis, enzimas y detergentes (Blokker et al., 1998; Leeuw et al., 2005).

Por su parte, el bagazo de agave es el residuo lignocelulósico obtenido después de haber llevado a cabo la extracción del jugo de las piñas de *Agave tequilana*. Este residuo representa hasta el 40% del agave procesado y está constituido por 3 fracciones principales: celulosa (31-43%), hemicelulosa (11-22%) y lignina (11-20%) (Arreola-Vargas et al., 2016, 2015; Caspeta et al., 2014; Saucedo-Luna et al., 2011). Además de otros compuestos que pueden estar presentes en bajas concentraciones, por ejemplo: pectina, proteínas, almidón, entre otros (Palomo-Briones et al., 2017). La lignina es un biopolímero (formado por monómeros fenilpropanoides) que junto con la hemicelulosa forman una matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa, protegiendo a la celulosa y otros polisacáridos estructurales del ataque biológico (Palomo-Briones et al., 2017), presentando actividad antimicrobiana y antifúngica (Doherty et al., 2011). En este sentido la presencia de estos biopolímeros obliga a realizar un pretratamiento previo a la recuperación de biocombustibles.

Las características antes mencionadas hacen a las microalgas y bagazo de agaves resistentes a las duras condiciones ambientales y a la recuperación de energía por procesos de fermentación y digestión anaerobia. En este sentido, es necesario un pretratamiento de estas biomásas celulósicas para romper, liberar y solubilizar los principales componentes de estos sustratos (Passos et al., 2014). Ésta etapa es el cuello de botella que determina la eficiencia de los procesos posteriores.

1.3 Hidrólisis de biomasa microalgal

1.3.1. Hidrólisis enzimática de microalgas

Los pretratamientos biológicos consisten en el uso de enzimas y/o microorganismos para llevar a cabo la hidrólisis de biomásas celulósicas. De las enzimas más explotadas para éstos fines se encuentran enzimas con actividad celulasa, hemicelulasa, pectinasa, proteasa y amilasa (Ehimen et al., 2013); siendo las

enzimas hidrolíticas provenientes de hongos las más empleadas para estos estudios debido a su fácil extracción y purificación (Dashtban et al., 2009). Las celulasas, engloban un conjunto de enzimas que hidrolizan la estructura cristalina de la celulosa a pequeños oligosacáridos y posteriormente a glucosa; constan de al menos 3 componentes enzimáticos principales: 1) endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que hidroliza al azar enlaces glicosídicos en regiones amorfas de la celulosa, lo que conlleva a una reducción en la longitud de la cadena y generación de extremos reductores, 2) celobiohidrolasas o exoglucanasas (EC 3.2.1.74) que actúa tanto en extremos reductores como en los no reductores, liberando glucosa o celobiosa, 3) β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa u oligosacáridos en glucosa (Goyal et al., 1991; Lynd et al., 2002). La celulasa de *Trichoderma reesei* un hongo de la podredumbre blanca- la enzima más empleada, debido a que la actividad enzimática de ésta celulasa es una de las más alta reportada para microorganismos silvestres; además, éste hongo tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa y lignina. Otra enzima comercial con actividad celulasa empleada para llevar a cabo la lisis de la pared celular de microalgas y biomasas lignocelulósicas, es aquella producida por *Aspergillus niger* (Dashtban et al., 2009; Shrestha et al., 2015).

La hidrolisis enzimática de microalgas tuvo sus orígenes en la década de los 70 con el propósito de obtener proto o esferoplastos de *Chlorella*, que pudieran emplearse posteriormente para transformaciones genéticas. Braun y Aach (1975), incubaron cepas de *C. saccharophila* y *C. ellipsoidea* en una mezcla enzimática conteniendo celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Ellos obtuvieron hasta un 80% de esferoplastos del cultivo de *C. saccharophila* al incubarse 90 horas con la mezcla de enzimas; no obstante, solo obtuvieron el 20% de esferoplastos bajo las mismas condiciones para *C. ellipsoidea*. Recientemente, ha tenido un gran auge estudios de lisis enzimática de microalgas con el objetivo de mejorar la producción de biocombustibles. En la Tabla 1 se resumen las condiciones de operación empleadas en algunas investigaciones relevantes para el pretratamiento enzimático de microalgas usando una sola enzima o cocteles enzimáticos.

1.3.1.1. Una sola enzima

La digestión de la pared celular de microalgas ha sido objeto de estudio con el propósito de mejorar la extracción de lípidos de las mismas para la obtención de biodiesel. Zheng et al. (2011), estudiaron el efecto de 2 enzimas puras (lisozima y celulasa) sobre la extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris*. Ellos encontraron ligera mejora en la extracción de lípidos: 1.3 y 1.2 veces en comparación con la biomasa control cuando se usaron celulasas y lisozima. Más recientemente Surendhiran y Vijay (2014), realizaron ensayos de lisis enzimática de *Nannochloropsis gaditana* basada en celulasas, una microalga cuya pared celular contiene aproximadamente 75% de celulosa (Scholz et al., 2014). Después de 12 horas de incubación se logró una eficiencia de extracción de lípidos del 32.74% y

51.68 % para cultivos ricos en nitrógeno y para aquellos deficientes en dicho nutriente, respectivamente (Surendhiran y Vijay, 2014). Con el propósito de reutilizar las enzimas empleadas durante la lisis celular y minimizar costos Fu et al., (Fu et al., 2010) propusieron inmovilizar celulasa sobre membranas hechas de nanofibra de poliacrilonitrilo (PNA) logrando un incremento del 75% en la extracción de lípidos bajo las condiciones óptimas de hidrólisis (50 °C, pH 4.6, 24 h), decreciendo la eficiencia de hidrólisis 40% después de 5 ciclos de reúso.

Además del uso de pretratamientos biológicos para mejorar la extracción de lípidos de microalgas, también se han realizado éstos para mejorar la producción de bioetanol. Harun y Danqua (2011) llevaron a cabo el pretratamiento de la microalga *Chlorococum humicola* (la cual contiene celulosa, hemicelulosa y pectina en su pared celular), empleando celulasas de *T. ressei* (ATCC 26921) alcanzando un rendimiento de glucosa de hasta el 64.2% (w/w) bajo condiciones óptimas (40°C, pH 4.8 72 h). En su estudio cinético confirman que tanto la glucosa como la celobiosa son productos inhibitorios de la actividad celulasa, siendo más significativa la inhibición por glucosa. Kim et al. (2014) reportaron una estrategia para la producción de bioetanol a partir de *C. vulgaris* crecida en condiciones limitadas de nitrógeno, la cual consiste en una etapa de hidrólisis empleando una pectinasa de *Aspergillus aculeatus* para llevar a cabo la sacarificación y, posteriormente la fermentación empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7906) inmovilizada sobre alginato de calcio. La etapa de sacarificación tuvo un rendimiento del 79% a 50 °C por 72 h; la etapa de fermentación tuvo un 89% de eficiencia de conversión a etanol tanto en cultivos por lote (24h de fermentación, 10% de azúcares) como en cultivos continuos (10 % azúcares, TRH de 5.6 h); ambos sistemas de reacción se mantuvieron a 30 °C.

La hidrólisis enzimática de microalgas también se ha empleado para incrementar la generación de biocombustibles gaseosos mediante la digestión anaerobia o fermentación oscura de las mismas. Mahdy et al. (2014a) realizaron un pretratamiento enzimático a *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* empleando Alcalasa 2.5L, una enzima con actividad endopeptidasa, alcanzando un 72 % y 57.4 % de solubilización de DQO respectivamente, después incubar 5 horas las microalgas con la solución enzimática bajo condiciones óptimas (pH 8, 50°C). El efecto de la enzima Alcalasa 2.5L sobre *C. vulgaris* se reflejó en una producción de $287 \pm 1.3 \text{ mL CH}_4 \text{ g-COD}^{-1}$ (51% más que la microalga fresca) que corresponde a un 82% de biodegradabilidad. En el mismo estudio, la biomasa fresca de *C. reinhardtii*, cuya pared celular es rica en glicoproteínas, tuvo 75% de biodegradabilidad, alcanzando un rendimiento de $263 \text{ mL CH}_4 \text{ g-COD}^{-1}$; después de la hidrólisis, la recuperación de metano solo se incrementó en un 10%. En este caso, la alta biodegradabilidad de la biomasa fresca de ésta microalga no justifica el uso de un tratamiento enzimático previo.

Tabla 1. Estudios relevantes sobre la hidrólisis enzimática de microalgas

Microalga	Producto	Actividad enzimática	Condiciones	Resultado	Referencia
Una sola enzima					
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CH ₄	Proteasa (Alcalasa 2.5L)	0.2 mL g-ST ⁻¹ a pH 8 for 2h, 50 °C. Volumen no proporcionado	289 mL CH ₄ g-DQO ⁻¹ ; Incremento del 10% en la producción de metano	(Mahdy et al., 2014a)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Azúcares, lípidos	Celulasa	(140 mg/m ²) 24 h, pH 4.6, 50 °C. 15 mL	Hidrólisis de celulosa del 62%; incremento del 75% de extracción de lípidos	(Fu et al., 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CH ₄	Proteasa (Alcalasa 2.5L)	0.2 mL g-ST ⁻¹ a pH 8 por 2 h, 50 °C. Volumen no proporcionado	287 mL CH ₄ g-DQO ⁻¹ ; Incremento del 51% en la producción de metano	(Mahdy et al., 2014a)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Solubilización de proteína CH ₄	Proteasa (Alcalasa 2.5L)	0.585 UI g-ST ⁻¹ , 130 rpm, 3h, 50 °C, pH 8. Volumen no proporcionado	Eficiencia de hidrólisis del 49%; 256 mL CH ₄ g-DQO ⁻¹ , 1.59 veces más que el control	(Mahdy et al., 2014b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lípidos	Celulasa	5 mg L ⁻¹ , 10 h, pH 4.8, 55 °C. 500 mL	8.1 veces más que la biomasa control	(Zheng et al., 2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lípidos	Lisozima	5 mg L ⁻¹ , 10 h, 55 °C. 500 mL	7.6 veces más que la biomasa control	(Zheng et al., 2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa	Pectinasa (Pectinex SP-L)	240 UI (mg proteína) ⁻¹ , pH 4.8, 200 rpm, 72h. Volumen no dado	Rendimiento de sacarificación de 79%	(Kim et al., 2014)
<i>Chlorococcum sp</i>	Glucosa	Celulasa de <i>T. reesei</i> ATCC 26921	40 °C, pH 4.8, 72 h. 100 mL	Rendimiento de glucosa de 64% con una relación 0.02 g enzima/g biomasa	(Harun y Danquah, 2011)
<i>Laminaria digitata</i>	Azúcares reductores	Celulasa (Sigma C9748)	1.25 mL g-ST ⁻¹ , pH 5, 37 °C, 24h, 300 rpm. 5 mL	17.72 mg mL ⁻¹ de azúcares reductores	(Vanegas et al., 2015)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Lípidos	Celulasa	5 mg L ⁻¹ , 37°C, pH 5.5, 12h. Volumen dado	Eficiencia de recuperación de lípidos del 33% y 52% para cultivos ricos en nitrógeno y carentes del mismo, respectivamente.	(Surendhiran y Vijay, 2014)

Cocteles enzimáticos

<i>Botryococcus braunii</i>	Metano	Extracto enzimático de <i>A. discolor</i>	1000 U L ⁻¹ de actividad MnP, 24 h, 200 rpm, 30 °C. 50 mL	521 mL CH ₄ g-SV ⁻¹ ; incremento del 62% respecto al control	(Ciudad et al., 2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	Dextrinas	α-Amilasa termoestable	0.005% (p/v), 90°C, 30 min.	2.5 g L ⁻¹ dextrinas	(Gerken et al., 2013)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Glucosa	Glucoamilasa	0.2% (p/v), 55 °C, pH 4.5, 30 min	~98% de hidrólisis de carbohidratos	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CH ₄	Celulasa Proteasa	0.3 mL g-ST ⁻¹ a pH 5.5 por 3 h. 0.2 mL g-ST ⁻¹ a pH 8 por 2 h, 50 °C. Volumen no dado.	311 mL CH ₄ g-DQO ⁻¹ ; 1.17 veces más respecto al control	(Mahdy et al., 2014a)
<i>Chlorella vulgaris</i>	H ₂	Extracto enzimático	35 °C, 150 rpm, pH 7.4, 52 h. 100 mL	43 mL H ₂ g-ST ⁻¹ ; 1.42 veces más que la biomasa control	(Yun et al., 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lípidos	Extracto enzimático del estómago de caracol (snailase)	5mg/L, 2 h, 37 °C. 500 mL.	2.36 veces más que la biomasa control	(Zheng et al., 2011)
<i>Chroococcus</i> sp.	Carbohidratos	Extracto enzimático de <i>A. lentulos</i> .	20% (v/v) de extracto enzimático, 2 g/L de microalga, 30°C, pH 5, 48h, 150 rom.	Eficiencia de hidrólisis del 44%	(Prajapati et al., 2015)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin	Proteinasa K y driselasa	Proteasa (0.1%), driselasa (0.5%), pH5.8, 30°C, 1h. Volumen no dado	1.65 veces respecto al control	(Mendes-Pinto et al., 2001)

Recientemente, se estudió el efecto que tiene la Alcalasa 2.5L sobre la hidrólisis enzimática de *Scenedesmus sp.*, una microalga que al igual que *C. vulgaris* posee una estructura trilaminar en su pared celular y es una de las microalgas más resistentes a la degradación (Mahdy et al., 2016); sin embargo, la actividad proteasa sobre *Scenedesmus sp.*, alcanzó solo el 15% de solubilización de COD, y la digestión anaerobia con el hidrolizado de microalga rindió 216 mL CH₄ g-COD⁻¹ (52% más respecto al obtenido con biomasa fresca), que corresponde al 62% de biodegradabilidad anaerobia. La baja biodegradabilidad de *Scenedesmus sp.*, se debe a que esta microalga presenta en su pared celular esporopoleninas, los cuales como se ha mencionado son compuestos muy recalcitrantes.

1.3.1.2. Cócteles enzimáticos

Debido a que la pared celular de las microalgas está constituida por diversos biopolímeros con distintas complejidades y diferentes niveles de resistencia a la degradación, algunos estudios han intentado hidrolizarlos utilizando cócteles enzimáticos para producir efecto sinérgico. Zheng et al. (2011), estudiaron el efecto de un extracto enzimático proveniente de caracol (esnailasa) sobre la extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris*. Snailase es una mezcla de enzimas, el cual contiene 9 tipos de enzimas, incluyendo celulasas, hemicelulasas, pectinasas, proteasas y amilasa. Este estudio encontró que la extracción de lípidos mejoró 4.1 veces comparado con el control, mayor a lo obtenido con enzimas puras con actividad celulasa o lisozima. La mejor eficiencia de la esnailasa puede ser atribuida a la alta actividad proteasa, amilasa y lipasa que ésta presenta. Gerken et al. (2013) realizaron estudios de biodegradabilidad de la pared celular de cepas de *Chlorella*, encontraron que ésta microalga es más sensible a enzimas que hidrolizan polímeros que tienen como constituyente *N*-acetilglucosamina, es decir, enzimas con actividad quitinasa y lisozima. Para confirmarlo realizaron pruebas de permeabilidad a sondas fluorescentes de DNA, encontrando que *C. vulgaris* mostró hasta un 98.6% de permeabilidad cuando se incubó con una mezcla de enzimas lisozima/sulfatasa.

En lo que respecta a la producción de bioetanol, Choi et al. (2010) obtuvieron azúcares fermentables a partir de *Chlamydomonas*, una microalga libre de celulosa en estado vegetativo, siendo las glicoproteínas los principales constituyentes de su pared celular. Ellos aplicaron 2 etapas en secuencia: licuefacción empleando la enzima Thermamyl 20L (α -amilasa) de *B. licheniformis* y la sacarificación usando una amiloglucosidasa de *A. niger*, logrando solubilizar el 94% de los gránulos de almidón presentes en *C. reinhardtii*. Esta alta solubilización se debió a que Thermamyl 120L posee además actividad proteasa, lo que conlleva a la digestión de la pared celular.

El pretratamiento de microalgas a gran escala se ve limitada por los altos costo de las enzimas puras, por lo que Prajapati et al. (2015) sugieren el empleo de un extracto crudo enzimático de *Aspergillus lentulus*, para llevar a cabo la digestión de

la pared celular de microalgas. Ellos proponen el uso de un crudo enzimático (20% v/v) de *Aspergillus lentulus*, un hongo con actividad celulasa y xilanasa, para llevar a cabo la hidrólisis de la pared celular de *Chroococcus sp.*, una microalga con alto contenido de carbohidratos y lípidos, alta velocidad de crecimiento, y potencial aplicación en fitorremediación y tratamiento de aguas residuales (Prajapati et al., 2014, 2013). El extracto crudo de *A. lentulus* resultó en la solubilización de carbohidratos y DQO en un 44% y 46% respectivamente, después de 48 h de incubación a 30°C. Ellos sugieren que el empleo de un extracto enzimático es una mejor opción en lugar de emplear enzimas puras.

Por otro lado, Yun et al. (2014), reportaron un estrategia novedosa para la obtención de biohidrógeno a partir de *Chlorella vulgaris*. El pretratamiento consistió en el empleo de una solución de extracto crudo de enzimas hidrolíticas extracelulares (CHEES, por sus siglas en inglés) provenientes del efluente de un fermentador productor de H₂ a partir de residuos de comida. Se encontró que el extracto CHEES tuvo la mejor eficiencia de hidrólisis a 52h, lo que resultó en un rendimiento de 43 mL H₂/g biomasa seca. El rendimiento alcanzado por Yun et al. (2014) fue mayor que el obtenido al emplear otros pretratamientos con bajos requerimientos de energía como la hidrólisis ácida (37 mL H₂/g biomasa seca), ultrasonificación (37 mL H₂/g biomasa seca) y combinación de los anteriores (42 mL H₂/g biomasa seca) (Yun et al., 2013). En lo que respecta a la producción de metano, Mahdy et al. (2014a), emplearon una solución de Viscozyme L con Alcalase para llevar a cabo el pretratamiento de *Chlorella vulgaris*. Viscozyme L es un complejo multienzimático que posee actividad celulasa, xilanasa, hemicelulasa, β-glucanasa y arabinasa; Alcalase, es una enzima con actividad endopeptidasa. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear ambas soluciones enzimáticas juntas, logrando solubilizar 86% de carbohidratos y 96% de proteínas, lo cual se reflejó en un incremento del 51% en la producción de metano, alcanzando 287 ± 1.3 mL CH₄ g-COD⁻¹ y logrando hasta un 82% de biodegradabilidad. Recientemente, se han realizado pretratamientos para mejorar la producción de metano a partir de *Scenedesmus* empleando distintas enzimas hidrolíticas (Mahdy et al., 2016, 2015), sin embargo, los rendimientos de producción de metano han sido menores a los obtenidos por Mahdy et al. (2014a).

Como se ha mencionado anteriormente, casi toda la investigación sobre el pretratamiento enzimático de microalgas está hecho a base carbohidrolasas, pectinasas o proteasas. No obstante, recientemente Ciudad et al. (2014) llevaron a cabo la digestión de la pared celular de la microalga *Botryococcus braunii* en presencia de un extracto enzimático (enzimas ligninolíticas) obtenido de *Anthracoxyllum discolor*, un hongo de podredumbre blanca. *Botryococcus braunii*, es una microalga verde ampliamente distribuida en la naturaleza con gran importancia biotecnológica debido a su elevado contenido de lípidos (Metzger y Largeau, 2005). Sin embargo, ésta microalga presenta en su pared celular

triterpenos insaturados polimetilados (hasta el 86% en peso seco), además de algaenanos y esporopoleninas (Banerjee et al., 2002; Gatellier et al., 1993). Dos de las enzimas ligninolíticas las más importantes son la ligninoperóxidasa (LiP) y la manganeso peróxidasa (MnP), la primera de ellas lleva a cabo la oxidación de sustratos no fenólicos mientras que la segunda si lo hace. Los productos de reacción son radicales libres que posteriormente sufren una gran variedad de reacciones no enzimáticas (Niladevi, 2009). Ciudad et al. (2014) encontraron que al incubar *Botryococcus braunii* en presencia de un extracto enzimático (1000 UI L^{-1}), donde más del 90% de la actividad es actividad MnP, se obtuvo un incremento del 62% en la producción de metano con respecto al control, alcanzando $521 \text{ mL CH}_4 \text{ g-VS}^{-1}$ y hasta el 90% de biodegradabilidad con respecto al valor teórico. El pretratamiento con enzimas ligninolíticas resultó más eficiente en comparación con otros pretratamientos como la hidrólisis térmica y ultrasonido, alcanzado un máximo de biodegradabilidad anaerobia del 76% empleando hidrólisis térmica (Alzate et al., 2012); además, de los casos de estudio de hidrólisis enzimática consultados, el porcentaje de biodegradabilidad alcanzado empleando enzimas ligninolíticas, es el más alto que se ha reportado hasta este momento.

Esto es evidencia que se obtiene una mejor eficiencia de hidrólisis al emplear una mezcla de enzimas en lugar de usar una sola, además de que es más factible (técnica y económicamente) obtener un extracto enzimático de uno o varios microorganismos hidrolíticos que sus enzimas purificadas. También se pone de manifiesto la ventaja que presenta el usar enzimas de alto potencial de óxido-reducción, como las enzimas ligninolíticas. Las enzimas ligninolíticas llevan a cabo la degradación de la pared celular de microalgas, especialmente cuando contienen compuestos muy recalcitrantes (esporopoleninas y algaenanos). Aunque las enzimas ligninolíticas son muy inespecíficas, las estructuras químicas similares de las esporopoleninas y la lignina pueden explicar el efecto hidrolítico de dichas enzimas (Ciudad et al., 2014). En este sentido, las esporopoleninas exhiben derivados fenilpropanoides que también están presentes en la molécula de lignina (Figura 1).

1.3.2. Cultivos hidrolíticos

Como se ha mencionado previamente, el costo de enzimas comerciales puede ser muy alto y limitar su aplicación a gran escala. Una forma de reducir los costos es inmovilizar las enzimas. No obstante, su reuso sigue siendo el factor limitante. Por ejemplo, Fu et al. (2010) después de 5 ciclos de reutilizar enzimas con actividad celulasa, la eficiencia de hidrólisis disminuyó por debajo del 50%. Una estrategia económicamente más factible es el empleo de bacterias hidrolíticas, las cuales pueden hidrolizar biomasa microalgal durante su crecimiento y propagación (Lü et al., 2013). Los cultivos hidrolíticos se han empleado como cultivos axénicos o en forma de consorcios microbianos. Los distintos inóculo, fuentes de bacterias, ventajas e inconveniente son mencionados a continuación. La Tabla 2 resume las

condiciones de operación de estudios relevantes que han empleado cultivos hidrolíticos potenciales en el pretratamiento de microalgas. Las enzimas fúngicas han sido probadas para la hidrólisis de microalgas (Tabla 1); sin embargo, a nuestro conocimiento, no hay reportes sobre el uso de cultivos fúngicos sobre la hidrólisis directa de microalgas, lo cual es un área potencial de investigación.

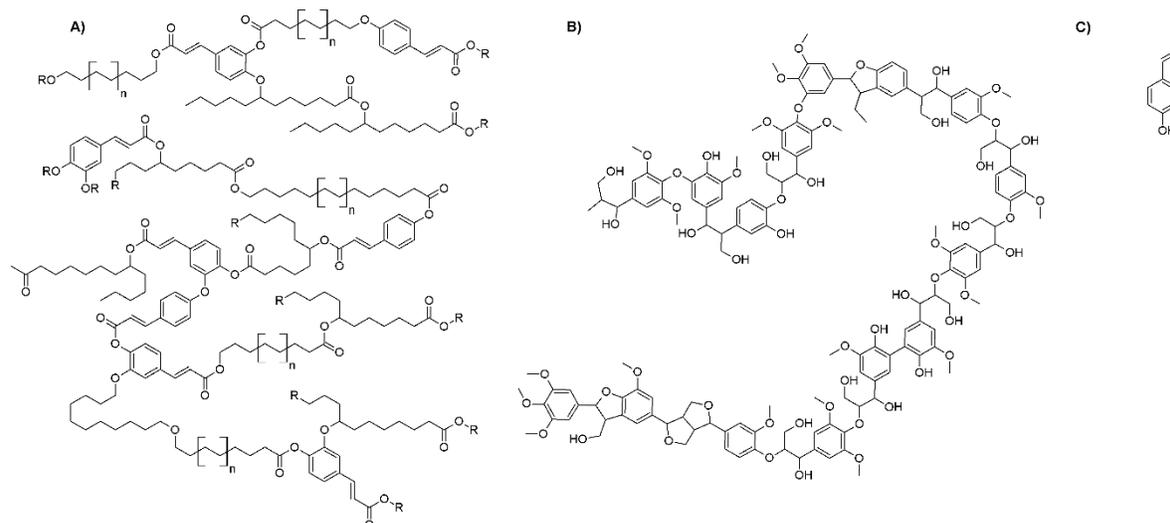


Figura 1. A) Modelo de esporopoleninas presentes en la pared del polen de *Arabidopsis thaliana* (Morant et al., 2007) y B) lignina presente en la madera (Zakzeski et al., 2010). C) Ambas moléculas presentas derivados fenilpropanoides.

1.3.2.1. Cultivos hidrolíticos axénicos

Las bacterias hidrolíticas han sido aisladas de diferentes ecosistemas. Sin embargo, su aplicación a la hidrólisis de microalgas aún es limitada. El efecto alguicida de algunas bacterias asociadas con microalgas ha sido reportado en el contexto de investigación de fósiles (Afi et al., 1996), centrándose en las bacterias asociadas con floraciones de fitoplancton (Riemann et al., 2000). En comunidades bacterianas asociadas con microalgas se han identificado las actividades lipasa, aminopeptidasa y β -glucosidasa (Riemann et al., 2000); así como también enzimas hidrolíticas extracelulares y asociadas a la membrana incluyendo laminarinasas y β -fucosidasas (Buchan et al., 2014). Diversas especies bacterianas con capacidad alguicida han sido aisladas, incluyendo *Kordia algicida*, *Alteromonas sp.*, *Thalassobius aestuarii sp.*, *Nautella sp.*, *Sagittula sp.*, *Thalassobius sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Pseudoalteromonas sp.*, todas tienen un efecto negativo en el crecimiento de microalgas y un efecto lítico (Amaro et al., 2005; Matsumoto et al., 2003; Oh et al., 2011; Paul y Pohnert, 2011; Wang et al., 2010). A pesar de la gran cantidad de estudios sobre el efecto de bacterias alguicidas, solo hay pocos reportes sobre su uso aplicado a la producción de biocombustibles a partir de microalgas. En algunos casos, se han empleado las cepas hidrolíticas *Bacillus thuringiensis* y *Flammoevirgan yaeyamensis*, el rendimiento de recuperación de lípidos incremento

44.3% y 100% (Bai et al., 2015), respectivamente; usando *C. vulgaris* como sustrato. Otra bacteria alguicida, *Bacillus fusiformis*, fue aislada de lodos activados, y tuvo un efecto inhibitorio sobre *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella* y *Scenedesmus*, mejorando la tasa de remoción de clorofila-a (Mu et al., 2007).

Otras fuentes de bacterias hidrolíticas son los consorcios naturales que se encuentran en ambientes anaerobios, por ejemplo, las bacterias del género *Clostridium*. La cepa de *C. butyricum* ha sido capaz de hidrolizar 81.4% del almidón de *Chlorella* (Kim et al., 2006), gracias a su actividad amilasa (Whelan y Nasr, 1951), por otra parte la bioaugmentación de lodo anaerobio con *C. Thermocellum*, incremento el rendimiento de metano en un 27% (Carver et al., 2011). En años recientes, He et al. (2016) llevaron a cabo el pretratamiento de *Chlorella* con la bacteria proteolítica *Bacillus licheniformis*, mejorando la producción de metano en un 22.7%.

1.3.2.2. Consorcios bacterianos

Se han aislado bacterias que habitan en depredadores naturales de microalgas, por ejemplo de moluscos bivalvos, y ha sido estudiada su efecto sobre la pared celular y la producción de metano. Entre las bacterias aisladas, *Aeromonas bivalvium* MA2, *Raoultella ornithinolytica* MA5, y *Aeromonas salmonicida* MC25 degradan *Botryococcus braunii*, y *R. ornithinolytica* MC3 y MA5 degradan *Nannochloropsis gaditana* (Muñoz et al., 2014). Aunque algunas cepas bacterianas con actividad endoglucanasa fueron aisladas, su potencial como comunidad bacteriana no fue evaluado, en la cual posiblemente habría un efecto sinérgico. Otros estudios que evaluaron consorcios bacterianos asociados con microalgas no evaluaron el efecto del consorcio completo sobre el crecimiento de microalgas (Amaro et al., 2005; Oh et al., 2011). Sin embargo, Wang et al. (2010) cultivaron la microalga *Alexandrium tamarense* en un medio (Zobell 2216E) que promovió la proliferación de las bacterias asociadas a su ficósfera, resultando en la completa lisis celular de microalgas. Las bacterias seleccionadas fueron *Alteromonas sp.* y *Thalassobius aestuarii sp.* Adicionalmente, Amaro et al. (2005) encontraron que un medio rico en nutrientes es determinante para la proliferación de bacterias asociadas con microalgas. Otro consorcio natural, lodo anaerobio tratado térmicamente, se ha reportado que digiere las microalgas para producir hidrógeno, alcanzando 7 mL H₂ g-SV⁻¹ a una relación inóculo a sustrato de 0.3 (Sun et al., 2011). Aunque el modo de acción no es claro (Wirth et al., 2012).

1.3.2.3. Consideraciones al emplear un cultivo hidrolítico

Los cultivos hidrolíticos realizan distintas actividades hidrolíticas en un mismo co-cultivo, teniendo ventajas similares a los cócteles o extractos enzimáticos, pero sin la necesidad de requerir una continua adición de enzimas. El inóculo bacteriano debe ser elegido apropiadamente, dependiendo de los biopolímeros recalcitrantes presentes en la pared celular de la microalga. La pared celular puede tener una

composición muy diversa, especialmente la de aquellos consorcios crecidos en aguas residuales. De hecho, la comunidad microalgal crecida en aguas enriquecida en puede estar asociada con bacterias y formar flóculos (Wang et al., 2016), lo cual podría incrementar la complejidad.

Otro parámetro importante es el tiempo del co-cultivo. Por ejemplo, Oh et al. (2011) determinaron que algunos compuestos alguicidas producidos por *Nautela sp.*, *Sagitulla sp.* y *Thalassobious sp.* Necesitaron 24 h para afectar el 80% de la viabilidad de las microalgas; mientras que los compuestos alguicidas producidos por *Alteromonas sp.* y *Pseudoalteromonas* lograban el mismo efecto en solo 5 h. En este sentido, el tiempo requerido para la hidrólisis depende del cultivo hidrolítico y de la composición de la biomasa microalgal, variando desde escasas horas hasta algunos pocos días (Tabla 2).

El efecto sobre distintas especies de microalgas también es función de las bacterias hidrolíticas. Por ejemplo, *Kordia algicida* hidroliza 3 diferentes especies de diatomeas (géneros *Skeletonema*, *Thalassiosira* y *Phaeo*), mientras que no se ha observado efecto alguicida sobre *Chaetoceros didymus*, otra diatomea marina; esto sugiere un mecanismo de excreción de la proteína alguicida dependiente de quorum sensing (Paul y Pohnert, 2011). Paul y Pohnert (2011) aislaron diferentes bacterias marinas alguicidas asociadas al dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides*, el mismo cultivo de bacterias extraídas, afectó en menor medida (menor al 20%), la viabilidad celular de otro dinoflagelado, *Akashiwo sanguinea*, así como de un rafidofito, *Heterosigma akashiwo* y una diatomea, *Skeletonema costatum*.

Una de las principales desventajas de los cultivos hidrolíticos es la baja especificidad del producto formado. Debido a que los cultivos hidrolíticos, usan los productos de la hidrólisis como su propio sustrato, de modo que las posibles vías metabólicas de cada cultivo deben ser consideradas. Por ejemplo, el uso de la cepa *C. butyricum* como un cultivo de hidrólisis y productor de hidrógeno no genera ninguna competición por sustrato en etapas subsecuentes; de hecho, produce formato, acetato, propionato y butirato (Kim et al., 2006). Por otro lado, el co-cultivo de *Flammeovirga yaeyamensis* con *Chlorella vulgaris* provocó la lisis celular de la microalga, pero los azúcares reductores producidos fueron inmediatamente consumidos por la bacteria (Chen et al., 2013). Debido a que el propósito de éste último trabajo fue mejorar la extracción de lípidos, la concentración de azúcares reductores no fue relevante. Sin embargo, cuando se consideran estos pretratamientos para la producción de biocombustibles fermentativos, como hidrógeno o etanol, el consumo de azúcares es un tema crítico.

Tabla 2. Estudios relevantes sobre la lisis de microalgas por cultivos hidrolíticos

Microalga	Cultivo hidrolítico	Modo de acción	de Productos	Condiciones	Resultado	Referencia
Cultivos puros						
<i>C. vulgaris</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> ITRI-G1	No es claro, no debido a actividad enzimática	Lípidos	Compuestos alguicidas extracelulares por 24h, 10 g L ⁻¹ de alga, 25°C, pH 7	Incremento en la extracción de lípidos de un 10.1% hasta 44.3%	(Bai et al., 2015)
<i>Skeletonema Costatum</i> , <i>Thalassiosira weissflogii</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Kordia algicida</i>	Actividad proteasa		<i>K. algicida</i> fue cultivada en co-cultivo con el alga en una proporción 3:1 (v/v), 64h, 15 °C	Inhibición del crecimiento celular desde un 81-91% respecto al control, medido como fluorescencia de clorofila	(Paul y Pohnert, 2011)
<i>C. vulgaris</i>	<i>Flammeovirga yaeyamensis</i>	Actividad amilasa, celulasa y xilanasa	Lípidos	Pretratada con un sobrenadante concentrado de un co-cultivo de <i>F. Yaeyamensis</i> y <i>C. vulgaris</i> . 4 U mL ⁻¹ de amilasa, 5mU mL ⁻¹ de celulasa y 15 mU mL ⁻¹ de xilanasa	Incremento del 100% en la extracción de lípidos	(Chen et al., 2013)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i> cepas MC3 y MA5	Actividad celulasa	Metano	Co-cultivo en una relación 1:1 (v/v), 30°C, 48 h. La biomasa resultante fue llevada a digestión anaerobia.	Incremento en la recuperación de metano en un 114 y 159%, respecto al control	(Muñoz et al., 2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>C. butyricum</i>	Degradación de almidón, lipasas	Hidrógeno	Co-cultivo a 37°C por 48 h, 12-18 g L ⁻¹ de alga	0.8 mL H ₂ (mL cultivo) ⁻¹ , 53% de hidrólisis de almidón	(Kim et al., 2006)

Liofilizado comercial de <i>Chlorella</i> <i>Chlorella</i> sp.	<i>C. butyricum</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Degradación de almidón, lipasas Actividad proteolítica	Hidrógeno Metano	Co-cultivo a 37°C por 96 h, 35 g L^{-1} de alga El cultivo hidrolítico se agregó a 8% (v/v) y la microalga a 5 g L^{-1} a pH 7, 37°C, 120 rpm por 60 h.	0.9 mL H_2 (mL cultivo) ⁻¹ , 81.4% de hidrólisis de almidón Incremento del 22.7% en la producción de metano	(Kim et al., 2006) (He et al., 2016)
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	Actividad celulasa	Metano	20 g DQO L^{-1} de microalga, 0.7 g L^{-1} bacterias, pH 6.5, 24 h, 40 °C	Incremento del 100% en el rendimiento de metano	(Kavitha et al., 2017)
Consorcio hidrolítico						
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	<i>Nautella</i> sp., <i>Sagittula</i> sp., <i>Thalassobius</i> sp., <i>Alteromonas</i> sp. y <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Efecto lítico		El cultivo filtrado de cada cepa fue adicionado a un cultivo de <i>C. polykrikoides</i> , en fase exponencial, en una relación 1:9 (v:v), 6h	Se vio afectada la viabilidad celular un 40 a un 100%	(Oh et al., 2011)
<i>Alexandrium catenella</i>	Filos Proteobacteria y Cytophaga	Actividad lipasa, aminopeptidasa, glucoamilasa y fosfatasa alcalina		El sobrenadante filtrado fue adicionado a un cultivo de <i>A. catenella</i> , en fase exponencial, a una relación 1:5 (v:v)	50% de las células fueron lisadas en 24h	(Amaro et al., 2005)
<i>Alexandrium tamarense</i>	<i>Alteromonas</i> sp. y <i>Thalassobius aestuarii</i> sp.	β -glucosidasa y quitinasa		Enriquecimiento de bacterias de un cultivo de <i>A. tamarense</i> , usando medio Zobell	Completa lisis celular después de 14h	(Wang et al., 2010)

<i>C. vulgaris</i>	Lodo anaerobio bioaugmentado con <i>Clostridium thermocellum</i>	Actividad celulasa	Hidrógeno y metano	2 g SV L ⁻¹ de alga, 3 g L ⁻¹ de lodo anaerobio, 10% (v/v) de <i>C. thermocellum</i> a 55°C, 33 días	Incremento del 27% en el rendimiento de metano, el proceso en 2 etapas mejoró la recuperación de energía en un 9.4%, en comparación con el proceso en una etapa (Lü et al., 2013)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Consorcio termófilo enriquecido de composta	Actividad celulasa	Hidrógeno	Resultados después de 5 pases consecutivos de enriquecimiento en co-cultivo discontinuo a 60°C	El rendimiento incrementó de 0.3 a 4.2 mmol H ₂ g-SV ⁻¹ (Carver et al., 2011)
<i>C. vulgaris</i>	Consorcio termófilo enriquecido de composta	Actividad celulasa	Hidrógeno	Resultados después de 5 pases consecutivos de enriquecimiento en co-cultivo discontinuo a 60°C	El rendimiento incrementó de 0.2 a 2.1 mmol H ₂ g-SV ⁻¹ (Carver et al., 2011)

1.4. Hidrólisis biológica de bagazo de agave y recuperación de biocombustibles gaseosos

La hidrólisis enzimática de bagazo de agave se ha empleado casi siempre después de un pretratamiento previo (químico o físico) (Montiel et al. 2016; Caspeta et al. 2014; Ríos-González 2017), habiendo pocos estudios que emplean únicamente hidrólisis enzimática; aunado al reciente interés por el uso de bagazo de agave para la producción de biocombustibles, es muy limitada la cantidad de estudios existentes.

Considerando estudios que solo aplican hidrólisis enzimática, Contreras-Davila et al., (2017) llevaron a cabo la hidrólisis de bagazo de agave empleando un coctel enzimático comercial con actividad celulasa (Celluclast 1.5 L) a pH 4.5, 100 rpm y 45 °C por 10 horas obteniendo aproximadamente 12.5 g L⁻¹ de azúcares totales, lo que representó un rendimiento de sacarificación de 0.38 g_{azúcares}/g_{bagazo de agave}. Posteriormente, el hidrolizado se sometió a fermentación oscura en un reactor CSTR (reactor continuo de tanque agitado) y TBR (reactor de lecho percolador); las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno (VHPR) máximas reportadas en estas configuraciones fueron 2.53 y 3.45 L H₂ L⁻¹d⁻¹, respectivamente. Sin embargo, la carga orgánica y el rendimiento molar de hidrógeno en ambos sistemas fueron semejantes: 52.5-52.9 g DQO L⁻¹d⁻¹ y 1.35-1.53 mol H₂ (mol azúcar)⁻¹, respectivamente.

Arreola-Vargas et al., (2016) estudiaron la hidrólisis enzimática usando la preparación enzimática Celluclast 1.5 L (bajo las mismas condiciones de ensayo que Contreras-Davila et al., 2017), alcanzando una recuperación de 8.9 g L⁻¹ de azúcares totales solubles y 40.1 g DQO_s L⁻¹. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos para producción de metano en una y dos etapas (fermentación oscura-metanogénesis) a distintas concentraciones del hidrolizado 20, 40, 60, 80 y 100%. En este trabajo se encontró que un sistema en dos etapas permite recuperar 4.4 veces más energía en comparación que el de una etapa (46.42 kJ vs 10.52 kJ), empleando el hidrolizado diluido al 40%.

Considerando lo anterior, la hidrólisis enzimática representa una opción prometedora para la revalorización de este residuo lignocelulósico; sin embargo, falta estudiar el efecto de cultivos hidrolíticos mixtos a fin de superar las limitaciones que implican el uso de enzimas comerciales.

1.4.1. Bioprocesos consolidados (CBP)

A pesar de la baja especificidad de producto, los ejemplos enlistados previamente que emplean cultivos bacterianos hidrolíticos son similares a los CBP dado que se pueden llevar a cabo en un mismo cultivo la hidrólisis, sacarificación y fermentación. Con el propósito de implementar un CBP para producir bioetanol de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), Aikawa et al. (2013) emplearon lisozima y una cepa

recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* que expresaba α -amilasa de *Streptococcus bovis*, alcanzando un rendimiento del 86% del valor teórico en menos de 50h, sin necesidad de pretratamiento. A parte del trabajo mencionado anteriormente otro estudio usó *C. butyricum* como un cultivo fermentativo para la producción de hidrógeno (Kim et al., 2006).

A pesar de que la definición de CBP es usada frecuentemente para biocombustibles fermentativos, tal como el hidrógeno o etanol, la producción de metano por digestión anaerobia puede ser considerada un CBP debido a que es un proceso en el cual ocurren todas etapas (hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis) dentro de un mismo reactor. En este sentido, una revisión temprana sobre la digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos enfatizó la mejora en el rendimiento de los digestores por la actividad enzimática que ocurre naturalmente o por bioaugmentación. Los mismos autores señalaron el potencial de microorganismos celulóticos de ecosistemas naturales como el rumen (Adney et al., 1991).

Basados en una revisión temprana, se observa que los CBP tienen menores costos comparados con la hidrólisis enzimática cuando se ha empleado biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol a través de microorganismos genéticamente modificados o por un consorcio microbiano (Lynd et al., 2005). Además de los consorcios microbianos ya mencionados anteriormente, otras fuentes de comunidades microbianas son aquellas que naturalmente consumen sustratos celulósicos, como las bacterias ruminales (Ho et al., 2011) y las asociadas al tracto digestivo de termitas (Mathew et al., 2013; Ni y Tokuda, 2013). En las siguientes secciones, se discute el potencial de los microorganismos ruminales para llevar a cabo la hidrólisis de microalgas.

1.5. Perspectivas del rumen como una fuente de un cultivo hidrolítico de biomásas celulósicas

El rumen es la primera cámara en el tubo digestivo de los rumiantes, como las vacas que son alimentadas con pasto u otros materiales lignocelulósicos, y provee microorganismos con un hábito adecuado para su crecimiento. Esta cámara contiene uno de los consorcios microbianos más densos y diversos encontrados en la naturaleza (bacterias, protozoarios y hongos anaerobios) con alta actividad hidrolítica (Stewart et al., 1997; Wang y McAllister, 2002). Los microorganismos ayudan a degradar el material lignocelulósico, generando proteínas, vitaminas y ácidos orgánicos de cadena corta. Estos ácidos son mayoritariamente ácidos acético, butírico y propiónico, los cuales contribuyen a la nutrición del animal (Nocek y Russell, 1988; Weimer et al., 2009). La Tabla 3 resume las especies microbianas que con frecuencia son identificadas y reportadas en la literatura para el ecosistema ruminal; mientras que en la Figura 2 se muestra la interacción entre estas bacterias.

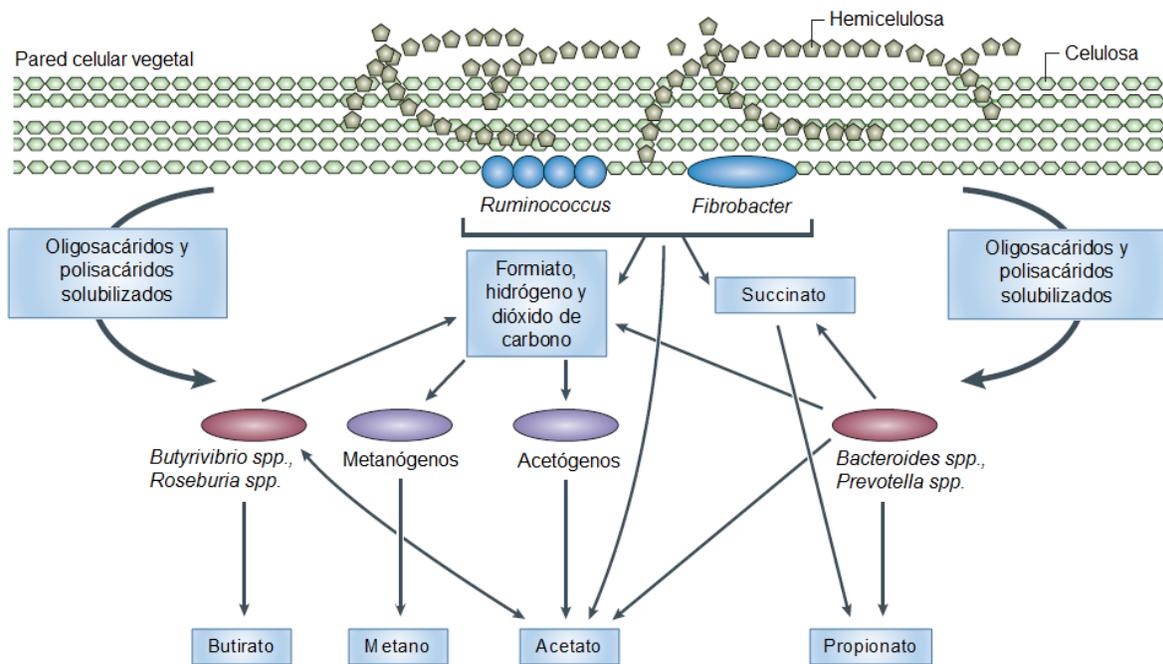


Figura 2. Representación simplificada de la interacción entre degradadores primarios de material fibroso y otros miembros de la comunidad microbiana ruminal presente en rumen (Flint et al., 2008).

1.5.1. Actividades enzimáticas presentes en rumen

Los microorganismos ruminales han evolucionado para la utilización de biopolímeros complejos y recalcitrantes de la pared celular de plantas, tales como la celulosa, hemicelulosa y pectina. Esta capacidad de degradación involucra hasta 21 actividades enzimáticas diferentes, tales como celulasa, xilanasas, β -glucanasa, pectinasa, amilasa y proteasa, entre muchas más (Wang y McAllister, 2002). La actividad celulasa en el rumen es llevada a cabo principalmente por bacterias. Las enzimas involucradas en la hidrólisis de celulosa, β -1,4-endoglucanasa, celobiohidrolasa, celodextrinasa y β -glucosidasa, han sido aisladas de bacterias ruminales como parte de un complejo multienzimático extracelular llamado celulosoma (Duan et al., 2011, 2009). Los celulosomas han sido identificados en bacterias anaerobias como un sitio de unión a celulosa que une a la célula bacteriana a la partícula sólida, minimizando las pérdidas de difusión de productos de la hidrólisis. Algunas ventajas de los celulosomas son una sinergia optimizada debido a la proporción de las enzimas que constituyen el complejo enzimático y un dominio de unión de baja especificidad, evitando así un número restringido de sitios de unión al sustrato. Las bacterias ruminales más representativas que expresan estos complejos enzimáticos corresponden a los géneros *Ruminococcus* y *Butyrivibrio* (Schwarz, 2001).

Tabla 3. Especies frecuentes encontradas en rumen (Russell y Rychlik, 2001)

Microorganismo	Consume	Produce
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Celulosa	Succinato, formato, acetato
<i>Ruminococcus albus</i>	Celulosa, hemicelulosa	Succinato, formato, etanol, H ₂
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Celulosa, Hemicelulosa	Succinato, formato, acetato, H ₂
<i>Eubacterium ruminatum</i>	Hemicelulosa, dextrinas, azúcares	Acetato, formato, butirato, lactato
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Almidón	Succinato, formato, acetato, etanol
<i>Streptococcus bovis</i>	Almidón, azúcares	Lactato, acetato, formato, etanol
<i>Succinomonas amylolytica</i>	Almidón	Succinato, acetato, propionato
<i>Prevotella rumicola, albensis, brevis y bryanii</i>	Almidón, pectina, xilao, azúcares	Succinato, acetato, formato, propionato
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, azúcares	Butirato, Formato, Acetato, H ₂
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Almidón, dextrinas, azúcares, lactato, succinato	Lactato, acetato, propionato, butirato, formato, H ₂
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Lactato, azúcares	Propionato, acetato, butirato, AGVs ramificados, H ₂
<i>Lachnospira multiparus</i>	Pectina, azúcares	Lactato, acetato. Format, H ₂
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	Pectina, azúcares, dextrinas	Succinato, lactato, acetato, formato
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Glucosa, azúcares	Succinato, acetato, propionato
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Aminoácidos	AGVs ramificados, acetato
<i>Clostridium aminophilum</i>	Aminoácidos	AGVs ramificados, acetato
<i>Clostridium sticklandii</i>	Aminoácidos	AGVs ramificados, acetato, butirato, propionato
<i>Wolinella succinogenes</i>	Ácidos orgánicos, H ₂ , Formato	AGVs ramificados, acetato, butirato, propionato
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H ₂ , CO ₂ , Formato	CH ₄
<i>Methanosarcina backeri</i>	H ₂ , CO ₂ , Formato	CH ₄

Otras actividades enzimáticas de interés presente en rumen son la fermentación de carbohidratos por hongos anaerobios, los cuales digieren casi todos los carbohidratos estructurales en las células vegetales. La actividad carbohidrolasa de origen fúngico es producida por las zoosporas en estado vegetativo y son extracelulares. Por ejemplo, *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum* y *Piromyces communis* pueden digerir celulosa, xilano, almidón, pectina y hemicelulosa. Los productos de fermentación de celobiosa por especies fúngicas son lactato, acetato, hidrógeno y dióxido de carbono (Orpin y Joblin, 1997).

Además de la actividad hidrolítica de los principales grupos microbianos en el rumen, se han reportado algunos efectos sinérgicos. Por ejemplo, hay un incremento en la síntesis de celulasas y xilanasas cuando se emplea un cultivo mixto de bacterias y hongos (Wang y McAllister, 2002). También se ha reportado actividad hidrolítica en los ciliados, debida principalmente a su asociación simbiótica con bacterias ruminales que viven dentro de los protozoarios (Delfosse-Debusscher et al., 1979).

1.5.2. Aplicaciones potenciales de los microorganismos ruminales en la producción de biocombustibles a partir de biomasa celulósicas

Las capacidades enzimáticas de los microorganismos ruminales se han estudiado por su potencial para mejorar la calidad del forraje de ganado, así como por su utilidad en la industria textil papelera o alimentaria (Selinger et al., 1996). Una reciente revisión sugiere su uso como un bioproceso consolidado para material celulósico, centrándose en la biomasa lignocelulósica para producir etanol, metano y ácidos orgánicos (Weimer et al., 2009).

En este sentido, el fluido ruminal ha sido probado para la degradación de celulosa y residuos lignocelulósicos, tales como residuos vegetales, fracción celulósica de los residuos sólidos municipales, bagazo y otros más (Barnes y Keller, 2004; H. J. Gijzen et al., 1988a, 1988b; Gijzen et al., 1987; Hu y Yu, 2005; Kivaisi y Eliapenda, 1995). En las últimas obras citadas, se han evaluado dos enfoques, uno de ellos usa el fluido ruminal como inóculo para un reactor fermentativo para producir principalmente ácidos grasos volátiles (AGVs). Este trabajo obtuvo entre un 60 a 72% de conversión de sustrato a AGVs, a cargas orgánicas de hasta 30 g SV/L-d, y bajas velocidades de producción de metano. La acumulación de AGVs evidenció una ineficiente comunidad metanogénica en el fluido ruminal (H. J. Gijzen et al., 1988b; Gijzen et al., 1987; Kivaisi y Eliapenda, 1995). Un segundo enfoque consistió en usar dos reactores en serie. El primer reactor consistió en un reactor fermentativo usando fluido ruminal y una segunda etapa de biopelícula metanogénica alcanzando 75% de degradación del sustrato y 55% de conversión de contenido orgánico en metano (H. J. Gijzen et al., 1988a).

Un trabajo reciente reportó el uso de fluido ruminal para mejorar la fermentación anaerobia de rastrojo de maíz. Semejante a los trabajos previos, se alcanzó un alto

rendimiento de conversión de AGVs, entre 0.56-0.59 g g-SV⁻¹ alimentado, acoplado a producción de hidrógeno, lo cual mantuvo el pH por debajo de 6 (Hu y Yu, 2005). En el mismo sentido, otros estudios han aprovechado la actividad hidrolítica del rumen especialmente para incrementar la producción de hidrógeno de materiales lignocelulósicos. Nissilä et al. (2011) evaluaron la producción de hidrógeno a partir de celulosa bajo distintas temperaturas termófilas (52, 60 y 65 °C), alcanzando 1.93 mol H₂ (mol hexosa_{degradada})⁻¹ y 21% de degradación de celulosa, antes se inhibió la actividad metanogénica mediante un tratamiento térmico. De forma similar, Chang et al. (2010) llevó a cabo el enriquecimiento de bacterias celulolíticas, usando como inóculo fluido ruminal, mediante cultivos por lotes repetidos. Esta misma metodología fue empleada para producir hidrógeno y etanol (en un trabajo posterior) a partir de pasto de Napier (Ho et al., 2011). Estudios similares han usado microorganismos ruminales para hidrolizar materiales lignocelulósicos, trabajos recientes han evaluado el uso de biomasa microalgal residual (del proceso de extracción de lípidos) como alimento para rumiantes (Han y McCormick, 2014; Stokes et al., 2015). Estos estudios sugieren que la biomasa microalgal resultante de la extracción de lípidos es fácilmente asimilable por los microorganismos ruminales, demostrando el potencial de estos microorganismos para digerir la biomasa microalgal como un pretratamiento para la producción de biocombustibles. En otro estudio, se incluyó *Spirulina platensis* en la dieta del ganado (Panjaitan et al., 2010), mostrando un incremento en la concentración sérica de urea. Lo que anterior sugiere una rápida degradación y absorción de proteínas de la microalga. La Tabla 4 resume las principales actividades enzimáticas requeridas para hidrolizar microalgas y los microorganismos responsables de dicha actividad en el rumen.

La compleja composición microbiana del rumen implica la alimentación cruzada en productos de la hidrólisis. Algunas especies bacterianas y fúngicas no tienen actividad celulolítica, dependiendo de aquellas que la hacen, y pueden hasta cierto punto competir por los productos de la hidrólisis. Por otro lado, algunas bacterias hidrolíticas no consumen los productos de la hidrólisis, como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*, quienes hidrolizan xilano; sin embargo, se benefician de la remoción de los productos solubles, los cuales podrían inhibir su actividad hidrolítica si el producto se acumula (Wolin et al., 1997).

Otro biocombustible que puede producirse a partir de la biomasa lignocelulósica es el etanol. Algunas bacterias ruminales pueden producir etanol en cultivos axénicos; sin embargo, la transferencia inter-especie de hidrógeno en el rumen impide la producción de etanol y restringe el proceso fermentativo hacia la producción de ácidos grasos volátiles y metano como productos finales (Weimer et al., 2009). Los ácidos grasos volátiles son un sustrato ideal para la producción de metano. No obstante, si la producción de biocombustibles fermentativos requiere ser mejorada empleando microorganismos ruminales, algunas restricciones naturales necesitan ser controladas, como la alimentación cruzada y transferencia inter-especie de

hidrógeno. Además, otro desafío de usar comunidades microbianas ruminales es la conservación de la actividad enzimática en sistemas *in vitro*. A continuación se describen los principales sistemas desarrollados para conservar la actividad ruminal y las condiciones sugeridas para controlar dicha restricción a fin de favorecer la producción de biocombustibles a partir de microalgas.

1.5.3 Mantenimiento de la actividad de un cultivo ruminal

La compleja composición del rumen involucra la relación simbiótica de microorganismos anaerobios estrictos adaptados a altas tasas de dilución, altas densidades celulares y predación (Wang y McAllister, 2002). El rumen tiene un contenido semisólido (12-18 % sólidos), retención selectiva de material particulado y un flujo semi continuo, ésta cámara se mantiene a 38-40 °C (Weimer et al., 2009). Estas características ayudan a mantener la actividad hidrolítica del rumen, de modo que las bacterias a través del celulosoma se adhieren al material particulado con el fin de prolongar su residencia en el rumen, mientras los productos solubles son removidos constantemente (Stewart et al., 1997; Wang y McAllister, 2002; Weimer et al., 2009). Basados en estas propiedades, algunos sistemas se han sugerido para mantener la actividad ruminal *in vitro*: reactores en continuo de doble flujo, reactores continuos de flujo ascendente y reactores discontinuos secuenciales; en la mayoría de los casos separando el tiempo de retención hidráulica (TRH) del tiempo de retención de sólidos (TRS).

1.5.3.1. Reactor en flujo continuo

Se estudió la cinética de hidrólisis de celulosa por *Ruminococcus albus* en un fermentador anaerobio continuo completamente agitado de 400 mL, encontrando las mejores eficiencias de hidrólisis con un TRH de 0.5 a 2 d. Además, se observó que la hidrólisis de celulosa aumentaba a medida que incrementaba el TRH, así como los productos solubles (ácidos grasos volátiles y etanol); la concentración de azúcares reductores fue insignificante en todas las condiciones de ensayo (Pavlostathis et al., 1988). Un bioreactor similar fue propuesto por Kistner y Kornelius (1990), para estudiar el crecimiento de *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* sobre papel filtro molido.

1.5.3.2. Reactor continuo de doble flujo

Para mantener los protozoarios en la comunidad ruminal en niveles más altos que aquellos en sistemas no dializados, Hoover et al. (1976) propusieron un sistema de cultivo continuo con tasas diferenciales de rotación líquido-sólido. El número de protozoarios se mantuvo a niveles moderados usando un filtro para separarlos del medio líquido y del material particulado.

Tabla 4. Actividades hidrolíticas que pueden encontrarse en el rumen para el pretratamiento de microalgas y microorganismos que las expresan

Polímero presente en la pared celular de microalgas	Actividad enzimática	Bacterias	Hongos	Protozoarios	Referencia
Celulosa, hemicelulosa	Celulasas, hemicelulasas	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Neocallimastix patriciarum</i> , <i>Caecomyces communis</i> , <i>Piromyces communis</i>		(Stewart et al., 1997; Wang y McAllister, 2002)
Almidón	Amilasas	<i>Ruminobacter amylophilus</i> , <i>Selenomonas lactilytica</i> , <i>Lachnospira multiparus</i>			(Stewart et al., 1997)
Pectina Proteína	Pectinasas Proteasas	<i>Lachnospira multiparus</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>		<i>Entodinium caudatum</i> , <i>Entodinium simplex</i>	(Silley, 1985) (Coleman, 1983; Cotta y Hespell, 1986)
Lípidos	Lipasas	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>			(Stewart et al., 1997)
Quitina	Quitinasas	<i>Clostridium tertium</i>			(Kopečný et al., 1996)

1.5.3.3. Reactor anaerobio bifásico

Gijzen et al. (1988) reportaron un reactor anaerobio bifásico de alta tasa para la conversión de papel filtro a biogás a distintas cargas orgánicas. La hidrólisis y acidogénesis de la celulosa se llevaban a cabo en un primer reactor por acción de los microorganismos ruminales, mientras que en una segunda etapa los AGVs eran convertidos a biogás. Los microorganismos ruminales fueron mantenidos en el reactor acidogénico desacoplando el TRH del TRS, usando un filtro con poro de 30 μm para extraer el efluente.

1.5.3.4. Reactor anaerobio discontinuo secuencial (AnSBR, por sus siglas en inglés)

Siguiendo con el mismo principio del desacoplamiento del TRH del TRS, Barnes y Keller (2004) evaluaron diferentes tiempos de retención en un AnSBR para hidrolizar fibras de alfa celulosa, TRH = 0.67 d y TRS= 7 d. Los resultados que obtuvieron fueron semejantes a aquellos estudios que empleaban un cultivo continuo acoplado con un proceso de filtración.

Los últimos trabajos revisados mantuvieron la actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales sobre celulosa y otros materiales celulósicos. De hecho, un trabajo reciente enriqueció la comunidad ruminal hidrolíticas para la producción de hidrógeno con un sustrato más complejo, como el pasto de Napier (Chang et al., 2010); esto se llevó a cabo en un solo reactor, por lo que se podría considerar un sistema CBP. Cabe mencionar que pocos trabajos han evaluado la cinética de producción de azúcares, empleando microorganismos ruminales, un parámetro importante para evaluar la producción potencial de diferentes biocombustibles fermentativos a partir de biomasa celulósica, como las microalgas.

1.6. Conclusiones

De entre los distintos pretratamientos biológicos para biomazas celulósicas, el uso de cultivos hidrolíticos resulta ser una opción técnica y económicamente más factible que la hidrólisis enzimática. A pesar de que la actividad carbohidrolasa ha sido ampliamente estudiada sobre la hidrólisis de microalgas y biomasa lignocelulósica, los reportes sugieren que otras actividades enzimáticas, como la proteasa y quitinasa, son igual de importantes para aquellas microalgas que presentan materiales recalcitrantes como las diatomeas. Los cultivos hidrolíticos naturales con altas capacidades hidrolíticas, como los microorganismos ruminales, representan una opción prometedora para el pretratamiento de microalgas y bagazo de agave para la subsecuente producción de biocombustibles o incluso la transformación completa en un bioprocesos consolidado.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La presencia de complejos celulósicos (celulosa, hemicelulosa y pectina) en las paredes celulares de microalgas y bagazo de agave inducirá la actividad carbohidrolasa de los microorganismos ruminales, los cuales podrán ser cultivados y enriquecidos en reactores discontinuos secuenciales. Además, manipulando el tiempo de retención hidráulica será posible obtener un hidrolizado rico en azúcares o ácidos grasos volátiles que podrá acoplarse a la generación de biocombustibles gaseosos.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Establecer condiciones de proceso para mantener la actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales para llevar a cabo la hidrólisis de biomasas celulósicas (microalgas y bagazo de agave) e incrementar la recuperación de biocombustibles gaseosos en una etapa subsecuente.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Definir las condiciones de operación para obtener un inóculo hidrolítico a partir de fluido ruminal
2. Estudiar el efecto de la relación inicial microalga/fluido ruminal sobre la producción de metano en cultivos en lote.
3. Estudiar la estabilidad de un reactor hidrolítico (inoculado con fluido ruminal) alimentado con microalgas y optimizar el tiempo de retención hidráulico aplicado a la generación de biocombustibles gaseosos (hidrógeno y metano).
4. Evaluar el efecto de la concentración de bagazo de agave sobre la producción de metano en lote, empleando fluido ruminal para llevar a cabo la hidrólisis de bagazo de agave.
5. Identificar los microorganismos con capacidad de hidrolizar microalgas y bagazo de agave por medio de técnicas moleculares.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental se divide en 3 fases descritas en tres capítulos de esta tesis. El capítulo 4, que representa la primera fase, se centra en el estudio de ensayos en lote a fin encontrar la relación inicial microalga a fluido ruminal que maximice la producción de metano. La segunda fase se presenta en el capítulo 5, donde se estudian condiciones de proceso para mantener un reactor hidrolítico y su aplicación de la producción de hidrógeno y metano. La última fase se aborda en el capítulo 6, donde se estudia el efecto de la concentración de bagazo de agave en la producción de metano en un reactor en lote.

3.1.1. Montaje del reactor hidrolítico

Como una primera aproximación se llevó a cabo un ensayo en lote, empleando microalgas como sustrato, a fin de observar el comportamiento de la actividad hidrolítica. Posteriormente, empleando sistemas discontinuos se demostró que fue posible enriquecer los microorganismos hidrolíticos ruminales, empleando microalgas como sustrato. Por último, se realizaron ensayos en lote, estudiando el efecto de la concentración de microalga sobre la producción de metano, manteniendo constante la concentración de fluido ruminal.

3.1.2. Hidrólisis de microalgas en un sistema discontinuo secuencial

Una vez determinada la relación inicial óptima (microalga/fluido ruminal) óptima para la producción de metano, se estudió el efecto del tiempo de retención hidráulica (TRH) sobre la actividad hidrolítica de fluido ruminal alimentado con biomasa microalgal. El objetivo de esta fase fue determinar las condiciones que permitieran mantener el reactor hidrolítico con la mayor actividad de los microorganismos ruminales adaptados a nivel piloto de laboratorio. Este reactor servirá como el productor de inóculo para los ensayos de hidrólisis de bagazo de agave. Se manipuló el TRH a fin de obtener un hidrolizado rico de azúcares o ácidos grasos volátiles (AGVs), a partir del cual pudiera recuperarse hidrógeno o metano en una etapa posterior.

3.1.3. Hidrólisis de bagazo de agave

Por último, empleando como inóculo el fluido ruminal alimentado con microalgas, se realizaron ensayos en lote para estudiar el efecto de la concentración de bagazo de agave sobre la producción de metano.

3.2. Materiales celulósicos empleados, fluido ruminal e inóculo productor de hidrógeno y metano

3.2.1. Consorcio nativo de microalgas

La biomasa microalgal utilizada como fuente de sustrato consistió en un consorcio microalgas nativo de un lago ubicado en Querétaro, México (20°42'07.0"N 100°27'36.7"W y 1900 m sobre el nivel del mar). El cultivo de microalgas se enriqueció en medio Bold usando bolsas tubulares de plástico como reactores (8L). Una vez que se alcanzó la concentración de biomasa deseada (0.74 unidades de absorbancia a 685 nm; o 0.58 g SSV L⁻¹), ésta fue concentrada por centrifugación (4500 rpm por 10 min). Los reactores fueron aireados con un flujo constante de 1 L min⁻¹ (0.035% CO₂) usando difusores de piedra y manteniendo un periodo luz-oscuridad de 12 x 12 h. La luz fue suministrada con lámparas de neón de 54 W (LT 300 Extech Instruments, USA), con intensidad luminosa de 100 µmol m⁻²s⁻¹ (Cea-Barcia et al., 2014). La composición del cultivo fue determinada por microscopía óptica (Leica DM500, Japan) y recuento directo en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de acuerdo con Sheath y Wehr (2003). Los principales géneros identificados fueron *Scenedesmus* (98%), *Keratococcus* (1%). La biomasa microalgal contenía 25.9% de azúcares, 26.9% de proteínas, 8.1 % de lípidos y 9% de cenizas; así como una relación SV/ST de 0.91.

3.2.2. Bagazo de agave

El lote de bagazo de agave usado procede del *Agave tequilana Weber var. Azul* y se recolectó de una destilería situada en el Valle de Amatitán, Jalisco, México, situada a una altitud de 1260 m sobre el nivel del mar.

El bagazo está compuesto principalmente de fibras heterogéneas (haces fibrovasculares) entre 3-5 mm de largo, y material orgánico no fibroso en forma de partículas. Fue secado al sol durante 10 días para su acondicionamiento. La composición del bagazo de agave se resume en la siguiente tabla.

Tabla 5. Composición del bagazo de agave

Parámetro	Valor
Sólidos totales (ST) (%)	93.44
Sólidos volátiles (SV) (%)	89.92
Celulosa (%ST)	50.06
Hemicelulosa (%ST)	19.60
Lignina (%ST)	8.31
Compuestos extractivos (% ST)	22.1
g DQO g-ST ⁻¹	1.10

3.2.3. Fluido ruminal

El fluido ruminal se obtuvo de vacas adultas fistuladas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Querétaro, México. El fluido ruminal (sólido y líquido) se recolectó (3 L) por la mañana antes que el animal consumiera alimento, preservándolo a 40 °C hasta su uso. Previo a su uso, la muestra se licuó con el fin de homogenizarlo y se burbujeo con N₂ para mantener un medio reductor. El contenido de sólidos totales (ST) y volátiles (SV) del fluido ruminal fueron de 11.76 y 10.16 % (p/v).

3.2.4. Lodo productor de hidrógeno y metano

El inóculo para los ensayos de producción de hidrógeno y metano fue lodo anaerobio granular obtenido de un reactor (que opera a 35°C) de una industria cervecera localizada en Guadalajara, Jalisco. El contenido de ST y SV del inóculo fue de 28 19 g/L. Antes de su uso en los ensayos de producción de hidrógeno, el lodo anaerobio fue sometido a un pretratamiento térmico (105 °C por 24h) para seleccionar las bacterias productoras de hidrógeno con capacidad de esporular. Después del tratamiento térmico, el lodo fue molido en un mortero, se tamizó en una malla #20 (850 µm) y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso (Buitrón y Carvajal, 2010). Antes de los ensayos de potencial bioquímico de metano, el lodo anaerobio granular fue mantenido por dos semanas bajo condiciones endógenas para minimizar el sustrato remanente y reducir la generación exógena de biogás.

3.3. Medios de cultivo

3.3.1. Medio para el crecimiento de microorganismos ruminales

Para llevar a cabo el pretratamiento de los sustratos objeto de estudio se usó medio McDougall (1948), el cual tiene la siguiente composición (en mg/L): (NH₄)₂SO₄, 1300; K₂HPO₄, 2040; NaHCO₃, 400; NaCl, 80; MgSO₄·7H₂O, 19.2; FeSO₄·7H₂O, 1.1; CaCl₂, 8; KH₂PO₄, 40. El pH se ajustó a 7.

3.3.2. Medio productor de hidrógeno

El medio mineral empleado para éste propósito fue el descrito por Mizuno et al. (2000). Su composición (en mg/L) es la siguiente: NH₄Cl, 2600; K₂PO₄, 250; MgCl₂·6H₂O, 125; FeSO₄·7H₂O, 5; CoCl₂·6H₂O, 2.5; MnCl₂·4H₂O, 2.5, KI, 2.5; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.5; H₃BO₃, 0.5; NiCl₂·6H₂O, 0.5; ZnCl₂, 0.5. El pH inicial se ajustó a 6.5 con HCl ó NaOH, 5N.

3.4. Sólidos Totales (ST), Sólidos Volátiles (SV), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) (APHA et al., 2005)

La cuantificación se realizó en base al método 2540.

3.4.1. ST y SV

Para muestras con alto contenido de sólidos, se coloca una muestra de peso conocido (que rinda entre 2.5 y 200 mg de residuo) sobre una cápsula de porcelana o crisol. La muestra es secada a 103-105 °C, al menos por 8 horas. Posteriormente, se coloca en un desecador y se pesa en una balanza analítica. El procedimiento de secado-enfriado-pesado se repite hasta tener una diferencia en peso menor al 4%. Después, la muestra se colocó dentro de una mufla a 550°C por 15 min, para su incineración. La muestra se trasladó a la estufa por 15 min y posteriormente a desecador, para luego pesarla en una balanza analítica. El ciclo de incineración-enfriamiento-pesado se repitió hasta conseguir una diferencia en peso menor al 4%.

Las cápsulas de porcelana empleadas para la determinación de SV fueron calcinadas en la mufla a 550°C por 1 hora.

3.4.2. SSV

Para muestras líquidas, se tomó un volumen definido (que rindiera un residuo entre 2.5 y 200 mg) y se filtró al vacío a través de un filtro Whatman® GF/A (1.6 µm). Se realizaron 3 lavados con agua destilada, 10 mL de agua para cada lavado. Posteriormente, las muestras se colocaron en estufa a 103-105 °C por 1 hora, se pasaron a desecador (para enfriar) y se pesaron en una balanza analítica. El procedimiento de secado-enfriado-pesado se repitió hasta conseguir una diferencia en peso menor al 4%. A continuación, la muestra se incineró en una mufla a 550 °C por 15 min. Los filtros se colocan en la estufa (103 -105 °C) por 15 min, se pasan al desecado 15 min más y se pesan. El ciclo de incineración-enfriamiento-pesado se repitió hasta tener una variación en peso menor al 4%.

3.5. Hidrólisis de materiales celulósicos y productos solubles

Para este propósito se caracterizó el sustrato (microalga o bagazo de agave) antes y después del pretratamiento. Tanto en la fracción soluble como en la fracción particulada se determinó: azúcares totales, proteínas y Demanda Química de Oxígeno (DQO). Los azúcares reductores, Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y solventes, resultantes del pretratamiento se cuantificaron en la fracción soluble.

Para la cuantificación de los distintos parámetros, mencionados anteriormente, en la fracción soluble, la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 10 min (Eppendorf MiniSpin) y posteriormente se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm (MF-Millipore). Para el análisis de AGVs, la muestra se acidificó hasta un pH de 2, con HCl 2N.

3.5.1. Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Hach, 2008)

La DQO es la cantidad de materia orgánica e inorgánica oxidable por una solución de dicromato de potasio en condiciones fuertemente ácidas a 150 °C. La digestión

se llevó a cabo en un reactor HACH a 150 °C y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro HACH (DR/2800) a 620 nm.

3.5.2. Cuantificación de azúcares totales y reductores

3.5.2.1. Azúcares totales (*DuBois et al., 1956*)

Para su cuantificación se mezcla 1 mL de muestra con 1 mL fenol al 5 % (p/v). Posteriormente, se agregan 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agita lentamente por inversión. Los tubos se enfrían en un baño de agua y se lee la absorbancia a 490 nm. El blanco se prepara empleando agua desionizada y la curva de calibración se realiza empleando D-glucosa como estándar.

3.5.2.2. Azúcares reductores (*Miller, 1959*)

En tubos de vidrio se mezclan 0.5 mL de muestra con 0.5 mL de reactivo de DNS. Los tubos se colocan en un baño de agua a ebullición por 5 min. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 5 mL de agua desionizada. Se agitan y se toma la lectura a 540 nm. El blanco se prepara con agua desionizada. Se realizaron 3 curvas de calibración, empleando D-glucosa, D-xilosa y D-maltosa como estándar.

Preparación de reactivo de DNS. Se pesan 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (sal de Rochelle) y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 mL de agua y se añade en agitación la sal de Rochelle lentamente. Se completa con agua hasta 400 mL y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche en oscuridad. Finalmente se afora a 500 mL y se filtra.

3.5.3. Determinación de proteína por el método de Lowry et al. (1951) modificado

Para cada mililitro de muestra se agregó 1 mL de reactivo de formación de complejo de Cu^{2+} (contiene $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Tartrato de sodio y potasio y, SDS) recién preparada, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 0.5 mL de Reactivo de Folin 0.2N por cada mililitro de muestra, se agitó en vortex y se deja reposar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 550 nm. El blanco se prepara usando agua desionizada y la curva de calibración se realizó con Albumina de Suero Bovino como estándar.

3.5.4. Cuantificación de AGVs y solventes (etanol, butanol y acetona)

Los ácidos grasos volátiles (ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y caproico) y solventes (etanol, butanol y acetona) fueron analizados con un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890B, USA) provisto con una columna HP-FFAP y un detector de ionización de llama. Las temperaturas del inyector y del detector fueron mantenidas a 190 °C y 210 °C, respectivamente. La temperatura de la columna fue mantenida a 60 °C por 1.5 min. Después, se

incrementó a 90 °C a una velocidad de 15 °C min⁻¹; posteriormente, la temperatura se incrementó a 170 °C a una velocidad de 25 °C min⁻¹ y se mantiene por 4 min. Se empleó gas nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 2.5 mL min⁻¹.

3.6. Cuantificación de biogás

El biogás producido fue medido diariamente por desplazamiento de líquido utilizando una solución ácida en una probeta invertida.

3.6.1. Composición del biogás

La composición de gas fue analizada con un cromatógrafo de gases (8610C SRI, SRI instruments, USA) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas de acero (2 m de longitud; 0.79 mm de diámetro). La temperatura inicial de la columna fue de 40 °C, la cual se mantuvo por 4 min. A continuación, la temperatura se elevó hasta 110 °C a razón de 20 °C min⁻¹. La temperatura final se mantuvo por 1.5 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron 90 y 150 °C, respectivamente. Se usó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 20 mL min⁻¹.

3.6.2. Cinética de producción de biogás

Se realizó un análisis cinético de la producción de metano empleando la ecuación modificada de Gompertz:

$$M(t) = M_{max} * \exp \left[-\exp \left(\frac{2.71828 * R_{max}(\lambda - t)}{M_{max}} + 1 \right) \right]$$

Donde, M(t) (mL g-DQO⁻¹) es la producción acumulada de metano o hidrógeno al tiempo "t"; M_{max} (mL g-DQO⁻¹), es la máxima cantidad de biogás producido; R_{max} (mL g-DQO⁻¹d⁻¹), es la máxima velocidad de producción específica de biogás; λ (d), es el tiempo de la fase de latencia antes de la producción exponencial de biogás; t (d), es el tiempo de incubación. Según convenga las unidades de M(t), M_{max} y R_{max} pueden estar referidas por gramo de DQO, de sólidos volátiles o simplemente la cantidad de biogás.

3.7. Actividad hidrolítica

Se recuperó la fracción soluble de cada muestra inmediatamente después del muestreo por centrifugación a 10 minutos a 10 000g. Se recuperó 0.1 mL de la fracción soluble y se incubó a 40 °C con cada uno de los sustratos, CMC, xilano y almidón soluble, específicos para las actividades CMCasa (endoglucanasa), xilanasa y amilasa, respectivamente. Los tiempos de incubación fueron: 1 hora sobre CMC y media hora sobre almidón y xilano. Se determinó el incremento de poder reductor de la mezcla de reacción debido a la liberación de glucosa, xilosa y maltosa (Miller, 1959). Las diferentes actividades enzimáticas fueron expresadas en Unidades Internacionales (UI), siendo la cantidad de μmoles de azúcares reductores liberados por minuto.

3.8. Cuantificación de celulosa, hemicelulosa y lignina

Las fracciones de fibra se determinan de acuerdo al método descrito por Ankom 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA); basado en el método desarrollado por Van Soest et al. (1991).

3.8.1. Fibra Detergente Neutro (FDN)

Las muestras de material lignocelulósico (0.5 ± 0.05 g) molidas y secadas son colocadas en bosas filtrantes (ANKON Technology F57 filter bags) y selladas por calor. Las muestras son digeridas dentro un equipo ANKON 200 FIBER ANALYZER en presencia de solución detergente neutro y α -amilasa a 90-100°C por 1.5 horas. Una vez concluida la digestión, se realizan 3 lavados consecutivos con agua destilada a 70-90 °C por 5 min, adicionando solo en el primer lavado α -amilasa. Posteriormente se elimina el exceso de agua con acetona, para finalmente secar las muestras a 105°C por 4 horas al menos. El residuo corresponde a la fracción FDN compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina.

La composición de la solución detergente neutra es la siguiente (en g L⁻¹): lauril sulfato de sodio, 30; EDTA-Na₂·H₂O, 18.61; tetraborato de sodio decahidratado, 6.81; fosfato dibásico de sodio anhidro, 4.56; trietilenglicol, 10 mL; pH entre 6.9-7.1. Por cada litro de solución detergente neutra se adicionan 2 mL de α -amilasa termoestable (ANKOM FAA).

3.8.2. Fibra Detergente Ácido (FDA)

Las muestras que salieron del tratamiento anterior ahora son sometidas a una digestión con una solución detergente ácida a 90-100 °C por 1 horas (ANKON 200 FIBER ANALYZER). Una vez concluida la digestión se realizan al menos 3 lavados con agua destilada a 70-90 °C, cada lavado por 5 minutos, hasta obtener un pH neutro en el agua de lavado. Posteriormente, se elimina el exceso de agua con acetona y se procede a secar a 105 °C por al menos 4 horas. El residuo corresponde a la fracción FDA que incluye a la celulosa y lignina.

La solución detergente ácida se prepara disolviendo 20 g de bromuro de cetil trimetilamonio en un litro de ácido sulfúrico 1N.

3.8.3. Lignina Detergente Ácido (LDA)

Las muestras resultantes de la sección anterior (completamente secas) son digeridas en solución con ácido sulfúrico al 72 % p/v (o 24 N) por 3 horas. Para este propósito, dentro de un vaso de precipitados de 1 L se colocan las muestras y se agrega suficiente cantidad de solución ácida a fin de que queden completamente sumergidas, comprimiendo las muestras con ayuda de un vaso de precipitados de 500 mL por 5 min a intervalos de 30 min, hasta completar las 3 horas. Posteriormente las muestras son lavadas con agua destilada a 70-90°C por 5

minutos hasta obtener un pH neutro en el agua de lavado. El residuo consiste de lignina y cenizas; además de cutina, la cual se toma como si fuera parte de la lignina.

La solución de ácido sulfúrico 72% p/v se obtiene agregando 1200 g de ácido sulfúrico concentrado a 440 mL de agua destilada.

3.8.4. Determinación de cenizas y lignina

Siguiendo con la secuencia, las muestras obtenidas de la sección anterior son sometidas a calcinación (550 °C) por 4 horas, dentro de crisoles o capsulas de porcelana. Para cada corrida se colocó al menos una bolsa “blanco”, es decir, una bolsa sin muestra.

3.8.5. Relaciones entre FDN, FDA y LDA

Con base en la cuantificación de las fracciones de la fibra es posible cuantificar la celulosa, hemicelulosa y lignina, de la siguiente manera:

a) Extractivos = Muestra seca – FDN; aquí se incluyen gomas, proteínas, lípidos, carbohidratos de reserva (almidón), etc.

b) Hemicelulosa = FDN – FDA

c) Celulosa = FDA – LDA

d) Lignina = LDA - cenizas

3.9. Caracterización de las comunidades bacterianas

3.9.1. Extracción y secuenciamiento de ADN

La extracción se realizó empleando el kit PowerSoil® isolation DNA (MOBIO, USA) conforme a las instrucciones del proveedor. La integridad y concentración del ADN se evaluó en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green (Invitrogen, USA), empleando como referencia un marcador de peso molecular (250 bp DNA Ladder, Invitrogen). La electroforesis se realizó a 60 V por 20 min en buffer TAE (40 mM Tris, 40 mM de ácido acético y 10 mM de EDTA·2H₂O). Se empleó un transiluminador UV para observar el gel y un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Eastman Kodak Company, USA). La concentración se cuantificó por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, USA). El ADN fue enviado para su análisis al Research and Testing Laboratory (RTL, Lubbock, EUA) donde se realizó el análisis de los amplicones en base a dos plataformas distintas (según se especifique): 454-Genome Sequencer FLX Titanium (Roche, Suiza) y MiSeq (Illumina, Inc., USA). Los genes 16S rADN fueron amplificados en su región V1-V2 con los primers 28F (GAGTTTGATCNTGGCTCAG) y 388R (TGCTGCCTCCCGTAGGAGT) o 519R (GTATTACCGCGGCGAGCTGGCAC) para bacterias; mientras que para arqueas se emplearon los primers 517F (GCCAGCAGCCGCGGTAA) y 909R

(CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG) para amplificar la región V4-V5 del mismo gen; para identificar los hongos se emplearon los primers ITS-3F (GCATCGATGAAGAACGCAGC) e ITS-4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC), que amplifican el Segundo Espaciador Transcrito Interno (ITS-2) del ADN ribosómico (rADN).

3.9.2. Análisis de los datos del secuenciamiento

Las secuencias fueron analizadas utilizando el software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010). La dereplicación de prefijos de las secuencias y clustering de las mismas al 4% de divergencia se realizó utilizando el algoritmo USEARCH (Edgar, 2010). La selección de OTU (Operational Taxonomic Unit) se realizó mediante el algoritmo UPARSE (Edgar, 2013). El análisis de quimeras se realizó utilizando el software UCHIME ejecutado en modo *de novo* (Edgar et al., 2011). La clasificación taxonómica de cada OTU se realizó utilizando su secuencia consenso, en donde la secuencia se analizó en el *RDP classifier* comparando con secuencias de alta calidad derivadas de la base de datos del NCBI.

3.9.3. Análisis de las OTUs identificadas

Para tener una mejor comprensión visual de las OTUs más abundantes y comparar su abundancia en los diferentes tratamientos se construyó un mapa de calor utilizando RStudio v.1.1.383 (RStudio Team, 2016). El mapa de calor fue generado usando las paqueterías “gplots” y “RColorBrewer” (Neuwirth, 2014; Warnes et al., 2016).

CAPITULO 4

HIDRÓLISIS DE BIOMASA MICROALGAL EMPLEANDO MICROORGANISMOS RUMINALES COMO UN PRETRATAMIENTO PARA INCREMENTAR LA RECUPERACIÓN DE METANO

Resumen

El uso de fluido ruminal como fuente de microorganismos hidrolíticos para el pretratamiento de un consorcio nativo de microalgas (esencialmente *Scenedesmus*) fue investigado. La actividad enzimática hidrolítica del fluido ruminal fue primeramente enriquecida en un biorreactor. Entonces, usando un cultivo enriquecido, se estudió el efecto de la concentración inicial microalga a fluido ruminal (S_0/X_0) sobre la hidrólisis y la subsecuente producción de metano. Una relación S/X de 0.5 mostró la mejor eficiencia de hidrólisis (29%) alcanzando una producción de metano de 193 mL CH₄ g-DQO⁻¹ en una segunda etapa. El tiempo de ambos procesos (pretratamiento más metanización) fue de sólo 7 días. Las bacterias ruminales con actividad hidrolítica predominantes fueron principalmente *Clostridium*, *Proteocatella* y *Pseudomonas*.

Este capítulo está basado en la siguiente publicación:

Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., 2017. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresour. Technol.* 244, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.117>

4.1. Introducción

La escasez de combustibles fósiles, el cambio climático y el deterioro medioambiental hacen necesaria la búsqueda, desarrollo e implementación de tecnologías más limpias para la obtención de energía. La biomasa es una fuente de energía renovable que ha sido ampliamente usada (Demirbas, 2009). En este sentido, los biocombustibles de tercera generación obtenidos a partir de microalgas presentan grandes ventajas, como el menor uso de suelo que los biocombustibles de segunda generación y su potencial para la captura de CO₂ y tratamiento de aguas residuales. Las microalgas son microorganismos unicelulares que crecen en ambientes acuáticos y convierten CO₂, agua y luz solar en lípidos, carbohidratos y proteínas a través de la fotosíntesis (Li et al., 2008). La definición de microalgas comúnmente incluye todos los microorganismos fotosintéticos unicelulares y multicelulares simples, incluyendo tanto microalgas procariotas (cianobacterias) como microalgas eucariotas (algas verdes, algas rojas y diatomeas) (Brennan y Owende, 2010).

Muchas de las tecnologías que emplean microalgas como sustrato van dirigidas a la producción de biodiesel; sin embargo, su producción a gran escala se ve limitada debido a los altos costos de los procesos de separación y purificación (downstream processing). La extracción de lípidos debe realizarse a partir de biomasa seca, este proceso de secado consume del 50-80% de la energía de todo el proceso de producción (González-Fernández et al., 2012b). La digestión anaerobia de microalgas es una de las tecnologías más prometedoras para recuperación de energía a partir de biomasa microalgal, siendo el primer estudio realizado en los 1950s (Golueke et al., 1957). En éste estudio, un consorcio de microalgas (*Chlorella* y *Scenedesmus*) fueron sometidos directamente a digestión anaerobia alcanzando un rendimiento de 0.17-0.32 L CH₄ g-SV⁻¹. La baja biodegradabilidad de las microalgas se debe a la composición de su pared celular, rica en celulosa y hemicelulosa (González-Fernández et al., 2012a). Para incrementar la recuperación de metano a partir de microalgas, comúnmente se realiza un pretratamiento mediante hidrólisis química o enzimática.

Las principales clases de enzimas empleadas para llevar a cabo la lisis celular de microalgas son glucanasas, glicosidasas, peptidasas y lipasas. Estas enzimas han sido empleadas tanto puras (Mahdy et al., 2016) como en cocteles enzimáticos (Ciudad et al., 2014; Mahdy et al., 2016, 2014a). Empleando la última estrategia, se ha reportado una de las mayores producciones de metano por Ciudad et al. (2014). En este trabajo se llevó a cabo la digestión de la pared celular de la microalga *Botryococcus braunii* en presencia de un extracto enzimático (enzimas ligninolíticas) obtenido de *Anthracoxyllum discolor*, un hongo de podredumbre blanca, logrando producir 521 mL CH₄ g-VS⁻¹, que representa un 90 % de biodegradabilidad anaerobia. A pesar de la clara ventaja de los pretratamientos enzimáticos sobre la biomasa microalgal, el uso de enzimas puras es un factor limitante en el

escalamiento del proceso debido a sus altos costos y su falta de reutilización (He et al., 2016; Muñoz et al., 2014).

Con el propósito de explorar métodos más económicos, se han propuesto cultivos hidrolíticos para llevar a cabo el pretratamiento de biomasa microalgal. En este sentido Muñoz et al., (2014) informaron el uso de un cultivo bacteriano con actividad hidrolítica para realizar el pretratamiento de biomasa de *Nannochloropsis gaditana* incrementando hasta un 158% la producción de metano. He et al., (2016) aplicaron un pretratamiento a biomasa de *Chlorella sp.* utilizando la bacteria proteolítica *Bacillus licheniformis*; de esta manera lograron un incremento en la producción de metano de 22%, en comparación con la biomasa fresca. Recientemente, Carrillo-Reyes et al., (2016) realizaron una revisión sobre los pretratamientos biológicos para microalgas y sugirieron la aplicación de consorcios bacterianos hidrolíticos para éste fin, como el que se encuentra en el tubo digestivo de termitas y rumiantes.

El rumen es la primera cámara del tubo digestivo de los rumiantes y se encuentra colonizada por una compleja comunidad de microbios anaerobios. Incluyendo bacterias, protozoarios, hongos y arqueas. Las bacterias celulolíticas más abundantes pertenecen a los géneros *Fibrobacter* y *Ruminococcus*; además, estas bacterias pueden degradar xilano. Otras bacterias ruminales tienen actividad amilolítica (especies del género *Ruminobacter* y *Succinomonas amylolytica*), y especies del género *Lachnospira* pueden digerir pectina. Los microorganismos ruminales pueden degradar material lignocelulósico generando ácidos grasos de cadena corta y biogás (22-29% de metano) como principales productos del metabolismo (Van Soest, 1994). En este sentido, recientemente se ha reportado la aplicación de los microorganismos ruminales para producir metano a partir de biomasa microalgal en una sola etapa. Giménez et al. (2017) emplearon fluido ruminal como inóculo para la producción semi-continúa de metano de biomasa de *Scenedesmus*, alcanzando rendimientos de metano de 214 mL CH₄ g-DQO⁻¹ con un tiempo de retención hidráulico y de sólidos de 31 y 100 d, respectivamente. Además, Aydin et al. (2017) usaron hongos hidrolíticos ruminales para bioaumentar lodo anaerobio granular. En este último trabajo se reportó un incremento del 41% en la producción de biogás comparado con el control sin hongos ruminales, empleando *Haematococcus pluvialis* como sustrato. Estos trabajos previos demuestran el potencial de los microorganismos ruminales para incrementar la recuperación de metano de microalgas. Sin embargo, no hay reportes que indiquen el uso de fluido ruminal como una etapa de pretratamiento para mejorar la tasa de ruptura celular de la biomasa microalgal previo a su metanización. De modo que es necesario evaluar parámetros operaciones como la relación inicial sustrato a inóculo y comprender el enriquecimiento de la comunidad bacteriana ruminal.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de fluido ruminal como fuente de microorganismos hidrolíticos para el pretratamiento de un consorcio nativo de microalgas (esencialmente *Scenedesmus*). En este sentido, primeramente

se enriqueció la actividad enzimática hidrolítica del cultivo ruminal en un bioreactor. Posteriormente, empleando el cultivo enriquecido, se estudió el efecto de la relación inicial microalga a fluido ruminal (S_0/X_0) sobre la hidrólisis y la subsecuente producción de metano. Además, se caracterizó la comunidad bacteriana ruminal seleccionada y aquella endógena del cultivo microalgal por técnicas de secuenciación masiva de alta eficiencia basadas en el 16s rADN.

4.2. Estrategia experimental

4.2.1. Evaluación de la actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales

Como primera aproximación para evaluar la capacidad hidrolítica del fluido ruminal utilizando microalgas como sustrato se realizó un ensayo por lote durante 7 días. Se utilizó un reactor de tanque agitado (Applikon Bioreactor Systems, Holland) de 7 L con 4 L de volumen de trabajo, a una agitación de 100 rpm, 40 °C, pH 7 y condiciones de anaerobiosis. El reactor se inóculo con fluido ruminal a 20% (v/v) y 3.5 g SV L⁻¹ de microalgas. Se tomó una muestra cada 24 horas para evaluar la actividad enzimática extracelular, carboximetilcelulasa (CMCasa) o β -endoglucanasa, xilanasas y α -amilasa. En éste experimento y posteriores se utilizó medio Mc Dougall (1948), el cual tiene similitud con la composición de la saliva de los rumiantes.

4.2.2. Diseño de experimentos

4.2.2.1. Enriquecimiento de bacterias hidrolíticas ruminales

El enriquecimiento de fluido ruminal se realizó en botellas serológicas de 120 mL con 80 mL de volumen de trabajo; se purgó el espacio de cabeza con gas N₂ durante 15 s, para luego ser incubadas a 40 °C a 100 rpm por 7 días. Se ensayaron dos concentraciones de microalgas (3.5 y 7 g ST L⁻¹) y dos fuentes de carbono como controles positivos (CMC y xilano). Como controles negativos se evaluó la autohidrólisis de microalgas a las mismas concentraciones (3.5 y 7 g ST L⁻¹) sin fluido ruminal, así como un control solo con fluido ruminal (0.5 g ST L⁻¹). Se realizaron tres inoculaciones. Para la primera inoculación, se adicionaron a cada botella 0.5 g ST L⁻¹ de fluido ruminal. Para realizar la segunda y tercera inoculación, se transfirieron 8 mL del contenido de la primera botella a la siguiente, ajustando el volumen a 80 mL (0.05 g ST L⁻¹). Para la segunda y tercera inoculación, la concentración de microalga y medio mineral fueron las mismas que en al inicio. Al final de los ensayos se tomaron muestras de biomasa y se almacenaron a -20 °C para la posterior caracterización de las comunidades bacterianas. Todos los tratamientos fueron evaluados por triplicado.

4.2.2.2. Efecto de la relación inicial sustrato a inóculo (S_0/X_0) sobre la producción de metano

- Pretratamiento de la biomasa microalgal

Se evaluaron distintas relaciones S_0/X_0 (0.3, 0.5, 1 y 2) variando la concentración inicial de microalga, manteniendo constante el fluido ruminal en 5 g ST L⁻¹. Además, se utilizaron controles únicamente con fluido ruminal o microalgas (ambos a 5 g ST L⁻¹). Los ensayos se realizaron en lote en botellas serológicas, utilizando el mismo volumen, temperatura y agitación que el experimento de enriquecimiento (sección 4.2.2.1). Diariamente fue cuantificado el biogás producido así como su composición por desplazamiento de líquidos utilizando una solución ácida en una probeta invertida (pH <2). Cada día se recuperó la fracción soluble por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos y se caracterizó. Al final de los ensayos se tomaron muestras de biomasa y se almacenaron a -20 °C para su posterior caracterización de comunidades bacterianas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado

- Ensayos de producción de metano

Utilizando la fracción soluble obtenida de los pretratamientos a diferentes relaciones S_0/X_0 , se realizaron ensayos en lote con el fin de evaluar el efecto en la producción de metano. Se adicionó el inóculo productor de metano (8 g ST L⁻¹) en botellas serológicas con 30 mL de volumen de trabajo. Se purgó el espacio de cabeza con gas N₂ durante 15 s, para luego ser incubadas a 35 °C con agitación constante a 100 rpm. Los ensayos fueron realizados por duplicado. De manera paralela se corrió un control solo con lodo anaerobio para evaluar la producción endógena de metano. El biogás producido fue medido diariamente por desplazamiento de líquido utilizando una solución ácida en una probeta invertida y su composición fue analizada por cromatografía de gases. Por último, se realizó un análisis cinético ajustando los datos de producción de biogás al modelo modificado de Gompertz.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1. Actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales

Se llevó a cabo un ensayo en lote para validar la premisa que los microorganismos ruminales hidrolíticos tendrán actividad en presencia de microalgas. La actividad carbohidrolasa de los microorganismos ruminales fue inducida por la celulosa (60%) y hemicelulosa (40%) presente en la pared celular de *Scenedesmus* (Takeda, 1996), microalga predominante en el consorcio nativo empleado como sustrato. Después de 24 h de incubación del fluido ruminal con biomasa microalgal, ambas actividades CMCasa y xilanasa decaen un 92% y 85%, respectivamente (de 83 a 6 UI L⁻¹ para actividad CMCasa, y de 158 a 22 UI L⁻¹ para actividad xilanasa) (Figura 3). El decremento en la actividad enzimática puede ser explicado por cambios en la comunidad microbiana durante este periodo. En este sentido, Gijzen et al. (1986)

encontraron que inmediatamente después de la inoculación de un sistema continuo para la degradación de material lignocelulósico con fluido ruminal, había un decremento significativo en el número de protozoarios, los cuales además de las bacterias, llevan a cabo la degradación de material fibroso por acción de enzimas extracelulares. Por otro lado, la actividad amilasa tuvo un ligero incremento después de 96 horas, presentando un máximo de 12.72 UI L⁻¹ a las 144 horas. Ésta actividad puede ser debido a la disponibilidad de almidón intracelular que típicamente se encuentra en las microalgas y se libera tras la hidrólisis de la pared celular. Un incremento en la actividad xilanasa y amilasa observado a las 144g podría estar relacionado con un aumento lento y puntual de la hemicelulosa liberada.

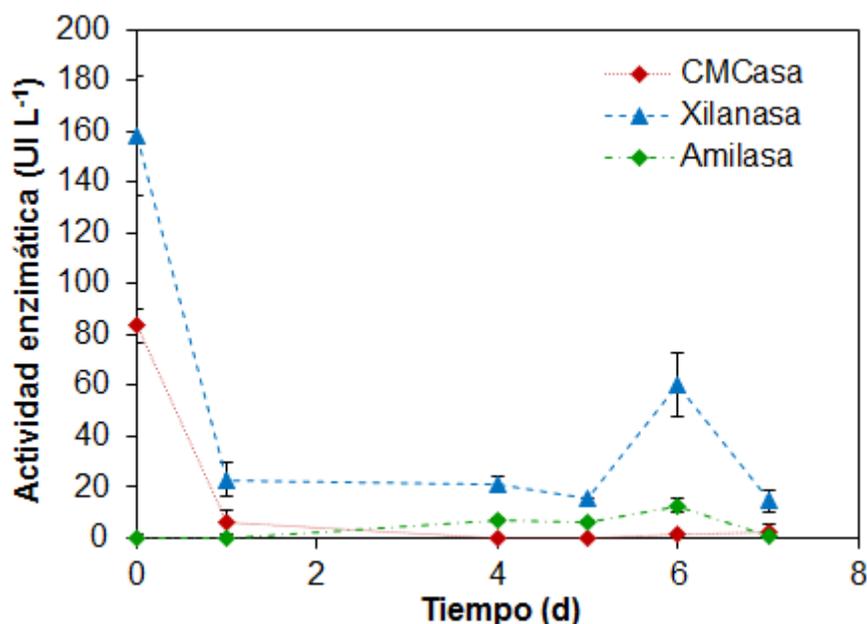


Figura 3. Actividad hidrolítica del fluido ruminal en presencia de biomasa microalga (3.5 g SV L⁻¹) usando 20%(v/v) de fluido ruminal como inóculo.

Lazuka et al. (2015) evaluaron la actividad carbohidrolasa del fluido ruminal en presencia de paja de trigo como sustrato en un cultivo en lote a 35 °C, reportando 40 y 810 UI L⁻¹ de actividad CMCasa y xilanasa, respectivamente, mucho más que los valores observados en este estudio usando microalgas. Ésta discrepancia en la actividad hidrolítica puede ser explicada por la diferencia en el contenido de hemicelulosa (26%) entre la paja de trigo y la microalga (9%). Además, *Scenedesmus* presenta una capa externa a la pared celular de polisacáridos compuesta de esporopoleninas (y algaenanos), compuesto tipo-lignina formado a partir de ácidos grasos hidroxilados y compuestos fenólicos que es resistente a la degradación química y biológica (Stahelin y Pickett-Heaps, 1975). Considerando la existencia de la pared recalcitrante tipo lignina de *Scenedesmus*, la disminución de las actividades carbohidrolasas iniciales sugieren que el cultivo hidrolítico debe

primero hidrolizar las esporopoleninas para posteriormente solubilizar los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y así lograr tener acceso a los polisacáridos de reserva (almidón) y demás contenido intracelular.

4.3.2. Enriquecimiento de microorganismos ruminales empleando reactores discontinuos secuenciales

Se llevó a cabo el enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos ruminales empleando cultivos discontinuos secuenciales, los cuales han sido empleados con éxito para enriquecer los microorganismos ruminales con capacidad hidrolítica en presencia de material lignocelulósico (Chang et al., 2010).

Los resultados de los controles positivos usando xilano y CMC indican que predominó la actividad xilanasa. El consumo de xilano al final de cada inoculación fue superior al 95% en las tres inoculaciones, mientras que el consumo de CMC fue de 1.5% y 5%, al final de la primera y tercera inoculación, respectivamente. La tasa específica de consumo de sustrato máxima (q_{smax}) para xilano incrementó 3.3 veces de la primera a la tercera inoculación (de 0.5 a 1.6 g xilano $g^{-1} SSV^{-1} d^{-1}$); en los cultivos con CMC, la q_{smax} aumentó 3.8 veces (de 5.9 a 22.3 mg CMC $g^{-1} SSV^{-1} d^{-1}$). Estos resultados demuestran el enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos. Chang et al. (2010) reportaron que un consorcio bacteriano de rumen obtenido por ésta misma estrategia fue capaz de degradar 27% de hemicelulosa y 2% de celulosa al emplear pasto de Napier como sustrato. A diferencia de la celulosa, el xilano es un biopolímero ramificado, estas ramificaciones conllevan a una estructura amorfa lo cual se ve reflejado en una mayor tasa de consumo en comparación con la tasa de consumo de CMC (Scheller y Ulvskov, 2010).

En los ensayos con biomasa microalgal como sustrato se usó la solubilización de DQO particulada como medida indirecta de la actividad hidrolítica (He et al., 2016). Durante la primera y segunda inoculación no se encontraron diferencias significativas en la solubilización de DQO, de modo que solo se presentan los datos de la primera y tercera inoculación, donde los cambios fueron significativos. La máxima solubilización de DQO se alcanzó a los 3 días. Para una concentración de biomasa de 3.5 g ST L^{-1} , la tercera inoculación muestra una tendencia al incremento en actividad hidrolítica, reflejado en un aumento en la solubilización de DQO (Figura 4a), llegando a solubilizar hasta 0.30 g DQO $g^{-1} ST^{-1}$. Del total de la DQO soluble, 13% corresponde a carbohidratos y 60% a AGVs (Tabla 6). No obstante, al final de la tercera inoculación hubo un decremento en la DQO soluble, lo que puede atribuirse al consumo de azúcares o AGVs por bacterias ruminales como ha discutido Flint et al. (2008).

En el ensayo con 7 g-ST L^{-1} de microalga se alcanzó una mayor solubilización de DQO (Figura 4b) que con una menor concentración, alcanzando 0.42 g DQO $g^{-1} ST^{-1}$. La DQO soluble tuvo una composición de azúcares y AGVs similar al ensayo con 3.5 g ST L^{-1} (13% y 42%, respectivamente). En ambos ensayos, el ácido acético fue

el AGV predominante (hasta el 50%). Éste alto contenido de AGVs hace al efluente obtenido del pretratamiento un buen sustrato para la digestión anaerobia (He et al., 2016).

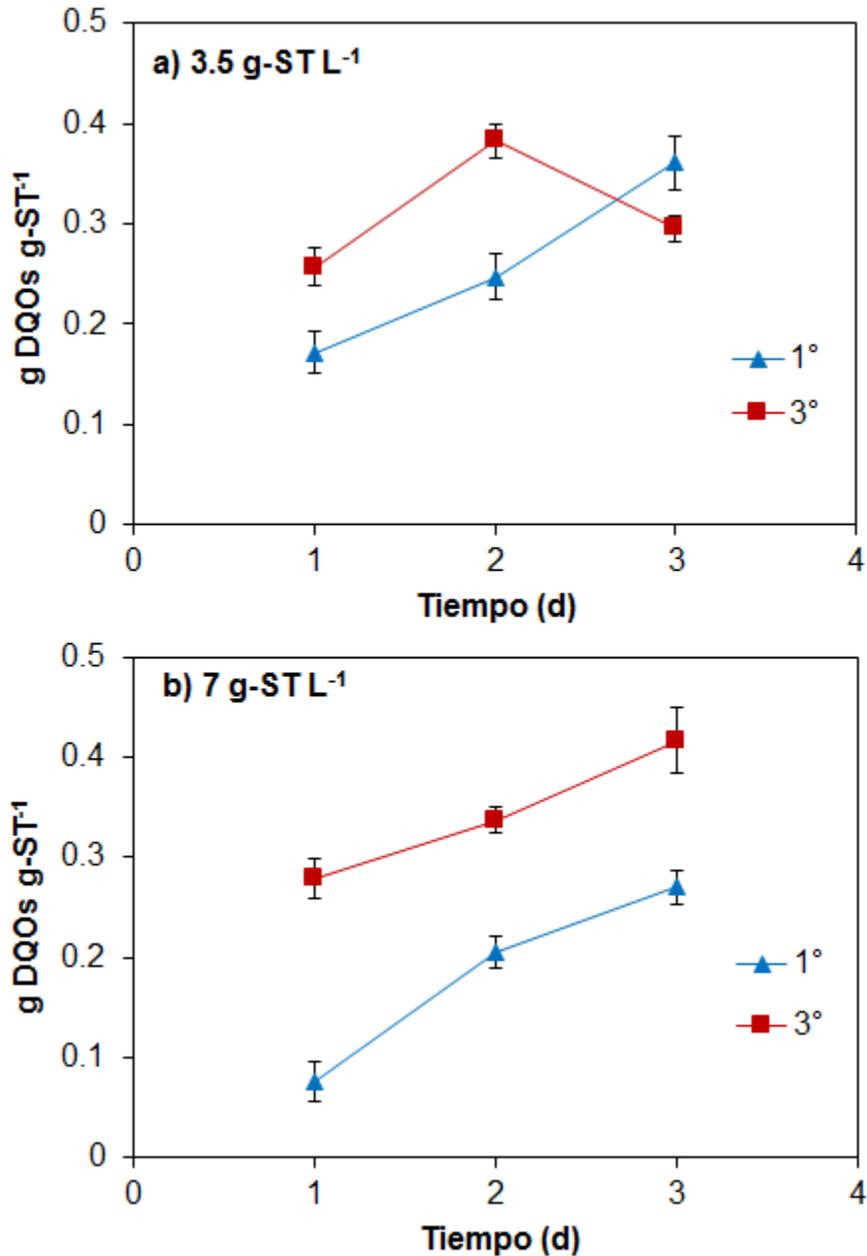


Figura 4. Enriquecimiento de microorganismos ruminales por cultivos por lote repetido. Se empleó 1% (v/v) de rumen y microalgas a 3.5 g ST L⁻¹ (a) y 7 g ST L⁻¹ (b).

Tabla 6. DQO soluble obtenida al tercer día para la primera y tercera inoculación considerado DQO total y la DQO equivalente para azúcares y AGVs

Concentración de microalga	Inoculación	g DQO _s g-ST ⁻¹		% (azúcares)	DQO (azúcares)	%DQO (AGVs)
		Total	Azúcares + AGVs			
3.5 g ST L ⁻¹	1 ^a	0.36	0.24	19		43
	3 ^a	0.30	0.14	14		31
7 g ST L ⁻¹	1 ^a	0.27	0.17	13		49
	3 ^a	0.42	0.24	13		43

Considerando que la biomasa microalgal tiene una equivalencia de 1.82 g DQO g-ST⁻¹ microalga, la máxima eficiencia de hidrólisis que se obtuvo fue de un 23% empleando 7 g ST L⁻¹. El resultado obtenido en este estudio es ligeramente superior que el observado durante el pretratamiento de un cultivo de *Chlorella sp.* con *Bacillus licheniformis* (0.344 g-DQO g-ST⁻¹ y 60 h de incubación) (He et al., 2016). En otro estudio, sobre hidrólisis enzimática de *Scenedesmus sp.*, empleando tanto enzimas puras como cocteles enzimáticos, reportan una eficiencia de hidrólisis de hasta 20% después de 3 horas de incubación (Mahdy et al., 2016). Si bien el empleo de un cultivo ruminal implicó un mayor tiempo de incubación que el trabajo previamente citado, el uso de bacterias hidrolíticas favorece su uso continuo a diferencia del uso de enzimas comerciales que requieren su constante adición con los costos asociados. Además, el incremento en la actividad hidrolítica durante la tercera inoculación demostró que es posible mantener un cultivo hidrolítico a partir de una primera inoculación.

4.3.3. Efecto de la relación inicial S_0/X_0

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos tras el pretratamiento de microalgas a diferentes relaciones iniciales S_0/X_0 . Se realizó un análisis de varianza de un solo factor el cual revela que hay diferencia significativa en al menos dos de los tratamientos estudiados ($p < 0.016$) y que la DQO soluble obtenida empleando una relación $S_0/X_0 = 0.5$ (29% de eficiencia de hidrólisis) fue significativamente mayor. Además, la solubilización de DQO particulada (DQO_p) empleando una relación $S_0/X_0 = 0.5$ fue 1.22 veces mayor que el mejor resultado obtenido en el apartado anterior (7 g ST L⁻¹); así como también 1.55 veces más alto que el valor reportado por He et al. (2016). Budiyo et al. (2009) estudiaron la influencia de la relación S_0/X_0 (de 1 a 4) empleando fluido ruminal y estiércol de cerdo y evaluaron su efecto sobre la producción de biogás, encontraron que a menor relación S_0/X_0 la producción de biogás incrementaba. El resultado obtenido en el presente estudio indica que una relación $S_0/X_0 = 0.5$ maximiza la solubilización de DQO_p (Figura 5).

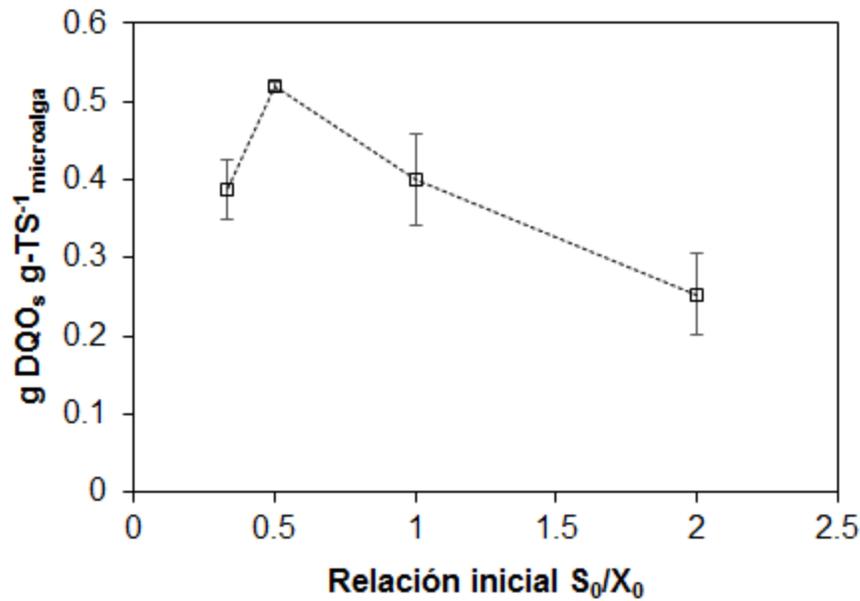


Figura 5. Efecto de la relación inicial microalga a fluido ruminal sobre la solubilización de DQO.

La fracción soluble obtenida de los ensayos S_0/X_0 fue llevada a digestión anaerobia (Tabla 7). La máxima producción de metano alcanzada corresponde a un 55% de biodegradabilidad anaerobia, asumiendo que la completa biodegradación de DQO corresponde a 350 mL $CH_4\ g\text{-}DQO^{-1}$ (Angelidaki y Sanders, 2004). La limitada producción de metano a partir de la fracción soluble puede ser explicada por el alto contenido de proteínas (Tabla 7); las cuales generalmente tiene una relación C/N cercana a 10; mientras que, la óptima relación C/N para digestión anaerobia es entre 20 y 25 (Yen y Brune, 2007).

De entre los parámetros de Gompertz obtenidos a distintas relaciones S_0/X_0 , un ANOVA de un solo factor muestra que solo hubo un efecto significativo sobre la tasa específica de producción de metano ($p=0.0005$). La Figura 6 demuestra que a medida que la concentración de sustrato aumenta, la producción de metano incrementa. Por su parte, la tasa específica de producción de metano incrementa a medida que la relación S_0/X_0 disminuye, lo que significa que se genera un efluente más fácilmente biodegradable empleando las relaciones de 0.5 y 0.33. Empleando una relación $S_0/X_0=0.5$, fue posible remover el 88% de la DQO; mientras que con 0.33 y 1 se removió solo el 78% y con una relación de 2 se logró remover el 82%.

Los rendimientos de metano variaron de 155 a 193 mL $CH_4\ g\text{-}DQO^{-1}$ (Tabla 7) y para el caso ($S_0/X_0=0.5$) con el mejor rendimiento de metano se obtuvo una tasa de producción de 3.65 mL $CH_4\ g\text{-}DQO^{-1}h^{-1}$ (Tabla 7). Estos valores son semejantes a otros valores reportados para hidrólisis de biomasa de *Scenedesmus*. Por ejemplo, empleando enzimas comerciales, se alcanzó una biodegradabilidad del 52% (184

mL CH₄ g-DQO⁻¹) y 62%(216 mL CH₄ g-DQO⁻¹) usando enzimas con actividad carbohidrolasa y proteasa, respectivamente (Mahdy et al., 2016). Aplicando un pretratamiento térmico (90°C por 1.5h) González-Fernández et al.(2012c) reportaron un rendimiento de metano de 170 mL CH₄ g-DQO⁻¹. Estudios recientes demuestran que la producción de metano puede ser mejorada usando microorganismos ruminales como inóculo (Giménez et al., 2017). En éste último trabajo reportan un rendimiento de metano de 214 mL CH₄ g-DQO⁻¹ empleando un biorreactor anaerobio con membrana.

La productividad es un factor clave para cualquier proceso, en términos de velocidad de producción, el tratamiento completo de la mejor condición duró 7 días (3 días de pretratamiento con fluido ruminal y 4 días en alcanzar la fase estacionaria en el proceso de producción de metano). En este sentido, estos resultados fueron obtenidos entre 3 y 4.7 veces más rápido que aquellos reportados con otros pretratamientos, como el térmico y biológicos, tanto con cultivos hidrolíticos como con enzimas comerciales, donde la cinética de producción de metano duró de 22.5 a 33 días (González-Fernández et al., 2012c; He et al., 2016; Mahdy et al., 2016). Además, la tasa de producción fue al menos de 2 a 4 veces más rápido que cuando empleando lodo anaerobio bioaumentado con hongos ruminales (Aydin et al., 2017) y cuando se usó fluido ruminal como inóculo productor de metano (Giménez et al., 2017).

Giménez et al. (2017) demostraron que es posible mantener un sistema semi-continuo productor de metano usando como inóculo fluido ruminal hasta por 190 días con un tiempo de retención hidráulico de 31 días. Este último trabajo citado y el ensayo de enriquecimiento (sección 4.3.2) sugieren que es posible implementar un sistema continuo para el pretratamiento de microalgas basado en microorganismos ruminales y mantener su actividad hidrolítica. De acuerdo con esto, son necesarios estudios a largo plazo.

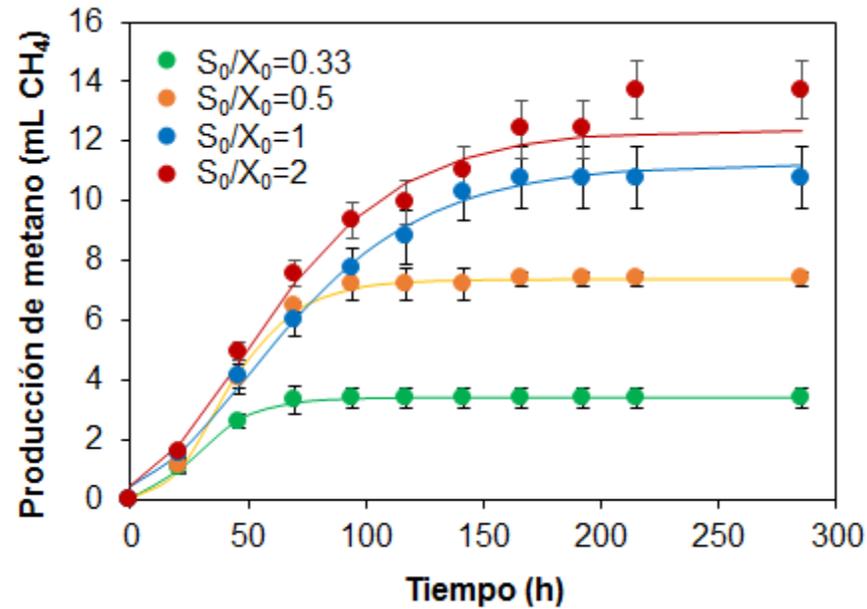


Figura 6. Efecto de la relación S_0/X_0 sobre la producción de metano

Tabla 7. Caracterización de la fracción soluble y parámetros cinéticos de la producción de metano de la fracción soluble obtenida durante el pretratamiento de biomasa microalgal con fluido ruminal

Relación S_0/X_0	g DQO _s g-ST ⁻¹	%DQO (azúcares)	% DQO (proteínas)	%DQO (AGVs)	Y_{max} (mL CH ₄ g-DQO ⁻¹)	R_{max} específica (mL CH ₄ g-DQO ⁻¹ h ⁻¹)	λ (h)	% CH ₄ en el biogás
0.33	0.39 ± 0.04	8	82	5	183	4.28	8.12	40
0.5	0.53 ± 0.004	5	71	6	193	3.65	14.8	53
1	0.40 ± 0.06	5	47	7	172	1.57	7.9	33
2	0.25 ± 0.05	7	57	19	155	1.18	4	45
Resultado del ANOVA								
Valor p	0.016				0.123	5 x 10 ⁻⁴		

Y_{Max} se obtuvo dividiendo el valor de M_{max} entre la cantidad de DQO consumida. $R^2 > 0.98$ en todos los casos.

4.3.4. Análisis de la comunidad microbiana

4.3.4.1. Composición inicial de la comunidad bacteriana

Con el objetivo de discernir la aportación de bacterias tanto del inóculo como del cultivo nativo de microalgas, se llevó a cabo la caracterización y comparación de la comunidad bacteriana de los controles descritos en la sección 4.2.2.2. Respecto al fluido ruminal, las bacterias hidrolíticas de los géneros *Fibrobacter* y *Ruminococcus* fue menor al 0.1%, a diferencia de lo reportado en ovejas y vacas, donde estos géneros representan entre el 3.5-18% y <1.5-3.6%, respectivamente (Castro-Carrera et al., 2014; Petri et al., 2013). Esta variación de la composición de la comunidad puede deberse a distintos factores como la dieta de los rumiantes (Petri et al., 2013). Otros géneros relevantes identificados, por su actividad carbohidrolasa, fueron *Paludibacter*, *Prevotella* y *Butyricimonas*, los cuales representan una abundancia relativa del 33% (Flint et al., 2008; Gronow et al., 2011; Koropatkin et al., 2012).

En la biomasa microalgal se encontró una proporción muy alta de *Pseudomonas* (88%), seguido de bacterias clostridiales (5%). Las bacterias del género *Pseudomonas* son muy versátiles para degradar compuestos recalcitrantes como cutina, lignina, alcanos o compuestos aromáticos (compuestos presentes en las esporopoleninas) bajo condiciones anaerobias (Haritash y Kaushik, 2009; McNally et al., 1998; Singh et al., 2016; Taylor, 1983). Además, se han aislado bacterias de éste género en moluscos que de forma natural degradan microalgas (Muñoz et al., 2014). Sin embargo, no se ha reportado alguna actividad carbohidrolasa para *Pseudomonas* en condiciones de anaerobiosis, lo que obstaculiza la autohidrólisis de la biomasa algal. En el presente trabajo la autohidrólisis fue de tan solo 0.091 g DQO_s g-ST⁻¹, lo que representa apenas un 5% de la DQO particulada y es hasta 5.7 veces menor que el ensayo con una relación S₀/X₀ de 0.5. También, estudios recientes demuestran que la autohidrólisis no tiene efecto en la mejora de la recuperación de metano en comparación con la biomasa microalgal sin pretratamiento (Mahdy et al., 2016). Este análisis de la comunidad bacteriana en cultivo nativo de microalga corrobora que la autohidrólisis no es una opción viable de pretratamiento, ya que no presenta bacterias de capacidad carbohidrolasa relevante.

Después de la incubación del fluido ruminal como control, los géneros bacterianos predominantes fueron *Pseudomonas* y *Chryseobacterium*, con abundancias relativas del 54.5% y 10.6%, respectivamente. La abundancia relativa de *Pseudomonas* en ambos controles (fluido ruminal y consorcio de microalgas) resalta la característica ubicua de éste género (Singh et al., 2016). En este sentido, en ensayos posteriores de enriquecimiento del cultivo ruminal con el cultivo de microalgas, se presume que *Pseudomonas* puede provenir de ambos cultivos.

4.3.4.2. Enriquecimiento de la comunidad bacteriana

A pesar de que trabajos previos usan microorganismo ruminales para digerir microalgas, el presente trabajo describe la selección de la comunidad bacteriana ruminal sobre dicho sustrato y su contribución a la hidrólisis de microalgas. La Figura 7a presenta la abundancia relativa de las OTUs encontradas en las comunidades desarrolladas en el ensayo de enriquecimiento, así como su similitud. El análisis de cluster revela que la comunidad bacteriana que inicialmente se encontraba en el fluido ruminal guarda mayor similitud con aquella que logró adaptarse al consumo de xilano al final del enriquecimiento, esto sugiere que la dieta del toro del cual se obtuvo el fluido ruminal era rica en hemicelulosa. Lo cual se relaciona con el hecho que las bacterias más abundantes en estas muestras son bacterias de la clase Bacteroidia (géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Paludibacter*), las cuales se caracterizan por poseer actividad β -glucanasa y amilasa (Flint et al., 2008; Gronow et al., 2011; Salyers et al., 1977). Otros géneros bacterianos con actividad carbohidrolasa seleccionados en presencia de xilano fueron *Klebsiella* (4.7%) y *Acinetobacter* (6.4%), las cuales pertenecen a la clase Gammaproteobacteria (Dantur et al., 2015; Pourramezan et al., 2012), además una gran abundancia de bacterias fermentativas (21.4% *Enterobacter*).

A pesar que la comunidad bacteriana seleccionada en el control solo con microalgas fue similar a la obtenida de crecer fluido ruminal sobre CMC (Figura 7a), los géneros identificados tienen diferentes actividades hidrolíticas. En este sentido, en el control de microalga *Pseudomonas* representó el 88%; mientras que en el cultivo con CMC, *Acinetobacter* fue el género predominante (hasta 51% del total), seguido de *Comamonas* (12.4%) y *Clostridium* (11.3%). Ya ha sido anteriormente reportado que los géneros *Acinetobacter* y *Clostridium* poseen actividad CMCasa (Pourramezan et al., 2012; Tracy et al., 2012), mientras que *Comamonas*, presenta actividad β -glucosidasa (Choi et al., 2010).

Un tercer grupo lo constituyen las comunidades bacterianas crecidas en biomasa microalgal (3.5 y 7 g ST L⁻¹), que son el resultado del enriquecimiento de las bacterias propias del fluido ruminal y de aquellas presentes en la biomasa microalgal. Las bacterias celulolíticas (y/o hemicelulolíticas) seleccionadas al final de los ensayos con 3.5 g ST L⁻¹ fueron *Clostridium* (3.2%), *Caulobacter* (2.5%), *Caloramator* (3%), *Bacteroides* (2.4%), *Bosea* (2%) y *Mesorhizobium* (1.3%) (Jiménez et al., 2016; Sadhu et al., 2012; Sethi et al., 2013; Tracy et al., 2012), mientras que con 7 g ST L⁻¹, *Clostridium* (16%) fue el género más abundante. Por otro lado, dentro de las bacterias con actividad ligninolítica, *Rhodobacter* (1%) y *Synergistes* (12.8%) (Allison et al., 1992; Li et al., 2009) fueron seleccionadas en presencia de 3.5 g ST L⁻¹; no obstante, al incubar fluido ruminal con 7 g ST L⁻¹, *Pseudomonas* (25%) y *Synergistes* (19%) predominaron en la comunidad microbiana.

En años recientes se ha reportado que los géneros *Mesorhizobium* y *Caulobacter* son capaces de degradar material lignocelulósico (Jiménez et al., 2016; Sethi et al., 2013). Los miembros del género *Mesorhizobium* han despertado gran interés en la degradación de material lignocelulósico, a tal grado que su capacidad para degradar material fibroso es más alta que la de los hongos de pudrición blanca como *Trichoderma* o *Aspergillus* (Sethi et al., 2013). De este análisis de la comunidad bacteriana se puede inferir que las bacterias con alta actividad carbohidrolasa (como *Bacteroides*, *Caulobacter* y *Mesorhizobium*) seleccionadas provienen del fluido ruminal.

4.3.4.3. Efecto de la relación S_0/X_0 sobre la comunidad bacteriana

El mapa de calor construido con las OTUs seleccionadas en función de las distintas relaciones S_0/X_0 se muestra en la Figura 7b. En el cluster de inóculo y relación S_0/X_0 de 2, los clostridios son las bacterias comunes más abundantes, las cuales se caracterizan por poseer distintas actividades carbohidrolasas (Tracy et al., 2012). Presumiblemente estas bacterias jugaron un papel importante en la hidrólisis de la pared celular de las microalgas. Sin embargo, estas bacterias no tienen capacidad de degradar compuestos tipo lignina, lo que probablemente limitó la hidrólisis de la pared celular de las microalgas y por tanto la menor solubilización de DQO (y menor recuperación de metano) que se encontró en una relación $S_0/X_0 = 2$ (Figura 7).

Otro cluster identificado debido a la similitud de las comunidades es el comprendido por el control de biomasa algal y el ensayo con una relación S_0/X_0 de 0.33. Las comunidades bacterias en estos ensayos seleccionaron casi de forma exclusiva a la clase Gammaproteobacteria, dentro de esta clase el género que domino casi en su totalidad fue *Pseudomonas* (hasta 96% de toda la clase Gammaproteobacteria); estas bacterias pueden degradar lignina y se han encontrado en moluscos que en su habitat natural degradan microalgas (Haritash y Kaushik, 2009; Muñoz et al., 2014) (Haritash y Kaushik, 2009; Muñoz et al., 2014). No obstante, algo que pudo haber limitado la hidrólisis de la pared celular de las microalgas para una relación S_0/X_0 de 0.33, es la baja actividad carbohidrolasa, ya que la clase Clostridia junto con la Bacteroidia suman apenas una abundancia relativa del 13%.

Las comunidades bacterianas seleccionadas por el control con fluido ruminal y, las relaciones S_0/X_0 de 0.5 y 1 formaron un tercer cluster (Figura 7). Estos ensayos mostraron las mejores eficiencias de hidrólisis y rendimientos de metano. Para una relación S_0/X_0 de 0.5 (condición óptima), el género con actividad hidrolítica más abundante fue *Pseudomonas*, con un 45.9% de abundancia relativa; seguido de *Proteocatella* (3.7%), los miembros de éste género se caracterizan por poseer actividad proteolítica, quitinolítica y amilolítica (Pikuta et al., 2009). Un tercer género identificado fue *Clostridium* (2.7%), con capacidad de degradar diversos polisacáridos estructurales (Tracy et al., 2012).

En ambos ensayos, enriquecimiento y diferentes relaciones S_0/X_0 , muestran similitud en los géneros bacterianos seleccionados, siendo *Pseudomonas* y *Clostridium* los más abundantes. Otros géneros que fueron encontrados en menor proporción en todos los ensayos fueron: *Caulobacter*, *Methorizobium*, *Bosea*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Tyzzerella*, bacterias que se caracterizan por su capacidad de degradar polisacáridos estructurales; mientras que la bacteria proteolítica más abundante fue *Proteocatella*.

4.4. Conclusiones

Se demostró el uso de fluido ruminal enriquecido como fuente de microorganismos hidrolíticos para el pretratamiento de un consorcio nativo de microalgas y su posterior recuperación de metano. Una relación microalga a fluido ruminal de 0.5 fue la mejor en términos de eficiencia de hidrólisis y de rendimiento de metano. El proceso completo (pretratamiento y metanización) fue de tan solo 7 días. Las bacterias hidrolíticas más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Proteocatella*. Son necesarios estudios adicionales para evaluar el pretratamiento de microalgas en un sistema continuo a fin de optimizar los parámetros operacionales y evaluar la estabilidad del sistema.

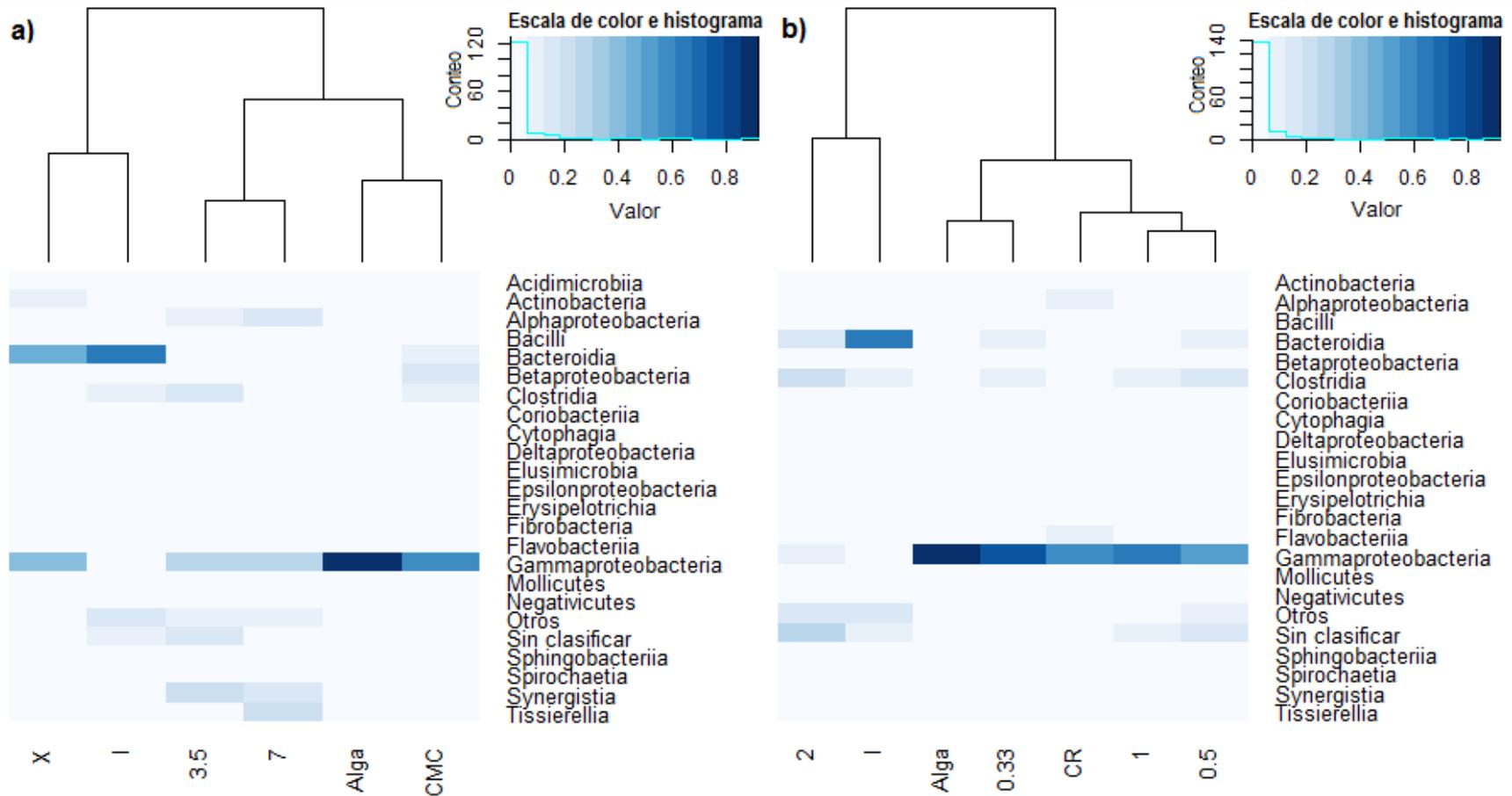


Figura 7. Mapa de calor de la composición de la comunidad bacteriana, a nivel de clase, resultante del proceso enriquecimiento (a); I = inóculo; Alga= control de biomasa algal; X = xilano; CMC = caboximetilcelulosa; 3.5 y 7 g ST L⁻¹ de biomasa algal.(b) Ensayos a distintas relaciones S₀/X₀: 0.33, 0.5, 1 y 2; así como los controles: I = inóculo; Alga = control de biomasa algal; y CR = control de fluido ruminal.

CAPITULO 5

HIDRÓLISIS DE BIOMASA MICROALGAL POR MICROORGANISMOS RUMINALES Y LA SUBSECUENTE PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS

Resumen

El pretratamiento de biomasa microalgal (98% *Scenedesmus*) por microorganismos ruminales fue estudiado en un reactor anaerobio discontinuo secuencial. Manipulando el tiempo de retención hidráulico (TRH) fue posible obtener un hidrolizado susceptible a utilizarse en fermentación oscura o metanogénesis. Primero, con un TRH de 2 d se solubilizó el 24% de la DQO y se recuperó por fermentación oscura 49 mL H₂ g-SV⁻¹ (1.7 veces más que con biomasa fresca). Posteriormente, se varió el TRH para obtener un hidrolizado rico en AGVs y una alta eficiencia de hidrólisis (60%), después de 6 ciclos de operación continua el TRH disminuyó de 32 a 8 días. La metanización de este efluente rindió 285 mL CH₄ g-DQO⁻¹ (2.9 veces más que el control). Las bacterias hidrolíticas más abundantes fueron: *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Acinetobacter* y *Proteocatella*. La eficiencia de hidrólisis y rendimiento de metano alcanzados, son los más altos reportados en el pretratamiento de *Scenedesmus*.

Este capítulo está basado en la publicación en preparación:

Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Semi-continuous pretreatment of microalgal biomass with ruminal microorganisms to increase the gaseous biofuels recovery.

5.1. Introducción

Las microalgas pueden fijar carbono y son una fuente potencial para la obtención de biocombustibles gaseosos (hidrógeno y metano) por varias razones: altas velocidades de crecimiento, alto contenido de lípidos y carbohidratos, pueden ser cultivadas en agua residuales y no compiten con los cultivos alimenticios. La definición de microalgas incluye todos aquellos microorganismos unicelulares y multicelulares simples, incluyendo tanto microalgas procariontas, por ejemplo, cianobacterias (*Chloroxybacteria*), y microalgas eucariotas, por ejemplo, algas verdes (*Chlorophyta*), algas rojas (*Rhodophyta*) y diatomeas (*Bacillariophyta*) (Brennan y Owende, 2010).

Sin embargo, la pared celular de algunas especies de microalgas (como es el caso de *Scenedesmus*), consiste de carbohidratos complejos de baja biodegradabilidad y biodisponibilidad. Estas paredes celulares resistentes dificultan el proceso de digestión pues la materia orgánica retenida en el citoplasma no se encuentra disponible a los microorganismos anaerobios (Mussnug et al., 2010).

La composición de la pared celular de las microalgas varía de acuerdo a la especie. En promedio contiene 25-30% de celulosa, 15-25% de hemicelulosa, 35% de pectina y 5-10% de glicoproteínas (González-Fernández et al., 2012a). Además, algunos géneros de microalgas (*Nannochloropsis* y *Scenedesmus*) poseen una capa externa de esporopoleninas, compuestos resistentes al ataque químico y enzimático (González-Fernández et al., 2012a).

De modo que para incrementar la digestibilidad de la microalga por los microorganismos anaerobios es necesario llevar a cabo un pretratamiento, el cual puede ser termo-químico, mecánico y/o biológico. Los pretratamientos termo-químicos han mostrado altas eficiencias, pero tienen el inconveniente de generar compuestos químicos inhibitorios (Passos et al., 2014). Los pretratamientos mecánicos han sido muy empleados y su eficiencia es independiente de las características de la microalga en estudio; sin embargo, la energía que se gasta durante el pretratamiento no se compensa con la energía ganada como metano (Lee et al., 2012).

En este sentido los pretratamientos biológicos han despertado gran interés debido a que se pueden realizar en condiciones suaves de reacción, no hay formación de compuestos inhibitorios y baja demanda energética (factor crucial para el escalamiento). La hidrólisis enzimática mejora considerablemente los rendimientos y es una alternativa a los pretratamientos antes mencionados; no obstante, sus elevados costos y su incapacidad de poder reutilizarlas limitan su aplicación a escala industrial (Muñoz et al., 2014). Recientemente, Carrillo-Reyes et al. (2016) llevaron a cabo una discusión sobre los pretratamientos biológicos aplicados a biomasa microalgal y sugirieron el uso de cultivos hidrolíticos naturales, como el que se encuentra en el tubo digestivo de termitas y rumen de rumiantes. El rumen es un

ecosistema anaerobio donde bacterias, protozoarios y hongos llevan a cabo la degradación de material lignocelulósico con alta productividad de ácidos grasos volátiles (AGVs) siendo los ácidos acético, propiónico y butírico, los AGVs predominantes (Nagaraja, 2016; Van Soest, 1994).

La gran eficiencia de los microorganismos ruminales para degradar complejos celulósicos se debe a que estos se adhieren al sustrato a través de complejos enzimáticos presentes en la membrana celular externa (celulosomas), logrando con esto un desacoplamiento entre los tiempos de retención hidráulico (TRH) del de sólidos (TRS), de modo que hay remoción de productos finales de la fermentación (por absorción, eructos o pasaje) que pudieran inhibir el proceso de degradación (Bayané y Guiot, 2011).

En este sentido, los AGVs producidos son absorbidos por las papilas ruminales, de igual modo el hidrógeno producido por las bacterias celulolíticas es consumido por arqueas para posteriormente ser eliminado, de esta forma se evita una inhibición por producto final (Bayané y Guiot, 2011). Hu y Yu (2005) emplearon un sistema semi-continuo de degradación de cascarilla de arroz por microorganismos ruminales, ellos demostraron altas eficiencias de degradación de fibra detergente neutro (FDN) con un TRS de 3-4 días y un TRH entre 12-18 horas. A mayores TRHs decrece la degradación de FDN, probablemente a una disminución del pH debido a la acumulación de AGVs.

Dada la similitud de la pared celular de las microalgas con la de biomasa lignocelulósica; recientemente, Giménez et al. (2017) reportaron el uso de un fermentador anaerobio tipo-rumen para producir metano a partir de la microalga *Scenedesmus*, alcanzando hasta 214 mL CH₄ g-DQO⁻¹ empleando un TRH de 31 días y TRS de 100 días. Sin embargo, solo arqueas hidrogenotróficas (géneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*) han sido identificadas en muestras de fluido ruminal (Russell y Rychlik, 2001; Van Soest, 1994).

Aunado a esto, diversos estudios han demostrado el potencial de los microorganismos ruminales para producir AGVs a partir de biomasa lignocelulósica (o microalgal) en sistemas semi-continuos (Lazuka et al., 2015; Zhao et al., 2016), incluso sin producción de metano (Hu y Yu, 2005).

Lo anterior demuestra que el fluido ruminal presenta una alta actividad hidrolítica que puede ser aprovechada en el pretratamiento de biomasa algal. En este sentido, Barragán-Trinidad et al. (2017) demostraron el potencial de los microorganismos ruminales para llevar a cabo el pretratamiento de un cultivo nativo mixto de microalgas (esencialmente *Scenedesmus*), alcanzando en la metanización un rendimiento de metano de 192 mL CH₄ g-DQO⁻¹. Ellos encontraron que separando el proceso en dos etapas (pretratamiento más metanización) el tiempo total de proceso disminuía significativamente a tan solo 7 días.

Pocas referencias hay sobre la aplicación de fluido ruminal en la producción de hidrógeno a partir de complejos celulósicos. Hu y Yu (2005) empleando un sistema semi-continuo llevaron a cabo la fermentación anaerobia de hojarasca de maíz por microorganismos ruminales, alcanzando una velocidad específica de producción de hidrogeno de hasta 38 mL g-SV⁻¹. Recientemente, Zhang et al. (2017) empleando cultivos por lote repetidos obtuvieron un cultivo enriquecido en bacterias productoras de hidrógeno a partir de fluido ruminal, empleando celulosa como sustrato (Avicel o celulosa microcristalina), después de 3 resiembras, alcanzaron un rendimiento de hidrógeno de 188.6 mL H₂ g⁻¹, el mayor rendimiento reportado para este tipo de sustrato ricos en celulosa.

Recientemente, Barragán-Trinidad et al. (2017) reportaron que tiempos de reacción superiores a 3 días conllevan a una disminución de los azúcares en la fracción soluble (hasta 19% de DQO equivalente); sin embargo, en sus mejores condiciones los AGVs aún representaban menos del 50% de la DQO soluble. El bajo contenido de AGVs puede deberse a que se requieren tiempos de reacción superiores. Zhao et al. (2016) estudiaron el efecto del TRH (4.2, 8, 12 y 16 días) sobre la producción de AGVs empleando microalgas como sustrato (y fluido ruminal como inóculo), encontrando que a medida que el TRH aumenta también lo hace el rendimiento de AGVs, encontrando la máxima productividad con TRH de 12 días. Los resultados anteriores demuestran que los reactores anaerobios discontinuos secuenciales (AnSBR) ofrecen una alternativa para realizar estudios a largo plazo de la degradabilidad de biomasa celulósicas en modo semi-continuo; esto debido a que permiten desacoplar el TRH del TRS. Además, empleando un TRH menor a 3 días es posible recuperar un efluente rico en azúcares; mientras que a TRH mayores se promueve la recuperación de AGVs.

Asumiendo que los complejos celulósicos presentes en la pared celular de las microalgas son responsables de su baja biodegradabilidad anaerobia, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el pretratamiento de biomasa microalgal por microorganismos ruminales en modo semi-continuo, variando el TRH a fin de conseguir un hidrolizado rico en AGVs o azúcares, para incrementar la producción de metano o hidrógeno en una etapa subsecuente. Además, la comunidad bacteriana seleccionada fue caracterizada en base al 16S rADN empleando secuenciación masiva de alta eficiencia.

5.2. Materiales y métodos

5.2.2. Diseño de experimentos

5.2.2.1. Hidrólisis semi-continua de biomasa microalgal

Se empleó un Reactor Anaerobio Discontinuo Secuencial (AnSBR) con 1L de volumen de trabajo (Applikon Bioreactor Systems, Netherlands). El reactor fue inoculado con 10 g SV L⁻¹ de fluido ruminal y 5 g SV L⁻¹ de biomasa microalgal como

sustrato, a una relación S_0/X_0 de 0.5 de acuerdo a Barragán-Trinidad et al. (2017), empleando medio MCDougall (1948). Se mantuvo agitación constante de 150 rpm y condiciones de proceso que simulan el ambiente ruminal: pH 7, 39 °C y TRH variable. El tiempo de alimentación y, sedimentación y decantación fue de 0.5 y 1 h, respectivamente; el tiempo de reacción fue variable. En cada ciclo el 50% del sobrenadante fue reemplazado con medio fresco con microalga a 5 g SV L⁻¹.

Con el fin de favorecer la recuperación de azúcares del cultivo hidrolizado se evaluaron dos valores de TRH (2 y 3 d) durante 45 días. Este efluente será empleado para la producción de hidrógeno en una etapa subsecuente. En un ensayo posterior, con el fin de obtener un efluente rico en AGVs, el cual se someterá después a metanización, se fue disminuyendo el TRH de manera variable hasta obtener una eficiencia de hidrólisis del 60% de manera estable. El criterio de estabilidad se fijó con al menos 3 ciclos con la misma eficiencia de hidrólisis con un coeficiente de variación <10%. Se tomaron muestras diariamente para caracterizar la eficiencia de hidrólisis cuantificada como DQO soluble (Mahdy et al., 2016); así como azúcares y actividad carbohidrolasa (CMCasa o endoglucanasa, xilanasa y α -amilasa), AGVs y alcoholes. Al final del ensayo se tomaron muestras de biomasa y se almacenaron a -20°C para la posterior caracterización de la comunidad bacteriana.

El TRS se calculó con base en base a la siguiente relación:

$$\text{TRS} = \text{TRH} \left(\frac{\text{MLVSS}}{x_e} \right)$$

donde, MLVSS es la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el licor de mezclado y “ x_e ” es la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente.

5.2.2.2. Ensayos de producción de hidrógeno

El hidrolizado enriquecido en azúcares fue utilizado como sustrato para ensayos de producción de hidrógeno en lote. Se empleó una relación sustrato a inóculo de 0.5 con una concentración de inóculo de 6.7 g SV L⁻¹. Los experimentos fueron realizados por triplicado en botellas serológicas de 120 mL con 80 mL de volumen de trabajo, empleando un medio mineral descrito previamente por Mizuno (2000), con un pH inicial de 6.5, 35°C y agitación constante (150 rpm). Todas las botellas se cerraron con tapones de goma butílica y se sellaron con tapas de aluminio. El espacio de cabeza se purgó con N₂ por 1 min. De forma paralela se corrieron controles con biomasa sin pretratamiento; así como también controles solo con microalga y con lodo anaerobio tratado térmicamente, a fin de restar la producción endógena de hidrógeno. La producción de hidrógeno fue medida por desplazamiento de líquido de una solución ácida (pH 2) y su composición fue caracterizada por cromatografía de gases (sección 3.6.1). Al final de la cinética, la

fracción soluble fue caracterizada midiendo los AGVs y alcoholes producidos por cromatografía de gases (sección 3.5.4).

5.2.2.3. Potencial bioquímico de metano

El hidrolizado enriquecido en AGVs fue usado como sustrato para ensayos de producción de metano. Los ensayos se realizaron por triplicado en botellas serológicas de 120 mL con 80 mL de volumen de trabajo inoculados con 8 g ST L⁻¹ de lodo productor de metano, manteniendo una temperatura de 35 °C y agitación constante de 150 rpm. Los reactores se cerraron con goma butílica y sellos de aluminio. Posteriormente, se gasearon con N₂ por 1 min. De forma paralela se corrieron controles con biomasa microalgal sin pretratamiento; además de controles solo con microalga y solo con lodo anaerobio para restar la producción endógena de metano. El biogás producido fue medido diariamente por desplazamiento de líquido utilizando una solución ácida (pH 2) en una probeta invertida y su composición fue determinada por cromatografía de gases (sección 3.6.1).

5.3. Resultados y discusión

5.3.1 Hidrólisis semi-continúa de biomasa microalgal

5.3.1.1. Recuperación de azúcares

Se dio seguimiento de la actividad hidrolítica y de la solubilización de azúcares (y de DQO) empleando TRH semejantes a los reportados en condiciones fisiológicas. Después de 6 días de operación con un TRH de 2d se conservó aproximadamente el 21% y 18 % de la actividad endoglucanasa y xilanasa, respectivamente; así como el 12% de la actividad amilasa (Figura 8A). Lazuka et al., (2015) monitorearon la actividad carbohidrolasa al estudiar la degradabilidad de paja de trigo en presencia de un consorcio microbiano ruminal enriquecido en lote por 15 días, la actividad endoglucanasa (20 - 40 UI/L) fue similar a la encontrada en el presente trabajo; por su parte, la actividad xilanasa fue de aproximadamente el doble (200 UI/L) de la encontrada en el presente trabajo durante los primeros dos días del lote, llegando hasta 900 UI/L a los 15 días. De modo que mayores tiempos de reacción se reflejan en un incremento de la actividad xilanasa. Aunado a esto, la paja de trigo contiene mayor porcentaje de hemicelulosa (hasta un 26% en paja de trigo y 9% en microalgas) y se encuentra más biodisponible, en el caso de las microalgas una capa externa de esporopoleninas y algaenanos dificultan el acceso de las enzimas a la pared de polisacáridos (González-Fernández et al., 2012a).

De forma paralela a la medición de actividad enzimática, se caracterizó la fracción soluble y se calculó la eficiencia de hidrólisis y de solubilización de carbohidratos (Figura 8B). Una vez alcanzada la estabilidad del sistema, con un TRH de 2 d, se logró una eficiencia de hidrólisis promedio del 24±1% y 16±1.4% de liberación de azúcares. Poco hay en la literatura sobre hidrólisis enzimática de *Scenedesmus*, Mahdy et al., (2016), realizaron pruebas de hidrólisis empleando tanto enzimas

puras como cocteles enzimáticos, encontrando una eficiencia de hidrólisis del 20% (y 15% de solubilización de carbohidratos) al incubar *Scenedesmus* tres horas en presencia de enzimas con actividad pectinasa (Pectinex-Ultra SP-L) así como con un coctel enzimático con actividad celulasa (Celluclast). Carrillo-Reyes y Buitrón (2016) aplicando un pretratamiento termo-químico (HCl 1% y 90°C por 2 h) a un cultivo nativo de microalgas (*Scenedesmus* género dominante), lograron una eficiencia de hidrólisis del 50.5% y 90% de solubilización de carbohidratos. Barragán-Trinidad et al. (2017) reportaron una eficiencia de hidrólisis y solubilización de azúcares del 29 y 5%, respectivamente, después de 3 días y empleando una relación microalga a fluido ruminal de 0.5 (igual que la empleada en el presente trabajo).

Dado que en la literatura se ha reportado de 2 a 3 días como tiempo óptimos de hidrólisis de biomasa microalgal con fluido ruminal (Barragán-Trinidad et al., 2017), se realizó un ajuste en el TRH (3d, TRS = 8d) a los 32 días (Figura 8), lo cual trajo consigo un incremento entre 2 y 3 veces en la actividad carbohidrolasa; así como en la eficiencia de hidrólisis, alcanzando hasta el 35%; sin embargo, hubo una caída drástica en el porcentaje de azúcares presentes en la fracción soluble, llegando a valores de hasta 3%. La disminución en el porcentaje de carbohidratos en la fracción soluble, se puede asociar al consumo de estos por bacterias fermentativas presentes en el fluido ruminal (Flint et al., 2008), lo cual se reflejó en un incremento en la producción de AGVs. Dado que el objetivo de este ensayo fue la recuperación de azúcares solubles, el TRH fue reajustado a un valor de 2 días, lo cual resultó en un 16% de solubilización de carbohidratos. A pesar de que el 76% de los carbohidratos totales aún se encuentran en la biomasa particulada (microalga); se espera que el pretratamiento con fluido ruminal mejorará su asimilación.

Este sistema semicontinuo de hidrólisis de microalgas se mantuvo en operación por 45 días. Una estrategia similar recientemente fue reportada por Giménez et al. (2017) quienes mantuvieron un reactor, productor de metano, inoculado con fluido ruminal por 190 días. Estos resultados soportan la hipótesis que es posible mantener la actividad hidrolítica del fluido ruminal desacoplando el TRH del TRS.

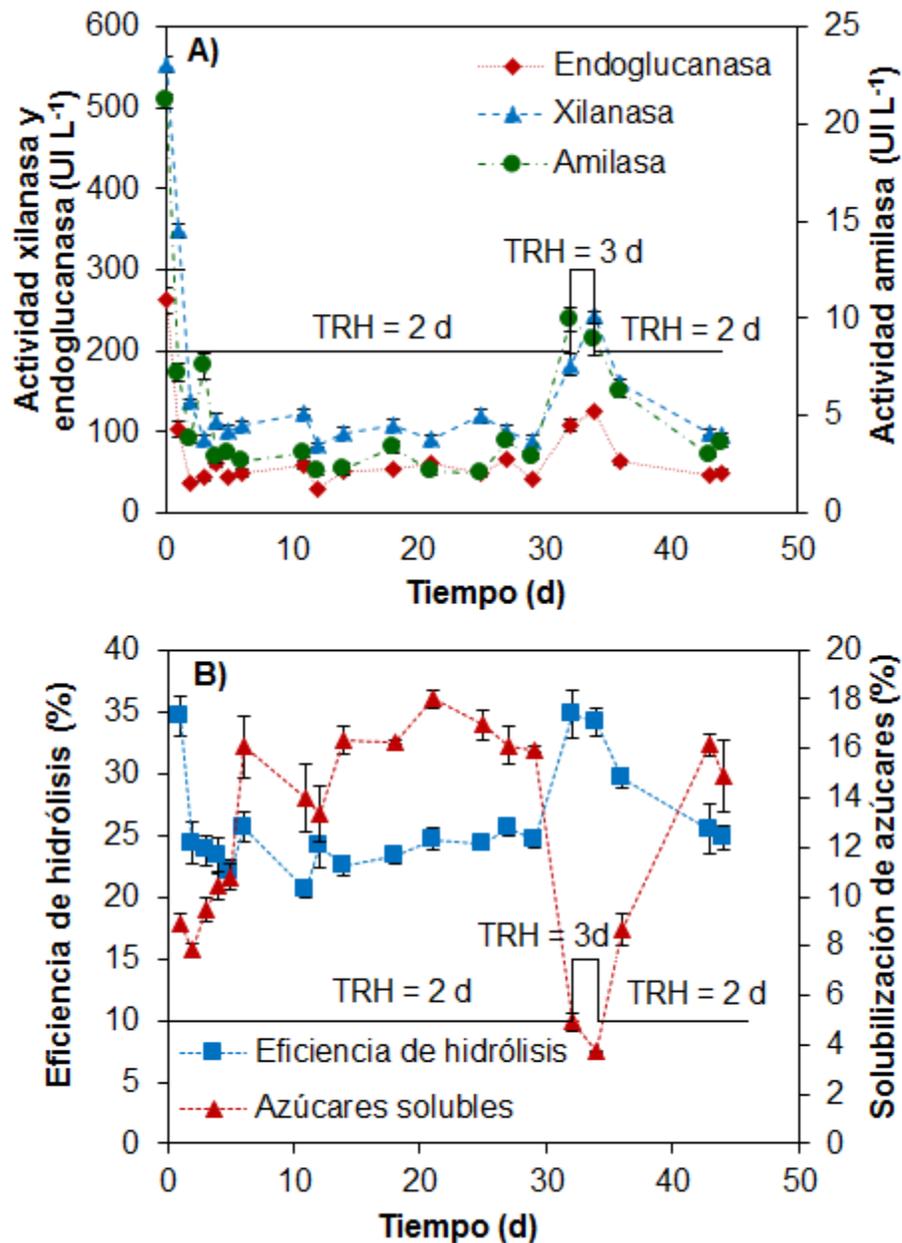


Figura 8. Hidrólisis semi-continúa de un consorcio nativo de microalgas: A) actividad carbohidrolasa y, B) eficiencia de hidrólisis y solubilización de azúcares.

5.3.1.2. Pretratamiento de biomasa microalgal y producción de AGVs

Empleando la estrategia de aclimatación por tiempos variables descrita anteriormente, fue posible maximizar la eficiencia de hidrólisis de biomasa microalgal, pero además que éste hidrolizado fuera rico en AGVs, alcanzando solubilizar el 60% de la biomasa particulada. Para este propósito, los tiempos de reacción fueron mayores que en el caso anterior, dado que el tiempo de generación

de las bacterias acetogénicas puede variar entre 4-6 días (o más), dependiendo de la naturaleza del sustrato (Ali Shah et al., 2014).

Considerando que el volumen de intercambio fue del 50%, el primer ciclo concluyó con un TRH de 32 días y gradualmente fue decreciendo hasta 8 días, después de 5 ciclos de operación continua (Figura 9). Al final de cada ciclo los AGVs contribuyeron con más del 75% de la DQO soluble, de los cuales el ácido acético represento más del 90% del total de AGVs. Zhao et al. (2016) estudiaron el efecto del TRH sobre la conversión de biomasa microalgal (*Scenedesmus*) a AGVs usando fluido ruminal como inóculo. Estos autores encontraron que con un TRH de 16 días alcanzaban una eficiencia de hidrólisis de 59.8%, en este hidrolizado los AGVs representaron el 44.4% de la DQO soluble.

Pensando en un escalamiento del proceso, en el presente no se adicionaron inhibidores de la metanogénesis, a diferencia del trabajo de Zhao et al., (2016). No obstante, durante el pretratamiento del cultivo nativo de microalga la cantidad de metano generada fue insignificante, representando el 4.5% y 3% (de la DQO alimentada) al final del primer y séptimo ciclo, respectivamente; lo que significa que algunas arqueas metanogénicas fueron lavadas durante el proceso de aclimatación.

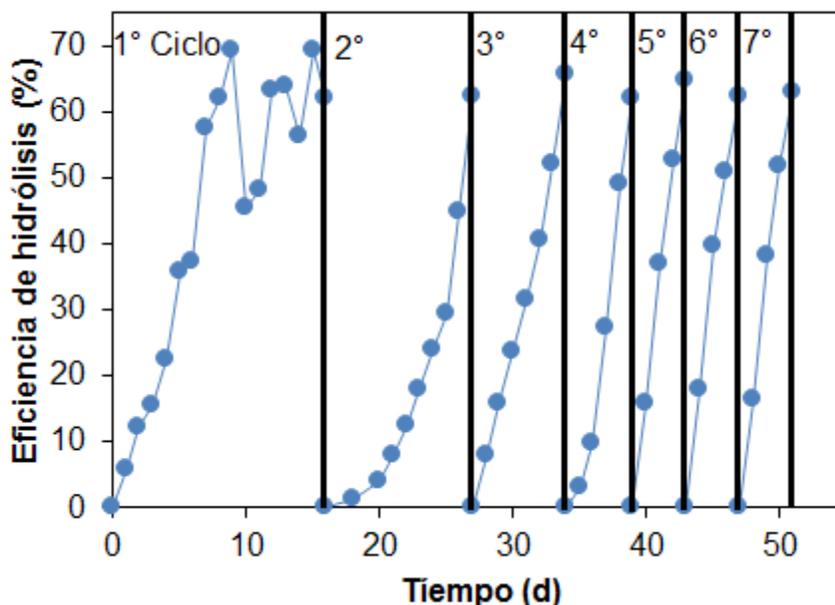


Figura 9. Aclimatación y enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos presentes en fluido ruminal durante la hidrólisis semi-continúa de biomasa microalgal.

La eficiencia de hidrólisis alcanzado en el presente trabajo es superior que la reportada con enzimas comerciales (Mahdy et al., 2016) y similar a la reportada con fluido ruminal (Zhao et al., 2016). En cuanto a la productividad de AGVs, el máximo

fue de 0.80g AGV L⁻¹d⁻¹, ligeramente menor a lo reportado por el último trabajo citado que reporta 1.029 g AGV L⁻¹d⁻¹.

Los resultados obtenidos demuestran que el desacoplamiento del TRH del TRS es crucial para mantener la actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales. Además, se ha evidenciado que manipulando el TRH es posible promover la recuperación de azúcares o AGVs. . En el presente estudio los reactores fueron operados de forma semi-continua hasta por 51 días, sin pérdida de actividad, lo que refuerza la idea de que es posible mantener por tiempo indefinido un reactor hidrolítico que emplea fluido ruminal como inóculo.

5.3.2. Análisis de la comunidad bacteriana.

La comunidad bacteriana endógena del consorcio nativo de microalgas y aquella presente en el fluido ruminal ya ha sido discutida en la sección 4.3.4.1; por lo que, solo nos enfocaremos la discusión de aquellas bacterias seleccionadas al final del pretratamiento.

5.3.2.1. Bacterias hidrolíticas responsables de la solubilización de azúcares

Para mostrar un comparativo entre la comunidad bacteriana resultante del pretratamiento de biomasa microalgal con un TRH de 2d, las bacterias endógenas del cultivo nativo de microalgas y las presentes en el inóculo se construyó un mapa de calor a nivel de filo (Figura 9).

La Figura 10 muestra que la comunidad bacteriana encontrada con un TRH de 2 d es la combinación de las bacterias presentes en el inóculo y en el cultivo nativo de microalgas. Las bacterias hidrolíticas, seleccionadas, más abundantes fueron *Pseudomonas* (35%), *Acinetobacter* (22%) y *Bacteroides* (5%). *Acinetobacter* es un género de bacterias Gram-negativas que pertenecen al phylum Proteobacteria. Son bacterias con alta capacidad celulolítica y que han sido aisladas del tubo digestivo de termitas (Pourramezan et al., 2012). Por su parte, *Bacteroides* son bacilos Gram-negativos que pertenecen al filo Bacteroidetes y tienen capacidad de degradar xilano (Flint et al., 2008). Tanto *Acinetobacter* como *Bacteroides* fueron enriquecidos a partir de fluido ruminal al emplear CMC y xilano, respectivamente, empleando cultivos en lote secuenciales (sección 4.3.4.2). Además, ya se ha discutido en la sección 4.3.4.1 la capacidad aligucida de *Pseudomonas* y el roll que puede desempeñar en la digestión de la pared celular de *Scenedesmus*.

5.3.2.2. Bacterias productoras de AGVs

Al igual que en la sección anterior, la comunidad bacteriana seleccionada con un TRH de 8 d es una combinación tanto de las bacterias presentes en el inóculo como en el sustrato (Figura 10).

Al final del ensayo las bacterias hidrolíticas más abundantes fueron: *Pseudomonas* (45%), *Parabacteroides* (7%), *Proteocatella* (4%) y *Clostridium* (3%). Las bacterias del género *Parabacteroides* pertenecen al filo Bacteroidetes (Polansky et al., 2016), mientras que los clostridios pertenecen al filo Firmicutes (Tracy et al., 2012); sin embargo, ambos géneros bacterianos se caracterizan por su capacidad de degradar polisacáridos tanto estructurales (celulosa, hemicelulosa, pectina) como de reserva (almidón). Por otro lado, las bacterias del género *Proteocatella* poseen actividad proteolítica y pertenecen al filo Firmicutes (Pikuta et al., 2009).

A pesar de que la comunidad bacteriana seleccionada bajo las distintas estrategias probadas es parecida, en ambos casos una alta abundancia relativa de *Pseudomonas* (>35%), la diferencia principal radica en el género *Acinetobacter*. Cuando se requiere obtener un efluente rico en azúcares (TRH = 2 d), éste género representa hasta el 22%; mientras que cuando se obtiene un hidrolizado rico en AGVs, casi desaparece (<1% de abundancia relativa). Lo anterior implica que las condiciones de operación tiene un efecto importante en la selección de microorganismos.

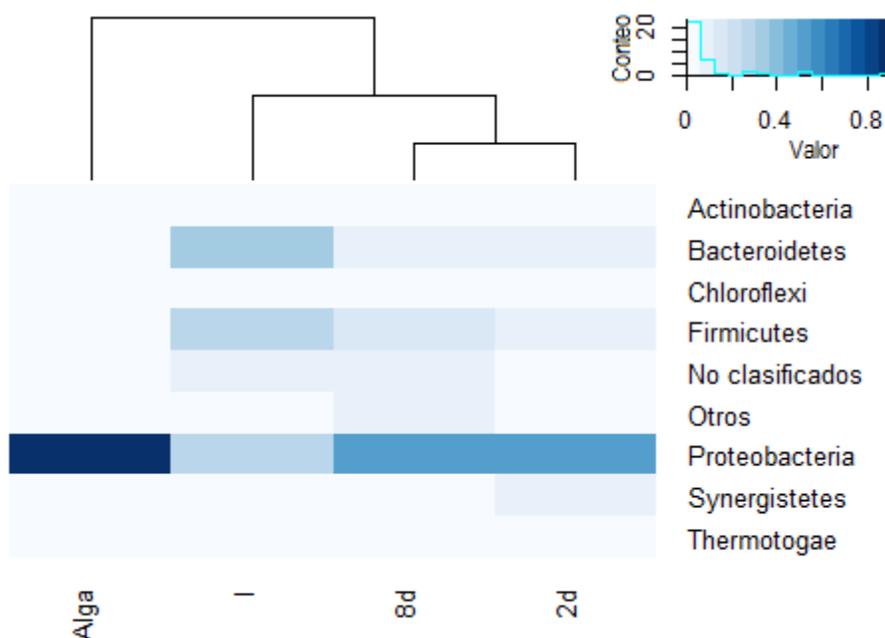


Figura 10. Mapa de calor comparativo (a nivel de filo) de la comunidad bacteriana presente en el inóculo (I), en la microalgal y la seleccionada después del pretratamiento. 12 d y 18 d, hacen referencia al TRH aplicado.

5.3.3. Recuperación de biocombustibles gaseosos

5.3.3.1 Producción de hidrógeno

El hidrolizado obtenido en la sección anterior se sometió a fermentación oscura y se encontró un incremento significativo tanto en la producción específica de

hidrógeno como en su tasa de producción; así como en el rendimiento molar en comparación a la biomasa microalgal sin pretratamiento (Tabla 8). Esto quiere decir que los microorganismos ruminales lograron mejorar la biodisponibilidad y asimilación de carbohidratos presentes en la microalga, logrando un 38% y 21% del valor teórico máximo de producción de hidrógeno para la microalga pretratada en contraste con la microalga fresca, considerando los azúcares totales que se someten a la fermentación oscura.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la producción específica de hidrógeno de la biomasa microalgal pretratada y fresca (con y sin pretratamiento).

Muestra	M_{\max} (mL H ₂ g-SV ⁻¹)	R_{\max} (mL H ₂ g-SV ⁻¹ d ⁻¹)	*Y _{H2} (mol H ₂ /mol hexosa)	% H ₂ en el biogás
Alga fresca	29±3 (<0.001)	11±0.8 (0.002)	1.02±0.01	43
Alga tratada	49±2 (<0.001)	21±1 (<0.001)	2.77±0.27	51
ANOVA				
Valor p	0.001	<0.001	<0.001	

*Y_H: rendimiento molar. R²>0.97 en ambos casos. Entre paréntesis se muestra el valor P del ajuste al modelo modificado de Gompertz.

El rendimiento molar obtenido con el presente pretratamiento es semejante al reportado por otros autores empleando hidrólisis química (Carrillo-Reyes y Buitrón, 2016; Ferreira et al., 2013) (Tabla 9); sin embargo, estos pretratamientos tienen el inconveniente de generar subproductos inhibitorios para las bacterias fermentativas. Incluso, cuando se emplean cultivos microalgales ricos en carbohidratos (Liu et al., 2012) y/o cultivos puros fermentativos (Ferreira et al., 2013; Liu et al., 2012), con altos rendimientos de producción de hidrógeno, los rendimientos molares obtenidos son semejantes o incluso mayores (Tabla 9).

La mejor asimilación de los azúcares por las bacterias fermentativas obtenidos de la microalga pretratada se puede explicar a partir de un análisis de AGVs, donde el acetato represento el 56 y 44% de los AGVs totales para la biomasa pretratada y biomasa fresca, respectivamente (Figura 11); siendo la relación molar acetato/butirato mayor en la biomasa pretratada (6.5) que en la biomasa fresca (4). Un factor adicional para una menor producción de hidrógeno a partir de la biomasa fresca, fue la mayor producción de propionato (17% vs 11% en la biomasa tratada), una vía metabólica que consume equivalentes de hidrógeno. Cabe mencionar que no se detectaron solventes, lo cual es un aspecto favorable a la producción de hidrógeno, pues son compuestos más reducidos que merman su producción. La concentración total de AGVs solubles fueron 1.22 a 1.79 g/L para los ensayos con biomasa fresca y biomasa pretratada, respectivamente, lo que hace a este efluente un sustrato adecuado para la digestión anaerobia.

Si bien el tiempo total de proceso (6 días, considerando pretratamiento y fermentación oscura) es superior al reportado empleando pretratamientos

termoquímicos, el presente trabajo muestra la posibilidad de implementar un sistema semi-continuo a gran escala sin el uso de químicos corrosivos; además, de la gran demanda energética requerida por los pretratamientos termoquímicos.

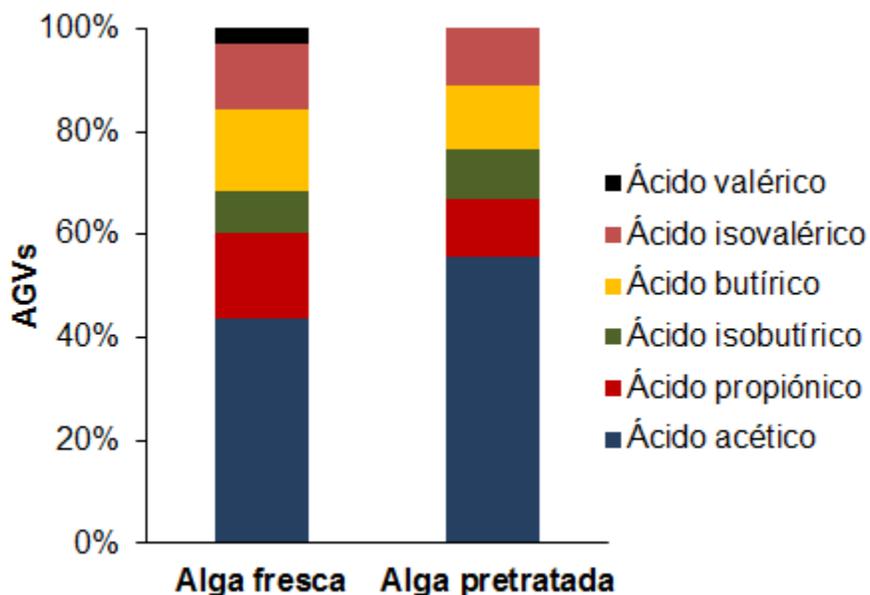


Figura 11. Perfil de AGVs resultantes de la fermentación oscura de biomasa microalgal con y sin pretratamiento.

5.3.3.2 Producción de metano

En rendimiento y tasa de producción de metano fueron 2.8 y 4 veces superiores al usar biomasa pretratada con fluido ruminal en comparación con la biomasa fresca (Tabla 10, Figura 12). Además, el biogás generado a partir de la biomasa pretratada fue de mejor calidad, alcanzando una concentración promedio de metano de 65%.

El rendimiento alcanzado en el presente ensayo ($285 \text{ mL CH}_4 \text{ g-DQO}^{-1}$) corresponde al 81% de biodegradabilidad anaerobia. González-Fernández et al. (2012c) alcanzó $170 \text{ mL CH}_4 \text{ g-DQO}^{-1}$ aplicando un pretratamiento térmico a *Scenedesmus*; Mahdy et al. (2016) usando enzimas con actividad proteasa recuperó $216 \text{ mL CH}_4 \text{ g-DQO}^{-1}$. Recientemente, Barragán-Trinidad et al. (2017) reportaron $193 \text{ mL CH}_4 \text{ g-DQO}^{-1}$, usando fluido ruminal en el pretratamiento de un cultivo nativo de microalgas. Ciudad et al. (2014) logró hasta 90% de biodegradabilidad anaerobia aplicando un extracto enzimático (predominando la actividad mangenoso peróxidasa) a la microalga *Botryococcus braunii*, una microalga con una pared celular muy resistente como la de *Scenedesmus*.

Tabla 9. Estudios relevantes de la producción de hidrógeno a partir de microalgas

Microalga	Pretratamiento	Inóculo	Temperatura (°C)	Y_{H_2} (mol H ₂ (mol hexosa) ⁻¹)	Referencia
Consorcio nativo	1% HCl, 90°C, 2h	Lodo anaerobio tratado térmicamente	35	3	(Carrillo-Reyes y Buitrón, 2016)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	121 °C, 15 min	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	30	0.77	(Batista et al., 2015)
Cultivo mixto	121 °C, 15 min	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	30	1.23	(Batista et al., 2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	1 N H ₂ SO ₄ , 121 °C, 30 min	<i>Clostridium butyricum</i>	30	2.9	(Ferreira et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i> ESP6	1.5 % HCl, 121 °C, 20 min	<i>Clostridium butyricum</i>	37	1.15	(Liu et al., 2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	121 °C, 15 min	<i>Clostridium butyricum</i>	37	2.23	(Batista et al., 2014)
Consorcio nativo	Ninguno	Lodo anaerobio tratado térmicamente	35	1.02	Presente trabajo
Consorcio nativo	Enzimático (fluido ruminal)	Lodo anaerobio tratado térmicamente	35	2.77	Presente trabajo

Por otro lado, el tiempo de proceso total (pretratamiento más metanización) fue de 20 d, menor al TRH que se ha reportado cuando se lleva a cabo la digestión anaerobia de *Scenedesmus* en una sola etapa (Giménez et al., 2017). De modo que los resultados encontrados en el presente trabajo nos sugieren que separar la hidrólisis de la etapa de metanización, mejora el rendimiento y la tasa de producción de metano; incluso empleando como sustrato microalgas con paredes celulares resistentes a la biodegradabilidad anaerobia como *Scenedesmus*. Además, con esto se demuestra que es posible mantener la actividad hidrolítica del fluido ruminal en un sistema semi-continuo alimentado con biomasa microalgal.

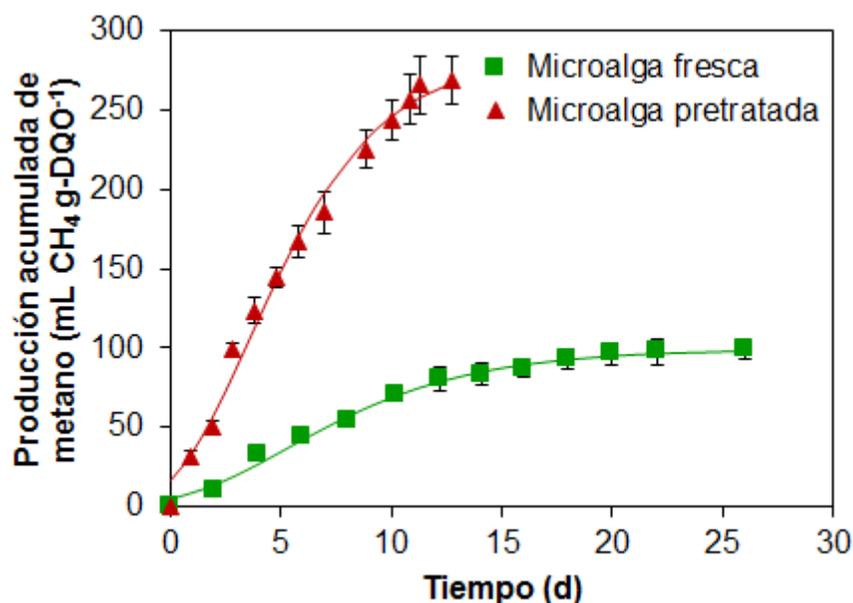


Figura 12. Potencial bioquímico de metano de un cultivo nativo de microalga fresca y pretratada con fluido ruminal. Las líneas continuas representan los ajustes al modelo modificado de Gompertz.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la producción de metano de microalga fresca y pretratada con fluido ruminal

Muestra	Y_{CH_4} (mL CH ₄ g-DQO ⁻¹)	R_{max} (mL CH ₄ g-DQO ⁻¹ d ⁻¹)	R^2	% CH ₄ en el biogás
Alga fresca	99±6 (<0.001)	7.7±0.5 (0.001)	0.99	52
Alga pretratada	285±9 (<0.001)	30.8± 1.1(0.001)	0.99	65

Entre paréntesis se muestra el valor P del ajuste al modelo modificado de Gompertz.

5.4. Conclusiones

El desacoplamiento del TRH del TRS hizo posible mantener un cultivo hidrolítico alimentado con microalgas hasta por 51 días. Manipulando el TRH fue posible obtener un hidrolizado rico en azúcares o en AGVs, alcanzando una productividad

máxima de 0.80 g AGVs L⁻¹d⁻¹ y una eficiencia de hidrólisis de hasta 60%. La producción de hidrógeno y metano se incrementaron 1.7 veces (49 mL H₂ g-SV⁻¹) y 2.9 veces (285 mL CH₄ g-DQO⁻¹), respectivamente, con respecto al control. Las bacterias hidrolíticas seleccionadas al final del pretratamiento fueron *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, y *Proteocatella*. El sistema semi-continuo de hidrólisis de biomasa microalgal es competitivo con pretratamiento enzimáticos y químicos.

CAPITULO 6

PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE CON FLUIDO RUMINAL PARA MEJORAR LA RECUPERACIÓN DE METANO

Resumen

El presente trabajo consistió en probar el fluido ruminal como fuente de microorganismos hidrolíticos, para llevar a cabo el pretratamiento de bagazo de agave. Se evaluó el efecto de la relación inicial bagazo de agave a fluido ruminal (S_0/X_0) sobre la solubilización de material particulado y la subsecuente producción de metano. La constante de hidrólisis y el porcentaje de solubilización de bagazo de agave disminuyeron de $0.622 \pm 0.012 \text{ d}^{-1}$ a $0.179 \pm 0.022 \text{ d}^{-1}$ y de 60% a 10%, respectivamente, cuando la relación S_0/X_0 incremento de 0.33 a 2; lo que sugiere un fenómeno de inhibición por sustrato. No obstante, la productividad de metano más alta se obtuvo empleando una relación S_0/X_0 de 2 ($470 \text{ mLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Los microorganismos hidrolíticos ruminales más abundantes bajo las distintas relaciones S_0/X_0 ensayadas fueron *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter* y *Engyodontium*.

Este capítulo está basado en la publicación en preparación:

Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Ruminant fluid as pretreatment of agave bagasse to improve methane production.

6.1. Introducción

Un residuo lignocelulósico de importancia local y regional en México es el bagazo de agave. El agave es una planta cultivada en las zonas áridas y semiáridas de México utilizado como materia prima en la producción de tequila, mezcal, fibras y agua miel. Los cultivos representan como características importantes un uso eficiente de agua y resistencia a sequías. La composición de diversas especies de agave (Tabla 11) muestra que el contenido de celulosa y hemicelulosa es alto, lo cual indica que tiene alto potencial para su conversión a biocombustibles (Li et al., 2012).

Tabla 11. Composición de diferentes especies de agave y sus fracciones anatómicas (% en peso seco) (Li et al., 2012)

Especie	Fracción anatómica	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
<i>A. americana</i>	Pencas	68.4	15.7	4.9
<i>A. salmiana</i>	Bagazo	47.3	12.8	10.1
<i>A. tequilana</i>	Bagazo	43	19	15
<i>A. lechuguilla</i>	Pencas	79.8	3-6	15.3
	Pencas	46-48	30	11
<i>A. fourcroudes</i>	Pencas	77.6	5-7	13.1

El agave azul (*Agave tequilana* Weber) es utilizado en la industria tequilera como materia prima, donde los agaves son cosechados cuando alcanzan una edad media de 5-8 años (Valenzuela, 2011). Después de cortar las hojas (jima) la piña se cuece y se exprime el jugo. El jugo obtenido es fermentado y destilado. Después que la piña es exprimida se obtiene un residuo lignocelulósico llamado bagazo de *Agave tequilana* Weber (Saucedo-Luna et al., 2011). El bagazo es un residuo lignocelulósico que representa hasta el 40% del agave procesado y la generación anual de bagazo de agave fue de aproximadamente 375 mil ton/año, de acuerdo con cifras del Consejo Regulador del Tequila para el año 2016. Solamente una pequeña porción es utilizada para producción de composta. De modo que estas particularidades hacen que el bagazo sea atractivo como fuente renovable para la obtención de biocombustibles (Saucedo-Luna et al., 2011). Aunque el interés en la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos ha ido en aumento, su producción está limitada debido al bajo consumo de pentosas por las levaduras. Por lo tanto, la digestión anaerobia ha emergido como una alternativa atractiva para la producción de biocombustibles gaseosos a partir de estos sustratos, debido a que los consorcios microbianos de este proceso son capaces de metabolizar tanto hexosas como pentosas (Arreola-Vargas et al., 2015).

El bagazo de agave consiste principalmente de 3 tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. No obstante, la disponibilidad de los polisacáridos se ve limitada por la estructura química de estos polímeros y la interacción entre estos con la lignina. De modo que es necesario llevar a cabo un pretratamiento para

solubilizar dichos polímeros. El objetivo de realizar un pretratamiento es cambiar las propiedades del material lignocelulósico y hacerlo más susceptible al ataque enzimático o microbiano. Distintos pretratamientos han sido reportados para incrementar la biodegradabilidad de biomasa lignocelulósica (Kumar et al., 2009; Taherzadeh y Karimi, 2008). Los pretratamientos físicos y químicos han logrado incrementos importantes en la producción de biogás; sin embargo, los altos requerimientos energéticos y la adición de químicos aunado a la generación de compuestos inhibitorios (furfural, hidroximetilfurfural), imposibilitan su aplicación a gran escala (Jönsson y Martín, 2016; Zheng et al., 2014). Los pretratamientos biológicos implican el uso de hongos, cultivos bacterianos (puros o mixtos) o enzimas con actividad hidrolítica. Existen en la literatura reportes del uso de enzimas hidrolíticas para llevar a cabo el pretratamiento de residuos lignocelulósicos; sin embargo, su aplicación a gran escala se ha visto limitada por el alto costo de las enzimas comerciales sumado al hecho que las enzimas no se pueden reutilizar (Gerhardt et al., 2007; Lin Yunqin et al., 2010; Ziemiński et al., 2012). Lo que ha impulsado la búsqueda de consorcios microbianos con altas tasas hidrolíticas, como aquel encontrado en el tracto digestivo de los rumiantes.

La microbiota ruminal incluye una población microbiana compleja de bacterias, protozoos, hongos y arqueas, se forma en el estómago anterior (retículo-rumen) de los rumiantes y exhibe mayor capacidad y actividad para degradar la biomasa lignocelulósica que los consorcios microbianos presentes en digestores anaerobios (Creevey et al., 2014). Se ha informado de que la solubilización de la celulosa por los microorganismos del rumen es significativamente más rápida que la de las comunidades microbianas de rellenos sanitarios o digestores anaerobios (Song et al., 2005).

En este sentido el fluido ruminal ha sido empleado en el pretratamiento de residuos lignocelulósicos para mejorar la producción de biocombustibles gaseosos. Baba et al. (2013) llevaron a cabo el pretratamiento de residuos de papel con fluido ruminal por 6 y 24 horas a 37 °C, con el fin de mejorar la producción de metano. El mejor rendimiento de metano se obtuvo con 6 h de pretratamiento, produciendo 2.6 veces más metano (179.1 mL CH₄ d⁻¹) que el sustrato sin pretratamiento, lo que implicó un 73.4 % del rendimiento teórico de metano. Zhang et al. (2016) llevaron a cabo el pretratamiento de paja de arroz con fluido ruminal por 24 h, logrando un incremento en el rendimiento de metano del 82.6%, alcanzando 285 mL CH₄ g-SV⁻¹. Recientemente, Zhang et al. (2017) lograron una eficiencia de degradación del 81% del Avicel (celulosa microcristalina), empleando un cultivo enriquecido en bacterias hidrolítica ruminales. Lo anterior demuestra el potencial de los microorganismos ruminales para hidrolizar residuos lignocelulósicos.

La digestión anaerobia de residuos sólidos está influenciada por diferentes factores, de los cuales la relación inicial sustrato/inóculo (S_0/X_0) es un factor clave para la optimización del proceso. En la literatura hay resultados contradictorios, mientras

que algunos trabajos muestran que un decremento en la relación S_0/X_0 afecta positivamente el rendimiento de metano (Maya-Altamira et al., 2008; Raposo et al., 2009); otras investigaciones no encuentran una influencia significativa sobre la producción de metano (Raposo et al., 2006). Es por ello que es necesario definir para cada sustrato e inóculo la proporción que garantice la mayor recuperación de metano. Además, hasta el momento no hay en la literatura reportes sobre el efecto de la relación S_0/X_0 sobre la hidrólisis de bagazo de agave con fluido ruminal y la subsecuente producción de metano.

Dadas las características del bagazo de agave y teniendo en cuenta que la relación inicial sustrato a inóculo (S_0/X_0) es un factor muy importante a optimizar en la digestión anaerobia, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de distintas relaciones iniciales bagazo de agave a fluido ruminal sobre la solubilización de material particulado y la subsecuente producción de metano. Además, la comunidad microbiana seleccionada fue caracterizada por secuenciación masiva de alta eficiencia MiSeq) basada en el gen 16S rADN (bacterias y arqueas) y la región ITS-2 (hongos).

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Fluido ruminal

Como fuente de bacterias hidrolíticas, se tomó una muestra del reactor hidrolítico (sección 5.2.2.1). Previo a su uso el fluido ruminal se concentró por centrifugación. El inóculo tenía una actividad xilanasas, endoglucanasa y amilasa de 100, 47 y 2.5 UI L⁻¹, respectivamente.

6.2.2. Efecto de la relación inicial bagazo de agave a fluido ruminal (S_0/X_0) sobre la producción de metano

6.2.2.1. *Pretratamiento del bagazo de agave con fluido ruminal*

Se evaluaron distintas relaciones S/X (0.33, 0.5, 1 y 2) en términos de concentración de ST, manteniendo constante una concentración de 25 g ST L⁻¹. Además, se montaron controles con únicamente fluido ruminal y bagazo de agave, ambos a 25 g ST L⁻¹. Los ensayos se realizaron en lote en botellas serológicas de 160 mL con 120 mL de volumen de trabajo, empleando medio mineral McDougall (1948). Las botellas serológicas se sellaron con tapones de goma butílica y sellos de aluminio, intercambiando el espacio de cabeza con gas N₂ durante 15 s, para luego ser incubadas a 39 °C a 150 rpm de agitación. Diariamente fue cuantificado el biogás producido, así como su composición por desplazamiento de líquidos utilizando una solución ácida en una probeta invertida (sección 3.6.1). Al final de cada ensayo se tomaron muestras de biomasa y se almacenaron a -20°C para la posterior caracterización de las comunidades microbianas. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, y se caracterizó la fracción soluble (azúcares, DQO, AGVs y fenoles). Además, el residuo se caracterizó en función de las fracciones Fibra Detergente

Neutra (FDN), Fibra Detergente Ácida (FAD) y Lignina Detergente Ácida (LDA), a fin de conocer la remoción de celulosa, hemicelulosa y lignina.

6.2.2.2. Producción de metano

Utilizando el sobrenadante de los pretratamientos a diferentes relaciones S/X, se realizaron ensayos en lote con el fin de evaluar el efecto en la producción de metano. Se adicionó el inóculo productor de metano a 8 g ST L⁻¹, realizando las pruebas por triplicado en botellas serológicas de 120 mL con 80 mL de volumen de trabajo; se cerraron con goma butílica y sellaron con tapas de aluminio. Posteriormente se intercambié el espacio de cabeza con gas N₂ durante 15 s, para luego ser incubadas a 35 °C con agitación a 150 rpm. De manera paralela se corrió un control solo con lodo anaerobio para descartar el metano producido de manera endógena. El biogás producido fue medido diariamente por desplazamiento de líquido utilizando una solución ácida (pH <2) en una probeta invertida (sección 3.6.1).

6.2.3. Caracterización cinética de la degradación de bagazo de agave por microorganismos ruminales.

Para tener un mejor entendimiento del proceso de degradación del bagazo de agave, la condición de la sección anterior con los mejores resultados de degradación se replicó una vez más y se cuantificó diariamente la actividad CMCasa (o endoglucanasa), producción de biogás, solubilización de azúcares totales, así como producción de AGVs.

Para estimar la productividad máxima de AGVs se empleó el modelo modificado de Gompertz:

$$M(t)_{AGVs} = M_{max,AGVs} * \exp \left[-\exp \left(\frac{2.71828 * R_{max,AGVs}(\lambda - t)}{M_{max,AGVs}} + 1 \right) \right]$$

Donde, M(t)_{AGVs} (g-DQO L⁻¹) es la producción acumulada de AGVs (en términos de DQO equivalente) al tiempo “t”; M_{max,AGVs} (g-DQO L⁻¹), es la máxima concentración de AGVs producidos; R_{max,AGVs} (g-DQO L⁻¹d⁻¹), es la máxima velocidad de producción de AGVs; λ (d), es el tiempo de la fase de latencia antes de la producción exponencial; t (d), es el tiempo de incubación.

Por otra parte, para calcular la constante de hidrólisis se ajustaron los datos de producción acumulada de AGVs a un modelo de primer orden (Zhang et al., 2016):

$$M(t) = M_{max}(1 - \exp(-kt))$$

Donde, M(t) (mL CH₄ g-ST⁻¹ o g DQO L⁻¹) representa la producción acumulada de metano (específica) o AGVs al tiempo “t”; M_{max} (mL CH₄ g-ST⁻¹ o g DQO L⁻¹), es la máxima cantidad de metano o AGVs producidos; “k” es la constante de hidrólisis de primer orden (d⁻¹); t (d) es el tiempo de incubación.

6.3. Resultados y discusión.

6.3.1. Efecto de la relación S/X sobre la solubilización de bagazo de agave

6.3.1.1. Producción de biogás durante el pretratamiento

La producción de metano durante el pretratamiento se muestra en la Figura 13, donde el metano representó de un 17-25% del biogás, siendo el resto dióxido de carbono (trazas de hidrógeno). Otros estudios han inhibido la actividad metanogénica del fluido ruminal empleando ácido bromoetano sulfónico (BES) (Lazuka et al., 2015); no obstante, pensando en una aplicación práctica, se optó por no adicionar químicos adicionales al medio de cultivo. La producción específica de metano estuvo en los rangos de 4.5 a 19 mL CH₄ g ST⁻¹, para el control con fluido ruminal y las distintas relaciones S₀/X₀ ensayadas, después de 16 días de incubación.

Sin embargo, los microorganismos nativos del bagazo de agave fueron capaces de fermentar azúcares presentes en el mismo para producir H₂, alcanzando una producción máxima de 14.4 mL H₂ g ST⁻¹ (y una $R_{max} = 3.32$ mL H₂ g-ST⁻¹ d⁻¹). La producción de hidrógeno por microorganismos nativos ya ha sido reportada por Pérez-Rangel et al. (2015) y Valdez-Vazquez et al. (2015) quienes obtienen producciones de hidrógeno de 6.3 y 15 mL H₂ g ST⁻¹, respectivamente, empleando paja de trigo. Este resultado muestra una producción de hidrógeno competitiva con respecto a lo reportado en literatura, la cual podría ser mejorada optimizando el medio de cultivo, poniendo ésta etapa previa al pretratamiento con fluido ruminal.

Con base en los perfiles de producción de metano, se obtuvieron los siguientes valores para las constantes de hidrólisis: 0.622±0.012 d⁻¹, 0.242±0.021d⁻¹, 0.167±0.034d⁻¹ y 0.179±0.022d⁻¹, para las relaciones S₀/X₀ de 0.33, 0.5, 1 y 2, respectivamente; no habiendo diferencia significativa entre los valores encontrados para las relaciones S₀/X₀ de 1 y 2. Esta misma tendencia ha sido reportada por Raposo et al. (2009), quienes hidrolizaron residuos de la extracción de aceite de girasol con fluido ruminal; encontrando una constante de hidrólisis máxima de 0.63 d⁻¹ con una relación S₀/X₀ de 0.5. El decremento en el valor de la constante de hidrólisis a medida que la relación S₀/X₀ aumenta sugiere una posible inhibición por sustrato.

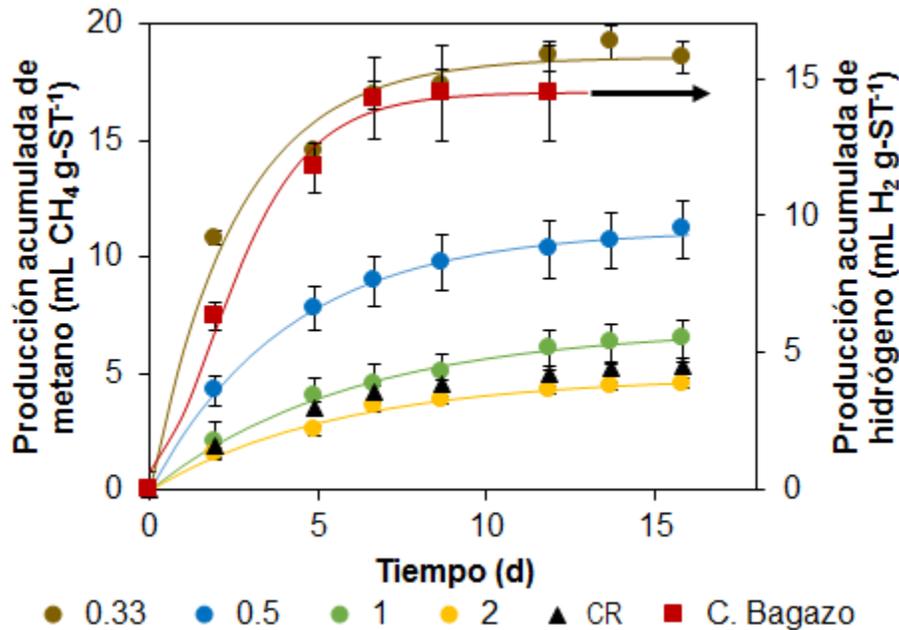


Figura 13. Producción de biogás durante el pretratamiento de bagazo con fluido ruminal a distintas relaciones S_0/X_0 . CR= Control con fluido ruminal. Las líneas continuas corresponden al ajuste al modelo de Gompertz (control de bagazo) y al modelo de primer orden (para las distintas relaciones S_0/X_0 ensayadas).

6.3.1.2. Solubilización de bagazo de agave por fluido ruminal

La solubilización de bagazo de agave medida como DQO soluble y por el análisis de fibras detergente no mostró una diferencia significativa (Figura 14). A medida que la relación S_0/X_0 disminuye incrementa la solubilización de material particulado, alcanzando una biodegradabilidad de hasta el 60% (medida como DQO soluble) empleando una relación S_0/X_0 de 0.33, esto se debe a que en esta condición el valor para la constante de hidrólisis fue el más alto ($0.622 \pm 0.012 \text{ d}^{-1}$). De igual forma, las condiciones con una relación S_0/X_0 de 1 y 2 muestran ligeros cambios en sus eficiencias de hidrólisis y en la DQO soluble; lo que es congruente con las constante de hidrólisis. Esta misma tendencia ha sido reportada por Budiyono et al. (2009) y Raposo et al. (2009), quienes estudiaron la influencia de la relación S/X sobre la biodegradabilidad de estiércol de cerdo y residuos de girasol (ambos sustratos contienen complejos lignocelulósicos) por fluido ruminal en cultivos por lote, respectivamente, encontrando que a medida que la relación S_0/X_0 disminuía la biodegradabilidad de estos sustratos aumentaba.

La baja degradabilidad anaerobia de estos sustratos a relaciones S_0/X_0 altas, pudiera ser ocasionada por a un fenómeno de inhibición por concentración de sustrato; compuestos presentes en el bagazo de agave pueden estar inhibiendo microorganismos hidrolíticos y/o fermentativos. Se ha reportado el efecto inhibitorio de los taninos, los cuales también se encuentran presentes en el bagazo de agave,

sobre enzimas con actividad proteasa, lipasa y carbohidrolasa (Griffiths, 1986). También, se ha reportado el efecto inhibitorio de la lignina sobre la actividad celulasa; de modo que la lignina actúa como un sitio de unión a estas enzimas, reduciendo el acceso de la enzima a la celulosa (Mooney et al., 1998). Este tipo de interacción (lignina-enzima) se ha descrito como uno de los principales factores limitantes en la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica (Alkasrawi et al., 2003; Eriksson et al., 2002). En este sentido, relaciones S_0/X_0 menores a uno disminuyen el efecto inhibitorio de la lignina y los taninos sobre la actividad hidrolítica.

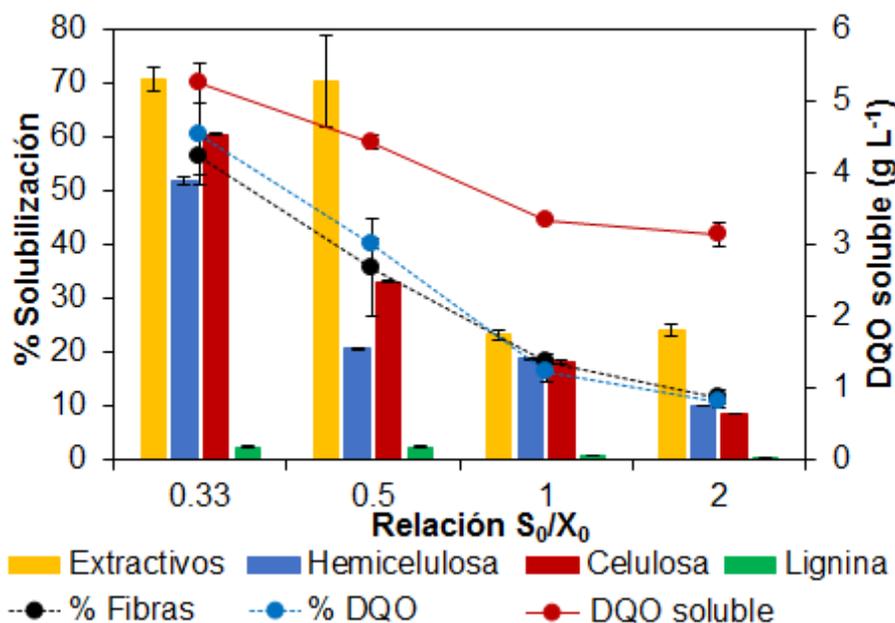


Figura 14. Solubilización de bagazo de agave por microorganismos ruminales.

La eficiencia de hidrólisis o porcentaje de solubilización (considerando una equivalencia de $1.10 \text{ g DQO g-ST}^{-1}$) lograda en el presente trabajo con una relación $S_0/X_0=0.33$, es superior a lo reportado con pretratamientos con ácido diluido y semejante a lo reportado con pretratamientos llevados a cabo con álcalis (combinados con enzimas con actividad celulasa) (Tabla 12). Rios-González et al. (2017) reportaron hasta 81% de sacarificación empleando un pretratamiento térmico ($190^\circ\text{C}/15\text{min}$) seguido una hidrólisis enzimática; por su parte, Caspeta et al. (2014) alcanzaron un rendimiento de sacarificación del 91% empleando un pretratamiento etanosolv-enzimático (Tabla 12). Si bien estos pretratamientos mencionados tienen eficiencias de hidrólisis (o sacarificación) semejantes o mejores, el uso de químicos corrosivos, generación de compuestos inhibitorios, alta demanda energética y empleo de enzimas comerciales pueden limitar su aplicación a gran escala.

Comparando con otros trabajos que han empleado biomasa lignocelulósica: Lazuka et al. (2015) obtuvieron eficiencias de hidrólisis semejantes (55%) al incubar a 35°C

(15 días) un cultivo ruminal enriquecido sobre paja de trigo. Por su parte, Hu y Yu (2005) alcanzaron entre 65-70% de conversión de sólidos volátiles (a AGVs) después de 10 días de incubar fluido ruminal con rastrojo de maíz. Tanto en el trabajo reportado por Lazuka et al. (2015) como en el presente estudio, la lignina prácticamente no sufre cambios durante el pretratamiento, lo cual era de esperarse pues como se ha reportado en diversas revisiones, el rumen no tiene la capacidad de solubilizar la lignina (Bayané y Guiot, 2011; Henderson et al., 2015).

Del resultado de la hidrólisis y fermentación del bagazo de agave con fluido ruminal se obtuvo un hidrolizado rico en AGVs (Tabla 13), representando en todos los casos estudiados >60% de la DQO soluble. Los ácidos acético, propiónico y butírico en suma representaron en todos los casos entre el 82 y 85% de los AGVs totales. El bajo contenido de fenoles apoya los resultados obtenidos con el análisis de fibras, que la lignina no se degrada durante el pretratamiento.

Tabla 12. Estudios relevantes sobre el pretratamiento de bagazo de agave

Pretratamiento	Condiciones	Eficiencia de hidrólisis (%)	Referencia
Autohidrólisis (Térmico)*	190°C/ 15 min.	81 ⁺	(Rios-González et al., 2017)
Químico (etanosolv)	25% Etanol, 0.5% H ₂ SO ₄ , 160 °C, 10 min. Sin considerar hidrólisis enzimática	46.2	(Pérez-Pimienta et al., 2017)
Químico	2.7% H ₂ SO ₄ , 123.6°C, 1.3 h. No secunde hidrólisis enzimática	48.5	(Arreola-Vargas et al., 2015)
Químico (Etanosolv)*	25% Etanol, 0.5% H ₂ SO ₄ , 160°C, 10 min	91 ⁺	(Caspeta et al., 2014)
Químico*	2% H ₂ SO ₄ , 137°C, 5 min	73.6 ⁺	(Saucedo-Luna et al., 2011)
Químico*	2% NaOH, 121 °C, 4 h	56 ⁺	(Hernández-Salas et al., 2009)
Biológico (enzimático)	39°C, 150 rpm, 16 días	60	Presente trabajo

* Secunde una hidrólisis enzimática al pretratamiento mencionado

+ En realidad son rendimiento de sacarificación

Tabla 13. Caracterización de la fracción soluble obtenida del pretratamiento de bagazo de agave con fluido ruminal.

Relación S ₀ /X ₀	% (AGVs)*	DQO % (solventes)**	%DQO (azúcares)	%DQO (fenoles)
0.33	79.71	7.87	2.38	0.58
0.5	60.48	5.14	0.33	0.58
1	78.00	6.36	2.41	0.70
2	64.98	9.51	2.81	0.71

* Ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y capríco.

** Acetona, etanol y butanol.

6.3.1.3. Cinética de producción de AGVs

Dado que los AGVs son los principales productos del metabolismo ruminal, así como los de mayor importancia para el propósito de este trabajo, producción de metano. Se llevó a cabo una cinética de producción de AGVs a partir de la hidrólisis de bagazo de agave con fluido ruminal con la relación S_0/X_0 de 0.33, la cual mostró las mejores eficiencias de hidrólisis, y su relación con otros parámetros: actividad CMCasa y producción de metano.

La Figura 15 muestra que la producción de metano es un parámetro fácil de medir para predecir cuando la producción de AGVs ha llegado a su producción máxima. Por su parte la actividad CMCasa no muestra una relación clara, ya que a pesar de que ésta no cesa por completo la producción de AGVs ya no incrementa después del 6° día. Además, en base a los perfiles de metano y AGVs (considerando la equivalencia en DQO) se calcularon las constantes de hidrólisis (considerando un modelo de primer orden): $0.622 \pm 0.012 \text{ d}^{-1}$ y $0.698 \pm 0.038 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Un análisis estadístico, prueba t-Student con un nivel de significancia de 0.05, muestra que no hay diferencia significativa entre estos dos valores calculados, a pesar de que en la literatura se ha discutido que la constante de hidrólisis para materiales lignocelulósicos debe calcularse a partir de la solubilización de DQO, producción de metabolitos solubles o degradación del sustrato y, no a partir de los perfiles de producción de biogás, pues se argumenta que la hidrólisis y la metanogénesis es realizada por diferentes microorganismos (Raposo et al., 2009).

La constante de hidrólisis obtenida en el presente trabajo (0.698 d^{-1} , considerando la producción de AGVs) es semejante a lo reportado por Raposo et al. (2009) quienes empleando residuos de la extracción de aceite girasol obtiene un valor de 0.53 d^{-1} y 0.63 d^{-1} con una relación S_0/X_0 de 0.33 y 0.5, respectivamente, al hidrolizar éste residuo con fluido ruminal. Estos valores son muy superiores a lo reportado en la literatura sobre la digestión anaerobia de celulosa, papel o residuos agroindustriales, los cuales oscilan entre los $0.03\text{-}0.25 \text{ d}^{-1}$ (Vavilin et al., 2008, 1996); lo cual se debe a la alta actividad carbohidrolasa que prevalece en el fluido ruminal.

Considerando al ajuste al modelo de Gompertz se obtuvo una productividad máxima de $1.50 \text{ g AGVs L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($2.36 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Este valor es menor al reportado por Hu et al. (2007) quienes reportan productividades máximas de $7.2 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, al hidrolizar tifa (o españada) por microorganismos ruminales en un reactor tipo UASB. Por su parte, Hu y Yu (2005) obtuvieron un valor de $11.8 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, en el pretratamiento de rastrojo de maíz. Unas posibles causas de esta diferencia en las productividades puede ser que el sustrato empleado en estos últimos trabajos tenía un tamaño de aproximadamente 1 mm (el bagazo empleado en el presente trabajo tenía 5 mm), lo que mejora el área de contacto y por tanto la transferencia de masa; por otra parte, tanto el residuo de girasol como la tifa (totora o espadaña) contenían un mayor porcentaje de compuestos extractivos (hasta el 35.9%), los cuales son

fácilmente asimilables por parte de los microorganismos ruminales y estos se reflejó en el hecho de que en ambos trabajos la constante de hidrólisis fue de hasta 0.94 d⁻¹(Hu y Yu, 2005) y 1.5 d⁻¹(Hu et al., 2007).

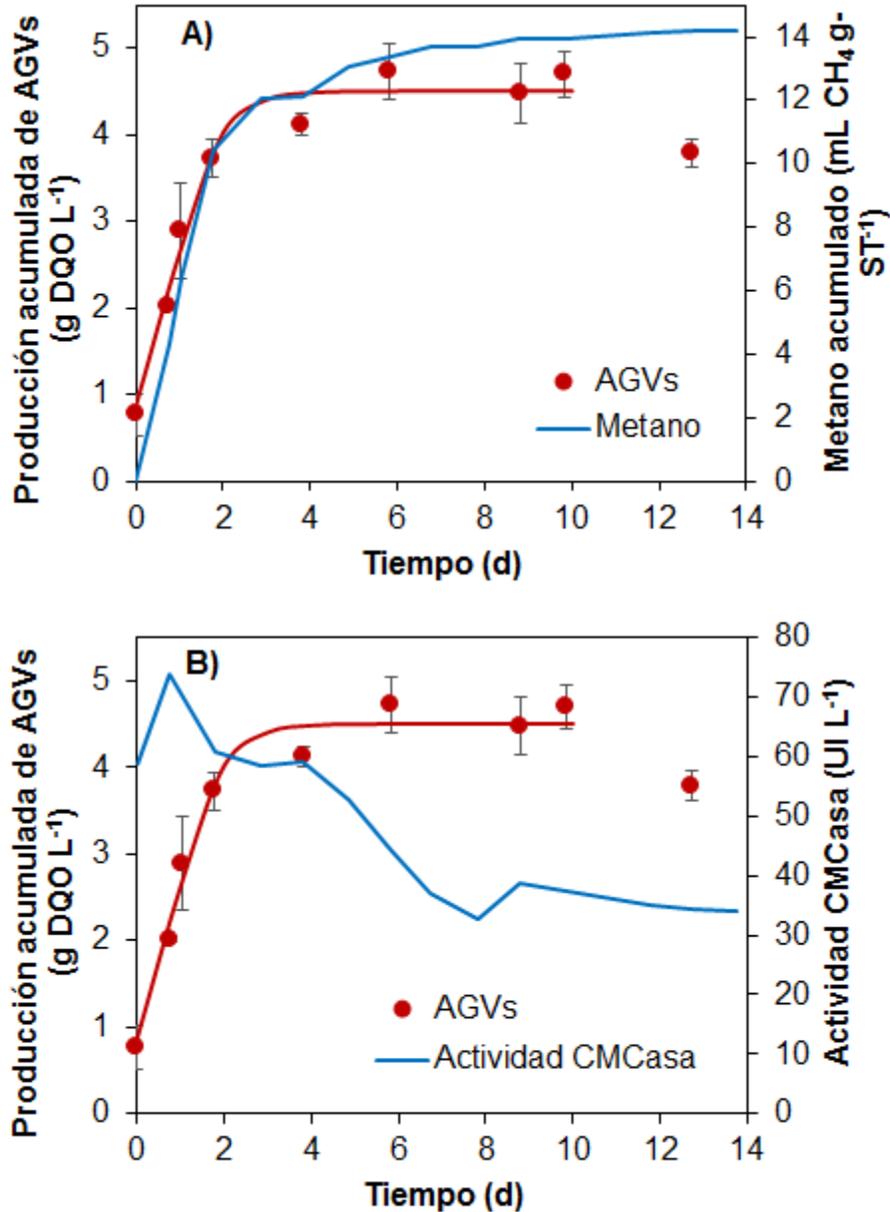


Figura 15. Producción de AGVs a partir de la hidrólisis de bagazo de agave con fluido ruminal ($S_0/X_0= 0.33$) y su relación con otros parámetros: A) Producción de metano y, B) Actividad CMCasa.

Considerando que los AGVs representan entre el 60-79% de la DQO soluble (Tabla 13), éste efluente sería un sustrato adecuado para una posterior recuperación de metano.

6.3.2. Análisis de la comunidad microbiana

6.3.2.1. Comunidad microbiana (bacterias, arqueas y hongos) nativa del bagazo de agave e inóculo

Como se observa en la Figura 16, la comunidad bacteriana nativa del bagazo de agave es muy diferente a la encontrada en los otros ensayos y constituye un cluster independiente. Esta comunidad bacteriana se encuentra representada principalmente por las bacterias sacarolíticas: *Clostridium* (24%), *Bacteroides* (8%) y *Acinetobacter* (2%). Por otro lado, las bacterias fermentativas más abundantes fueron: *Lactobacillus* (23%), *Citrobacter* (19%) y *Megasphaera* (1.8%). Es bien conocido que las bacterias de los géneros *Clostridium*, *Citrobacter* y *Bacteroides* pueden generar hidrógeno a partir de la oxidación de carbohidratos (Flint et al., 2008; Mangayil et al., 2011; Tracy et al., 2012), esto podría explicar la producción de hidrógeno en el control de bagazo de agave (Figura 13). Aunado a esto, el análisis metagenómico reveló la ausencia de arqueas, lo que explica que no se haya detectado metano en el biogás. Valdez-Vazquez et al. (2015) reportaron bacterias nativas del género *Enterococcus*, como las responsables de la hidrólisis-fermentación del xilano presente en la paja de trigo y de la producción de hidrógeno. Esto quiere decir que según la naturaleza del sustrato y las condiciones de operación, la comunidad bacteriana puede favorecer la presencia de determinadas especies bacterianas.

En el inóculo, los géneros bacterianos sacarolíticos más abundantes fueron *Eubacterium* (17%) y *Prevotella* (11%) (Flint et al., 2008; Van Soest, 1994). Mientras que la suma de *Fibrobacter* y *Ruminococcus* fue menor al 0.1%. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la abundancia relativa de estos géneros dependerá en gran medida de la dieta del rumiante (Henderson et al., 2015; Petri et al., 2013). Por otra parte, la arquea metanogénica identificada en el inóculo fue *Methanobrevibacter* (0.1%), la cual se caracteriza por llevar a cabo metanogénesis hidrogenotrófica. Además, el hongo más abundante fue *Geotrichum candidum* (abundancia relativa del 95% de los hongos totales) (Figura 17). Este hongo se caracteriza por tener alta actividad carbohidrolasa (pectinasa, xilanasas, celulasa y quitinasa) (Piegza et al., 2014); así como actividad proteolítica y lipolítica (Sacristán et al., 2012). Este análisis metagenómico revela que el fluido ruminal es una adecuada fuente de microorganismos hidrolíticos, pero tiene poco potencial para producción de metano, lo cual se aprovecha en el presente trabajo.

6.3.2.2. Efecto de la relación S_0/X_0 sobre la comunidad microbiana

En un tercer grupo encontramos a las comunidades bacterianas seleccionadas bajo distintas relaciones S_0/X_0 (Figura 16). La suma de los filos Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias representa entre el 65 y 80% de la comunidad bacteriana. Cabe mencionar que a medida que la relación S_0/X_0 disminuye se observa una tendencia de aumento en la abundancia relativa de la suma de Firmicutes y Bacteroidetes, filos que se sabe contienen géneros bacterianos muy activos en la degradación de polisacáridos estructurales. En este sentido la abundancia relativa de *Prevotella*, *Ruminococcus* y *Fibrobacter* incrementó de 3 al 9%, del 0.8 al 1.7% y del 0.1% al 0.9%, respectivamente, al pasar de una relación de 2 a 0.33. Esto puede explicar porque empleando una relación de 0.33 obtenemos la mayor solubilización de bagazo de agave. Aunado a lo anterior, la abundancia relativa del filo Proteobacteria disminuyó de un 50% hasta un 29% al pasar de una relación de 2 a 0.33. Las bacterias pertenecientes a este filo no se caracterizan por poseer altas capacidades de degradar polisacáridos estructurales; sin embargo, juegan un roll muy importante en la fermentación de azúcares solubles y metabolismo de compuestos fenólicos (Van Soest, 1994); en este sentido son muy importantes para prevenir la inhibición de la actividad hidrolítica por acumulación de monosacáridos.

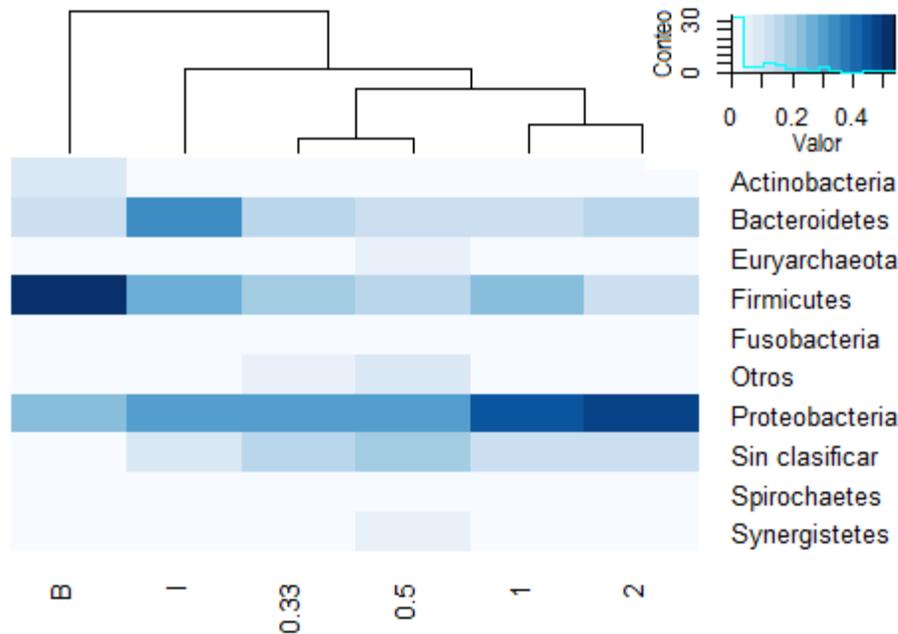


Figura 16. Análisis de la comunidad bacteriana seleccionada, a nivel de filo, durante el pretratamiento de bagazo de agave con fluido ruminal Solo se muestran los phylum con abundancia relativa mayor a 1%. B = Bagazo; I = Inóculo.

En todos los ensayos realizados las arqueas representaron menos del 4% del total de procariontas, siendo el género *Methanobrevibacter* el mayor representante (74 - 88% del total de arqueas). Otra arquea identificada fue *Methanosphaera* (0.3-0.6%

del total de procariotas), estos microorganismos tiene la capacidad de reducir el metanol en presencia de hidrógeno a metano, de modo que su presencia requiere de bacterias y hongos con capacidad de fermentar pectinas, como *Bacteroides*, *Prevotella*, *Geotrichum* y otros más (Fricke et al., 2006; Seshadri et al., 2018). Como los resultados lo demuestran, después de 16 días de incubación no hubo proliferación de arqueas acetoclásticas.

Con respecto al análisis de hongos, al final del ensayo con la mejor eficiencia de hidrólisis de bagazo ($S_0/X_0=0.33$), los hongos hidrolíticos más abundantes fueron: *Engyodontium álbum* (39%), *Phaeosphaeria sp.* (5%) y *Geotrichum candidum* (2%) (Figura 17). *Engyodontium álbum* posee una alta actividad proteolítica (Ghéczy et al., 2016); de hecho la Proteínasa K empleada en la purificación de ADN es obtenida de éste hongo, debido a su alta actividad proteasa y estabilidad operacional. Mientras tanto *Phaeosphaeria sp.* es un hongo fitopatógeno que presenta actividad carbohidrolasa (celulasa, xilanasa, pectinasa, entre otras) (Lalaoui et al., 2000). Mientras tanto *Pichia sp* fue la levadura fermentativa más abundante, quien es un fermentador por excelencia de xilosa (Jeffries et al., 2007).

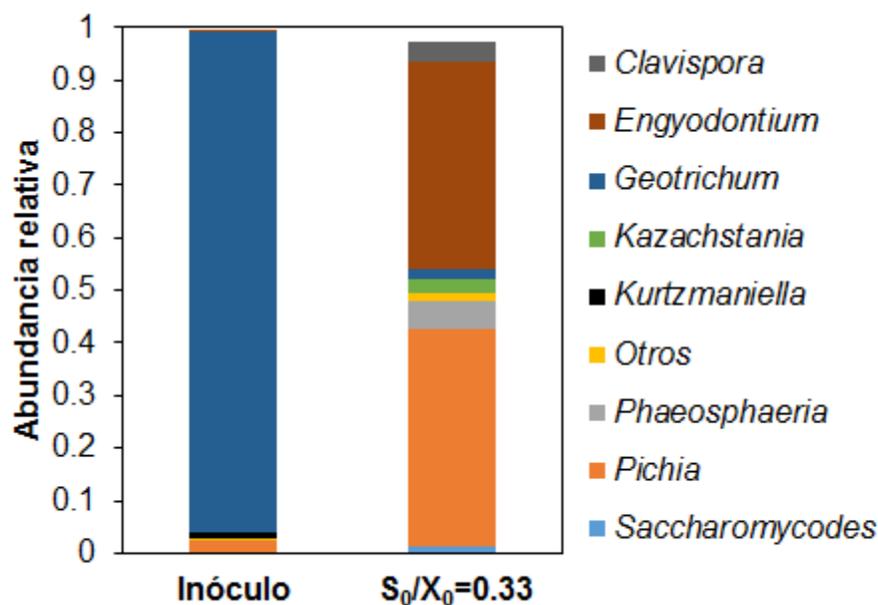


Figura 17. Hongos seleccionados durante el pretratamiento de bagazo de agave con fluido ruminal. Se consideraron solo aquellos con una abundancia relativa mayor al 1%.

6.3.3. Recuperación de metano a partir de los hidrolizados

Tanto el rendimiento de metano como su productividad volumétrica no muestran una tendencia clara (Figura 18), alcanzando un máximo de rendimiento de metano con una relación de S_0/X_0 de 1 y la máxima productividad con una relación S_0/X_0 de

2 (Tabla 14). Un ANOVA de un solo factor evidenció que tanto para $M_{máx}$ como $R_{máx}$, existen diferencia significativa en al menos dos de los tratamientos ensayados. Con la finalidad de discernir entre que pareja de tratamientos existía una diferencia significativa, se realizaron comparaciones múltiples empleando la prueba de Tuckey (Tabla 15).

Tabla 14. Rendimiento y productividad volumétrica de metano a partir de hidrolizados de bagazo de agave con fluido ruminal

Relación S_0/X_0	Rendimiento de metano, Y_{CH_4} , (mL CH_4 g-DQO ⁻¹)	Productividad volumétrica de metano máxima, $R_{máx}$, (mL CH_4 L ⁻¹ d ⁻¹)	% CH_4 en el biogás
0.33	206 ± 3	395 ± 26	62
0.5	191 ± 21	196 ± 16	62
1	232 ± 5	346 ± 13	59
2	174 ± 12	470 ± 43	57
ANOVA			
Valor-P	0.012	<<0.5	

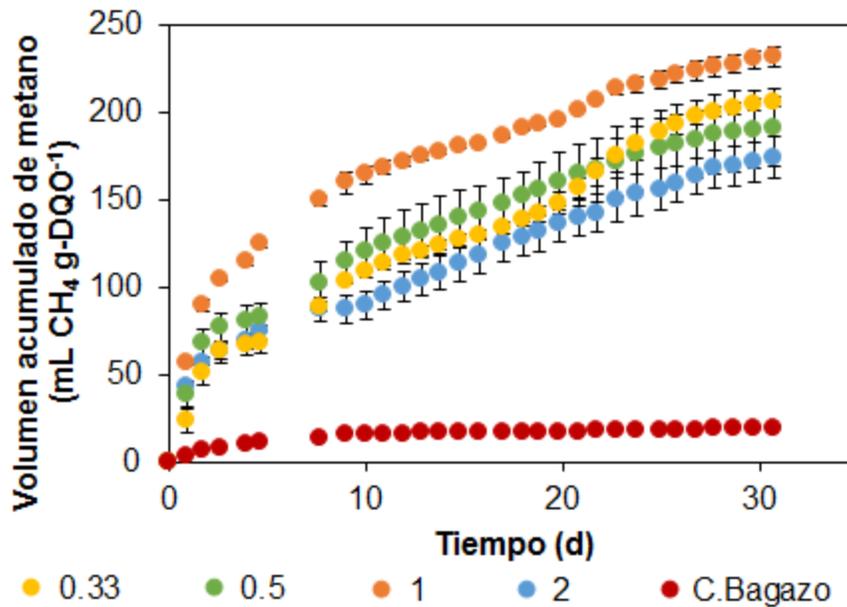


Figura 18. Volumen acumulado de metano de hidrolizados de bagazo de agave con fluido ruminal a distintas relaciones S_0/X_0 .

Tabla 15. Comparación múltiple con de R_{max} y M_{max} obtenidos bajo los distintos tratamientos empleando la prueba de Tukey*

Par de relaciones S/X a comparar	Valor-P Y_{CH_4}	para Valor-P R_{max}	para
0.5-0.33	0.569	<0.01	
1-0.33	0.246	0.323	
2-0.33	0.087	0.058	
1-0.5	0.051	<0.01	
2-0.5	0.464	<0.01	
2-1	0.010	<0.01	

*Con un nivel de significancia del 0.05. Se marcan en negritas aquellos pares que muestran diferencia significativa.

Los rendimientos de metano obtenidos en el presente trabajo son mayores a lo reportado por Arreola-Vargas et al. (2016) pero menores a lo obtenido por Montiel Corona y Razo-Flóres (2018), 90 y 320 mL CH₄ g DQO⁻¹, respectivamente. En ambos casos se empleó un pretratamiento enzimático a base de Celluclast® 1.5 L, un complejo enzimático con alta actividad celulasas. El bajo rendimiento de metano obtenido por Arreola-Vargas et al. (2016) puede atribuirse a la acumulación de ácidos grasos volátiles (hasta 6 g L⁻¹), lo cual puede ser indicativo que bajo las condiciones de ensayo el inóculo presentaba mayor actividad acidogénica que metanogénica.

Sin embargo, el factor más importante en todo proceso es la productividad, en este sentido los valores encontrados en el presente trabajo son inferiores a lo reportado con hidrólisis enzimática tanto en lote (840 mL L⁻¹ d⁻¹) (Arreola-Vargas et al., 2016) como en continuo (hasta 6400 mL L⁻¹ d⁻¹) (Montiel Corona y Razo-Flores, 2018). Cabe mencionar que éste último trabajo citado, tiene la limitante de emplear enzimas comerciales y además el medio de reacción para hidrólisis (enzimas y buffer de citratos) contribuye con el 64% de la DQO soluble, la cual en etapas posteriores se llevará a metanización, por lo que los rendimientos reales son significativamente menores.

Considerando que el presente trabajo representa la primera aproximación al pretratamiento de bagazo de agave con fluido ruminal, aún hay muchas variables a optimizar, como por ejemplo el tiempo de pretratamiento, el cual puede llevarse a cabo hasta en la mitad de tiempo, según se discutió en la sección 6.3.1.3; asimismo, que se ofrece una alternativa al uso de enzimas comerciales. Por otra parte, ya en la producción de metano, una forma de hacer más productivo el sistema sería ajustar la concentración de DQO del efluente a la obtenida con el pretratamiento con una relación $S_0/X_0 = 2$, dado que en ésta condición la productividad de metano fue mayor; además, implementar un sistema en continuo a fin de encontrar

condiciones de operación como velocidad de agitación, TRH, entre otros que maximicen la productividad.

6.4. Conclusiones

Se ha puesto de manifiesto la capacidad del fluido ruminal para la solubilización del bagazo de agave. Tanto la eficiencia de hidrólisis (60%) como el rendimiento de metano ($232 \text{ mL CH}_4 \text{ g-DQO}^{-1}$) obtenido son semejantes a lo reportado con hidrólisis enzimática o química; no obstante, la productividad (hasta $470 \text{ mLCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ con una relación S_0/X_0 de 2) de metano es considerablemente menor comparada con otros pretratamientos. Cabe mencionar que los microorganismos nativos del bagazo de agave son capaces de generar hidrógeno, lo que puede aprovecharse desde el punto de vista de una biorefinería. Por otra parte, las bacterias hidrolíticas más abundante fueron *Prevotella*, *Ruminococcus* y *Fibrobacter*, mientras que *Engyodontium* fue el hongo proteolítico más abundante. Los resultados sugieren la realización de estudios de pretratamiento (y de producción de metano) en modo semi-continuo a fin de optimizar variables operaciones y evaluar la estabilidad del sistema.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

El fin último del presente trabajo consistió en establecer condiciones de proceso que permitieran mantener la actividad hidrolítica de los microorganismos ruminales con el propósito de llevar a cabo el pretratamiento de biomasa microalgal o bagazo de agave a fin de incrementar la recuperación de biocombustibles gaseosos en una etapa posterior.

Primeramente, se demostró que los complejos celulósicos presentes en la biomasa microalgal inducen la actividad carbohidrolasa (endoglucanasa, xilansa y amilasa) de los microorganismos ruminales y que los microorganismos hidrolíticos pueden ser enriquecidos empleando cultivos discontinuos secuenciales, incrementando la solubilización de DQO particulada 1.55 veces después de tres resiembras. Además, se encontró que con una relación S_0/X_0 0.5, se alcanzó la mayor eficiencia de hidrólisis (29%) y rendimiento de metano ($193 \text{ mL CH}_4 \text{ g DQO}^{-1}$), en solo 7 días de proceso y con una concentración promedio de metano en el biogás de 53% (v/v).

En el reactor hidrolítico operando en modo discontinuo secuencial, alimentado con biomasa microalgal, se logró mantener la actividad hidrolítica por un periodo de 51 días. Aplicando un TRH de 2 días fue posible obtener un hidrolizado con alto contenido de azúcares susceptible a aprovecharse en fermentación oscura, mejorando la recuperación de hidrógeno 1.7 veces respecto a la biomasa sin pretratamiento (49 mL g SV^{-1}). Cuando el propósito fue recuperar metano, con un TRH de 8 días, fue posible solubilizar el 60% de biomasa microalgal y mejorar 2.9 veces la producción de metano ($285 \text{ mL CH}_4 \text{ g DQO}^{-1}$) respecto a la biomasa control. De ésta forma se comprueba el potencial de los microorganismos ruminales para llevar a cabo el pretratamiento en forma semi-continua de un cultivo nativo de microalgas, que está enriquecido en *Scenedesmus*, una de las microalgas más resistentes al someterse a digestión anaerobia; esto además, propicio obtener un biogás más enriquecido en hidrógeno (51%) y metano (65%), lo cual significa que se obtiene un biogás de mejor calidad.

El análisis metagenómico reveló que cuando el objetivo es recuperar azúcares las bacterias hidrolíticas más abundantes fueron: *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacteroides*; mientras que cuando el propósito fue recuperar ácidos grasos volátiles: *Pseudomonas*, *Parabacteroides*, *Clostridium* y *Proteocatella*. En ambos casos *Pseudomonas* representó al menos el 35% de la OTUs, lo que aunado a sus capacidades metabólicas sugiere que estas bacterias podrían digerir la primera capa de pared celular de *Scenedesmus*, compuestos por esporopoleninas y algaenanos. Dado que las bacterias acetogénicas tienen tiempos de generación mayores a las hidrolíticas-acidogénicas, 0.25-3 días y 4-6 días (o más, según el sustrato y las condiciones de operación), respectivamente; la implementación de un

TRH de 8 días, permitió seleccionar bacterias cuyo metabolismo se dirigiera a la acumulación de ácido acético.

Finalizado el estudio sobre el pretratamiento de microalgas, se realizaron ensayos en lote sobre el pretratamiento de bagazo de agave con fluido ruminal. Donde, los resultados revelan que una relación S_0/X_0 de 0.33 maximiza la eficiencia de hidrólisis (60%); no obstante, la mayor productividad de metano se logró con una relación de S_0/X_0 de 2 ($470 \text{ mL CH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$). Algo que pudiera aprovecharse como un pretratamiento extra y recuperar mayor poder energético, fue que la microbiota nativa del bagazo (con alta abundancia de *Clostridium* u *Bacteroides*) de agave fue capaz de generar hidrógeno. Las bacterias ruminales hidrolíticas seleccionadas en todos los ensayos fueron bacterias con actividad carbohidrolasa: *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* y *Fibrobacter*, mientras que *Engyodontium*, fue el hongo más abundante, el cual se caracteriza por una alta actividad proteolítica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son competitivos con los pretratamientos mecánicos o químicos, muy demandantes energéticamente. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios relativos a la operación de un reactor empelando bagazo de agave con la finalidad de optimizar parámetros, como los tiempos de retención hidráulicos y sólidos, así como evaluar la estabilidad del sistema en al menos 3 meses de operación continua.

REFERENCIAS

- Adney, W.S., Rivard, C.J., Shiang, M., Himmel, M.E., 1991. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 165–183. <https://doi.org/10.1007/BF02921684>
- Afi, L., Metzger, P., Largeau, C., Connan, J., Berkaloff, C., Rousseau, B., 1996. Bacterial degradation of green microalgae: incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. *Org. Geochem., Proceedings of the 17th International Meeting on Organic Geochemistry* 25, 117–130. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(96\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(96)00113-1)
- Ahmad, A.L., Yasin, N.H.M., Derek, C.J.C., Lim, J.K., 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
- Aikawa, S., Joseph, A., Yamada, R., Izumi, Y., Yamagishi, T., Matsuda, F., Kawai, H., Chang, J.-S., Hasunuma, T., Kondo, A., 2013. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis processes. *Energy Environ. Sci.* 6, 1844–1849. <https://doi.org/10.1039/C3EE40305J>
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., Ahmad Asad, S., 2014. Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *Sci. World J.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/183752>
- Alkasrawi, M., Eriksson, T., Börjesson, J., Wingren, A., Galbe, M., Tjerneld, F., Zacchi, G., 2003. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00087-5)
- Allison, M.J., Mayberry, W.R., Mcsweeney, C.S., Stahl, D.A., 1992. *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov.: A Rumen Bacterium That Degrades Toxic Pyridinediols. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 522–529. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80111-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80111-6)
- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I., 2012. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour. Technol.* 123, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.113>
- Amaro, A.M., Fuentes, M.S., Ogalde, S.R., Venegas, J.A., Suárez-Isla, B.A., 2005. Identification and Characterization of Potentially Algal-lytic Marine Bacteria Strongly Associated with the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 191–200. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00031.x>

- Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>
- APHA, AWWA, WFE, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21th ed. Washington, D.C., USA.
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R.I., Méndez-Acosta, H.O., 2016. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. *Int. J. Hydrog. Energy* 41, 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R.I., Alatríste-Mondragón, F., Méndez-Acosta, H.O., 2015. Methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresour. Technol.* 181, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>
- Aydin, S., Yıldırım, E., Ince, O., Ince, B., 2017. Rumen anaerobic fungi create new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass. *Algal Res.* 23, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.016>
- Baba, Y., Tada, C., Fukuda, Y., Nakai, Y., 2013. Improvement of methane production from waste paper by pretreatment with rumen fluid. *Bioresour. Technol.* 128, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.077>
- Bai, M.-D., Chen, C.-Y., Lu, W.-C., Wan, H.-P., Ho, S.-H., Chang, J.-S., 2015. Enhancing the oil extraction efficiency of *Chlorella vulgaris* with cell-disruptive pretreatment using active extracellular substances from *Bacillus thuringiensis* ITRI-G1. *Biochem. Eng. J.* 101, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.020>
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2002. *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 245–279. <https://doi.org/10.1080/07388550290789513>
- Barnes, S.P., Keller, J., 2004. Anaerobic rumen SBR for degradation of cellulosic material. *Water Sci. Technol.* 50, 305–311.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., 2017. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresour. Technol.* 244, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.117>
- Batista, A.P., Ambrosano, L., Graça, S., Sousa, C., Marques, P.A.S.S., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro Neto, P., Gouveia, L., 2015. Combining urban wastewater

- treatment with biohydrogen production – An integrated microalgae-based approach. *Adv. Biofuels Chem. Algae* 184, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.064>
- Batista, A.P., Moura, P., Marques, P.A.S.S., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., 2014. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel* 117, Part A, 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.077>
- Bayané, A., Guiot, S.R., 2011. Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 43–62. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9209-4>
- Blokker, P., Schouten, S., van den Ende, H., De Leeuw, J.W., Sinnighe Damsté, J.S., 1998. Cell wall-specific ω -hydroxy fatty acids in some freshwater green microalgae. *Phytochemistry* 49, 691–695. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00229-5)
- Bohutskyi, P., Bouwer, E., 2013. Biogas Production from Algae and Cyanobacteria Through Anaerobic Digestion: A Review, Analysis, and Research Needs, in: *Advanced Biofuels and Bioproducts*. Springer, New York, NY, pp. 873–975.
- Braun, E., Aach, H.G., 1975. Enzymatic Degradation of the Cell Wall of *Chlorella*. *Planta* 126, 181–185.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Buchan, A., LeCleir, G.R., Gulvik, C.A., González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>
- Budiyono, B., I. N., W., Seno, J., Sunarso, S., 2009. Influence of Inoculum Content on Performance of Anaerobic Reactors for Treating Cattle Manure using Rumen Fluid Inoculum. *Int. J. Eng. Technol.* 1, 109–116.
- Buitrón, G., Carvajal, C., 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.* 101, 9071–9077. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D.,

- Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M., Buitrón, G., 2016. Biological pretreatments of microalgal biomass for gaseous biofuel production and the potential use of rumen microorganisms: A review. *Algal Res.* 18, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.004>
- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., 2016. Biohydrogen and methane production via a two-step process using an acid pretreated native microalgae consortium. *Bioresour. Technol.* 221, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.050>
- Carver, S.M., Hulatt, C.J., Thomas, D.N., Tuovinen, O.H., 2011. Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H₂ production. *Biodegradation* 22, 805–814. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9419-z>
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M.A., Ponce-Noyola, T., Martínez, A., 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl. Energy* 113, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Castro-Carrera, T., Toral, P.G., Frutos, P., McEwan, N.R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S.E., Belenguer, A., 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J. Dairy Sci.* 97, 1661–1669. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7243>
- Cea-Barcia, G., Buitrón, G., Moreno, G., Kumar, G., 2014. A cost-effective strategy for the bio-prospecting of mixed microalgae with high carbohydrate content: Diversity fluctuations in different growth media. *Bioresour. Technol.* 163, 370–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.079>
- Chang, J.-J., Lin, J.-J., Ho, C.-Y., Chin, W.-C., Huang, C.-C., 2010. Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 13399–13406. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.119>
- Chen, C.-Y., Bai, M.-D., Chang, J.-S., 2013. Improving microalgal oil collecting efficiency by pretreating the microalgal cell wall with destructive bacteria. *Biochem. Eng. J.* 81, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.014>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101, 5330–5336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.026>
- Ciudad, G., Rubilar, O., Azócar, L., Toro, C., Cea, M., Torres, Á., Ribera, A., Navia, R., 2014. Performance of an enzymatic extract in *Botryococcus braunii* cell wall disruption. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.06.012>
- Coleman, G. s., 1983. Hydrolysis of Fraction 1 leaf protein and casein by rumen entodiniomorphid protozoa. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 111–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02654.x>
- Contreras-Dávila, C.A., Méndez-Acosta, H.O., Arellano-García, L., Alatrísté-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2017. Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of *Agave tequilana* bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chem. Eng. J.* 313, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Cotta, M.A., Hespell, R.B., 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 51–58.
- Creevey, C.J., Kelly, W.J., Henderson, G., Leahy, S.C., 2014. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microb. Biotechnol.* 7, 467–479. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12141>
- Dantur, K.I., Enrique, R., Welin, B., Castagnaro, A.P., 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0101-z>
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578–595.
- Davis, S.C., Dohleman, F.G., Long, S.P., 2011. The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* 3, 68–78. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01077.x>
- Delfosse-Debusscher, J., Thines-Sempoux, D., Vanbelle, M., Latteur, B., 1979. Contribution of protozoa to the rumen cellulolytic activity. *Ann. Rech. Veterinaires Ann. Vet. Res.* 10, 255–257.
- Demirbas, A., 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers. Manag.* 51, 2738–2749. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>
- Demirbas, A., 2009. Biofuels, in: Demirbas, A. (Ed), *Biofuels. Green Energy and Technology*, Springer, London, pp. 87–101.

-
- Demuez, M., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2015. Algicidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption. *Biotechnol. Adv.* 33, 1615–1625. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.003>
- Doherty, W.O.S., Mousavioun, P., Fellows, C.M., 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.* 33, 259–276. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.022>
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T., 2012. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front. Plant Sci.* 3, 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Duan, C.-J., Liu, J.-L., Feng, J.-X., 2011. Cloning and Identification of Genes Encoding Acidic Cellulases from the Metagenomes of Buffalo Rumen, in: Bruijn, F.J. de (Ed.), *Handbook of Molecular Microbial Ecology II*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 229–241.
- Duan, C.-J., Xian, L., Zhao, G.-C., Feng, Y., Pang, H., Bai, X.-L., Tang, J.-L., Ma, Q.-S., Feng, J.-X., 2009. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *J. Appl. Microbiol.* 107, 245–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04202.x>
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Ehimen, E.A., Holm-Nielsen, J.-B., Poulsen, M., Boelsmand, J.E., 2013. Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae. *Renew. Energy* 50, 476–480. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.06.064>
- Eriksson, T., Karlsson, J., Tjerneld, F., 2002. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 101, 41–60. <https://doi.org/10.1385/ABAB:101:1:41>
-

- Ferreira, A.F., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., Moura, P., Silva, C.M., 2013. Energy requirement and CO₂ emissions of bioH₂ production from microalgal biomass. *Biomass Bioenergy* 49, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.033>
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A., 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 121–131. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>
- Fricke, W.F., Seedorf, H., Henne, A., Krüer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G., Thauer, R.K., 2006. The Genome Sequence of *Methanospaera stadmanae* Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis. *J. Bacteriol.* 188, 642–658. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.642-658.2006>
- Fu, C.-C., Hung, T.-C., Chen, J.-Y., Su, C.-H., Wu, W.-T., 2010. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresour. Technol.* 101, 8750–8754. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.100>
- Gatellier, J.-P.L.A., de Leeuw, J.W., Sinninghe Damsté, J.S., Derenne, S., Largeau, C., Metzger, P., 1993. A comparative study of macromolecular substances of a Coorongite and cell walls of the extant alga *Botryococcus braunii*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 2053–2068. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90093-C](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90093-C)
- Gerhardt, M., Pelenc, V., Bäuml, M., 2007. Application of hydrolytic enzymes in the agricultural biogas production: Results from practical applications in Germany. *Biotechnol. J.* 2, 1481–1484. <https://doi.org/10.1002/biot.200700220>
- Gerken, H.G., Donohoe, B., Knoshaug, E.P., 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta* 237, 239–253. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0>
- Ghéczy, N., Küchler, A., Walde, P., 2016. Proteinase K activity determination with β-galactosidase as sensitive macromolecular substrate. *Anal. Biochem.* 513, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.08.030>
- Gijzen, H.J., Lubberding, H.J., Verhagen, F.J., Zwart, K.B., Vogels, G.D., 1987. Application of rumen microorganisms for an enhanced anaerobic degradation of solid organic waste materials. *Biol. Wastes* 22, 81–95. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90041-3)
- Gijzen, H.J., Schoenmakers, T.J.M., Caerteling, C.G.M., Vogels, G.D., 1988a. Anaerobic degradation of papermill sludge in a two-phase digester containing

-
- rumen microorganisms and colonized polyurethane foam. *Biotechnol. Lett.* 10, 61–66. <https://doi.org/10.1007/BF01030025>
- Gijzen, H.J., Zwart, K.B., Gelder, P.T. van, Vogels, G.D., 1986. Continuous cultivation of rumen microorganisms, a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 155–162. <https://doi.org/10.1007/BF01982840>
- Gijzen, H.J., Zwart, K.B., Teunissen, M.J., Vogels, G.D., 1988b. Anaerobic digestion of cellulose fraction of domestic refuse by means of rumen microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 749–755. <https://doi.org/10.1002/bit.260320604>
- Gijzen, H.J., Zwart, K.B., Verhagen, F.J.M., Vogels, G.P., 1988. High-Rate two-phase process for the anaerobic degradation of cellulose, employing rumen microorganisms for an efficient acidogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 418–425. <https://doi.org/10.1002/bit.260310505>
- Giménez, J.B., Aguado, D., Bouzas, A., Ferrer, J., Seco, A., 2017. Use of rumen microorganisms to boost the anaerobic biodegradability of microalgae. *Algal Res.* 24, Part A, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.003>
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic Digestion of Algae. *Appl. Microbiol.* 5, 47–55.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012a. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 6, 205–218. <https://doi.org/10.1002/bbb.337>
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012b. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: Focus on cultivation and biofuel production. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 6, 105–113. <https://doi.org/10.1002/bbb.338>
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012c. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenergy* 40, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.008>
- Goyal, A., Ghosh, B., Eveleigh, D., 1991. Characteristics of fungal cellulases. *Bioresour. Technol., Enzymatic Hydrolysis of Cellulose* 36, 37–50. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90098-5)
- Griffiths, D.W., 1986. The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 199, 509–516.
-

- Gronow, S., Munk, C., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.-F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C.D., Brambilla, E., Rohde, M., Göker, M., Detter, J.C., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., 2011. Complete genome sequence of *Paludibacter propionigenes* type strain (WB4T). *Stand. Genomic Sci.* 4, 36–44. <https://doi.org/10.4056/sigs.1503846>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Hach, 2008. Oxygen Demand, Chemical, in: *Water Analysis Handbook*. HACH COMPANY, Loveland, Colorado, U.S.A., pp. 901–912.
- Han, K.J., McCormick, M.E., 2014. Evaluation of nutritive value and in vitro rumen fermentation gas accumulation of de-oiled algal residues. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 31. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-31>
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Harun, R., Danquah, M.K., 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* 168, 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088>
- Harun, R., Yip, J.W.S., Thiruvankadam, S., Ghani, W.A.W.A.K., Cherrington, T., Danquah, M.K., 2014. Algal biomass conversion to bioethanol – a step-by-step assessment. *Biotechnol. J.* 9, 73–86. <https://doi.org/10.1002/biot.201200353>
- He, S., Fan, X., Katukuri, N.R., Yuan, X., Wang, F., Guo, R.-B., 2016. Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment. *Bioresour. Technol.* 204, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.073>
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Collaborators, G.R.C., Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Arenas, G.N., Ariza, C., Attwood, G.T., Avila, J.M., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M.F., Brown-Kav, A., Carvajal, A.M., Cersosimo, L., Chaves, A.V., Church, J., Clipson, N., Cobos-Peralta, M.A., Cookson, A.L., Cravero, S., Carballo, O.C., Crosley, K., Cruz, G., Cucchi, M.C., Barra, R. de la, Menezes, A.B.D., Detmann, E., Dieho, K., Dijkstra, J., Reis, W.L.S. dos, Dugan, M.E.R., Ebrahimi, S.H., Eythórsdóttir, E., Fon, F.N., Fraga, M., Franco, F., Friedeman,

- C., Fukuma, N., Gagić, D., Gangnat, I., Grilli, D.J., Guan, L.L., Miri, V.H., Hernandez-Sanabria, E., Gomez, A.X.I., Isah, O.A., Ishaq, S., Jami, E., Jelincic, J., Kantanen, J., Kelly, W.J., Kim, S.-H., Klieve, A., Kobayashi, Y., Koike, S., Kopecny, J., Kristensen, T.N., Krizsan, S.J., LaChance, H., Lachman, M., Lamberson, W.R., Lambie, S., Lassen, J., Leahy, S.C., Lee, S.-S., Leiber, F., Lewis, E., Lin, B., Lira, R., Lund, P., Macipe, E., Mamuad, L.L., Mantovani, H.C., Marcoppido, G.A., Márquez, C., Martin, C., Martinez, G., Martinez, M.E., Mayorga, O.L., McAllister, T.A., McSweeney, C., Mestre, L., Minnee, E., Mitsumori, M., Mizrahi, I., Molina, I., Muenger, A., Muñoz, C., Murovec, B., Newbold, J., Nsereko, V., O'Donovan, M., Okunade, S., O'Neill, B., Ospina, S., Ouwerkerk, D., Parra, D., Pereira, L.G.R., Pinares-Patiño, C., Pope, P.B., Poulsen, M., Rodehutschord, M., Rodriguez, T., Saito, K., Sales, F., Sauer, C., Shingfield, K., Shoji, N., Simunek, J., Stojanović-Radić, Z., Stres, B., Sun, X., Swartz, J., Tan, Z.L., Tapio, I., Taxis, T.M., Tomkins, N., Ungerfeld, E., Valizadeh, R., Adrichem, P. van, Hamme, J.V., Hoven, W.V., Waghorn, G., Wallace, R.J., Wang, M., Waters, S.M., Keogh, K., Witzig, M., Wright, A.-D.G., Yamano, H., Yan, T., Yáñez-Ruiz, D.R., Yeoman, C.J., Zambrano, R., Zeitz, J., Zhou, M., Zhou, H.W., Zou, C.X., Zunino, P., Janssen, P.H., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5, srep14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>
- Hernández-Salas, J.M., Villa-Ramírez, M.S., Veloz-Rendón, J.S., Rivera-Hernández, K.N., González-César, R.A., Plascencia-Espinosa, M.A., Trejo-Estrada, S.R., 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresour. Technol.* 100, 1238–1245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>
- Ho, C.-Y., Chang, J.-J., Lin, J.-J., Chin, T.-Y., Mathew, G.M., Huang, C.-C., 2011. Establishment of functional rumen bacterial consortia (FRBC) for simultaneous biohydrogen and bioethanol production from lignocellulose. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 12168–12176. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.125>
- Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. Effects of Differential Solid-Liquid Removal Rates on Protozoa Numbers in Continuous Cultures of Rumen Contents. *J. Anim. Sci.* 43, 528–534. <https://doi.org/10.2527/jas1976.432528x>
- Hu, Z.-H., Yu, H.-Q., 2005. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochem.* 40, 2371–2377. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.021>

- Hu, Z.-H., Yu, H.-Q., Yue, Z.-B., Harada, H., Li, Y.-Y., 2007. Kinetic analysis of anaerobic digestion of cattail by rumen microbes in a modified UASB reactor. *Biochem. Eng. J.* 37, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.04.013>
- Jang, J.-S., Cho, Y., Jeong, G.-T., Kim, S.-K., 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0611-2>
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.-S., Passoth, V., Richardson, P.M., 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.* 25, nbt1290. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>
- Jiménez, D.J., Bossi, M.J. de L., Schückel, J., Kračun, S.K., Willats, W.G.T., Elsas, J.D. van, 2016. Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics- and metasecretomics-based approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 10463–10477. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7713-3>
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Spec. Issue Biofuels - II Algal Biofuels Microb. Fuel Cells* 102, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Pretreat. Biomass* 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kavitha, S., Subbulakshmi, P., Rajesh Banu, J., Gobi, M., Tae Yeom, I., 2017. Enhancement of biogas production from microalgal biomass through cellulolytic bacterial pretreatment. *Bioresour. Technol.* 233, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.081>
- Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wi, S.G., Bae, H.-J., 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresour. Technol.* 153, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.059>
- Kim, M.-S., Baek, J.-S., Yun, Y.-S., Jun Sim, S., Park, S., Kim, S.-C., 2006. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 812–816. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.06.009>

- Kistner, A., Kornelius, J.H., 1990. A small-scale, three-vessel, continuous culture system for quantitative studies of plant fibre degradation by anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 12, 173–182. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(90\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0167-7012(90)90028-5)
- Kivaisi, A.K., Eliapenda, S., 1995. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic degradation of bagasse and maize bran. *Biomass Bioenergy* 8, 45–50. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(94\)00075-5](https://doi.org/10.1016/0961-9534(94)00075-5)
- Koh, L.P., Ghazoul, J., 2008. Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. *Biol. Conserv.* 141, 2450–2460. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.08.005>
- Kopečný, J., Hodrová, B., Stewart, C. s., 1996. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 195–198. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb00063.x>
- Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., Martens, E.C., 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lakaniemi, A.-M., Tuovinen, O.H., Puhakka, J.A., 2013. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers – A review. *Biorefineries* 135, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.096>
- Lalaoui, F., Halama, P., Dumortier, V., Paul, B., 2000. Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness. *Plant Pathol.* 49, 727–733. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00491.x>
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6475–6481. <https://doi.org/10.1021/es900705j>
- Lazuka, A., Auer, L., Bozonnet, S., Morgavi, D.P., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., 2015. Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 196, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.084>
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements.

-
- Int. Conf. Lignocellul. Ethanol 46, 89–101.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>
- Leeuw, J.W. de, Versteegh, G.J.M., Bergen, P.F. van, 2005. Biomacromolecules of algae and plants and their fossil analogues, in: Plants and Climate Change, Tasks for Vegetation Science. Springer, Dordrecht, pp. 209–233.
- Li, H., Foston, M.B., Kumar, R., Samuel, R., Gao, X., Hu, F., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E., 2012. Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast-growing, drought-tolerant biofuels feedstock. RSC Adv. 2, 4951–4958. <https://doi.org/10.1039/C2RA20557B>
- Li, J., Yuan, H., Yang, J., 2009. Bacteria and lignin degradation. Front. Biol. China 4, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s11515-008-0097-8>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N., 2008. Biofuels from microalgae. Biotechnol. Prog. 24, 815–820.
<https://doi.org/10.1021/bp070371k>
- Lin Yunqin, Wang Dehan, Wang Lishang, 2010. Biological pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge. Waste Manag. Res. 28, 800–810. <https://doi.org/10.1177/0734242X09358734>
- Liu, C.-H., Chang, C.-Y., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2012. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. Int. J. Hydrog. Energy, The 2011 Asian Bio-Hydrogen and Biorefinery Symposium (2011ABBS) 37, 15458–15464.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.076>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Lü, F., Ji, J., Shao, L., He, P., 2013. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. Biotechnol. Biofuels 6, 92. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-92>
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. van, Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Lynd, L.R., Zyl, W.H. van, McBride, J.E., Laser, M., 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Curr. Opin. Biotechnol., Tissue and cell engineering/Biochemical engineering 16, 577–583.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.08.009>
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2015. Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semi-
-

-
- continuous anaerobic digestion. Fuel 158, 35–41.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.04.052>
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014a. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. Energy Convers. Manag. 85, 551–557.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.097>
- Mahdy, A., Mendez, L., Blanco, S., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2014b. Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: effect on methane production. Bioresour. Technol. 171, 421–427.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.091>
- Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar Morales, M., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2016. Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus sp.* J. Chem. Technol. Biotechnol. 91, 1299–1305. <https://doi.org/10.1002/jctb.4722>
- Mangayil, R., Santala, V., Karp, M., 2011. Fermentative hydrogen production from different sugars by *Citrobacter sp. CMC-1* in batch culture. Int. J. Hydrog. Energy 36, 15187–15194. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.08.076>
- Mathew, G.M., Mathew, D.C., Lo, S.-C., Alexios, G.M., Yang, J.-C., Sashikumar, J.M., Shaikh, T.M., Huang, C.-C., 2013. Synergistic collaboration of gut symbionts in *Odontotermes formosanus* for lignocellulosic degradation and bio-hydrogen production. Bioresour. Technol., Special Issue: IBS 2012 & Special Issue: IFIBiop 145, 337–344.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.055>
- Matsumoto, M., Yokouchi, H., Suzuki, N., Ohata, H., Matsunaga, T., 2003. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production. Appl. Biochem. Biotechnol. 105, 247–254.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:105:1-3:247>
- Maya-Altamira, L., Baun, A., Angelidaki, I., Schmidt, J.E., 2008. Influence of wastewater characteristics on methane potential in food-processing industry wastewaters. Water Res. 42, 2195–2203.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.033>
- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43, 99–109.
- McNally, D.L., Mihelcic, J.R., Lueking, D.R., 1998. Biodegradation of Three- and Four-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Aerobic and Denitrifying Conditions. Environ. Sci. Technol. 32, 2633–2639.
<https://doi.org/10.1021/es980006c>
-

- Mendes-Pinto, M.M., Raposo, M.F.J., Bowen, J., Young, A.J., Morais, R., 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.* 13, 19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1008183429747>
- Metzger, P., Largeau, C., 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 486–496. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1779-z>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Noike, T., 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.* 73, 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00130-3)
- Montiel Corona, V., Razo-Flores, E., 2018. Continuous hydrogen and methane production from *Agave tequilana* bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Mooney, C.A., Mansfield, S.D., Touhy, M.G., Saddler, J.N., 1998. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresour. Technol.* 64, 113–119. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00181-8)
- Morant, M., Jørgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Møller, B.L., Werck-Reichhart, D., Bak, S., 2007. CYP703 Is an Ancient Cytochrome P450 in Land Plants Catalyzing in-Chain Hydroxylation of Lauric Acid to Provide Building Blocks for Sporopollenin Synthesis in Pollen. *Plant Cell.* <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045948>
- Mu, R., Fan, Z., Pei, H., Yuan, X., Liu, S., Wang, X., 2007. Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5. *J. Environ. Sci.* 19, 1336–1340. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60218-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60218-6)
- Muñoz, C., Hidalgo, C., Zapata, M., Jeison, D., Riquelme, C., Rivas, M., 2014. Use of cellulolytic marine bacteria for enzymatic pretreatment in microalgal biogas production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4199–4206. <https://doi.org/10.1128/AEM.00827-14>
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>

-
- Nagaraja, T.G., 2016. Microbiology of the Rumen, in: Rumenology. Springer, Cham, pp. 39–61.
- Neuwirth, E., 2014. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes, R package version 1.1-2.
- Ni, J., Tokuda, G., 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnol. Adv.*, “Bioenergy and Biorefinery from Biomass” through innovative technology development 31, 838–850. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.005>
- Niladevi, K.N., 2009. Ligninolytic Enzymes, in: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer, Dordrecht, pp. 397–414.
- Nissilä, M.E., Tähti, H.P., Rintala, J.A., Puhakka, J.A., 2011. Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. *Int. J. Hydrog. Energy*, The 3rd Annual Korea-USA Joint Symposium on Hydrogen & Fuel Cell Technologies 36, 1482–1490. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.010>
- Nocek, J.E., Russell, J.B., 1988. Protein and Energy as an Integrated System. Relationship of Ruminant Protein and Carbohydrate Availability to Microbial Synthesis and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 71, 2070–2107. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79782-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9)
- Oh, J.-I., Kim, M.-J., Lee, J.-Y., Ko, I.-J., Kim, W., Kim, S.W., 2011. Isolation and characterization of algicidal bacteria from *Cochlodinium polykrikoides* culture. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 1124–1133. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0232-2>
- Orpin, C.G., Joblin, K.N., 1997. The rumen anaerobic fungi, in: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, Dordrecht, pp. 140–195.
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, K.L., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, J.A., Cortés-Carmona, M.Á., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2017. Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technol. Environ. Policy* 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1421-2>
- Panjaitan, T., Quigley, S.P., McLennan, S.R., Poppi, D.P., 2010. Effect of the concentration of *Spirulina (Spirulina platensis)* algae in the drinking water on water intake by cattle and the proportion of algae bypassing the rumen. *Anim. Prod. Sci.* 50, 405–409. <https://doi.org/10.1071/AN09194>
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Biofuels - II:
-

-
- Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells 102, 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.114>
- Paul, C., Pohnert, G., 2011. Interactions of the Algicidal Bacterium *Kordia algicida* with Diatoms: Regulated Protease Excretion for Specific Algal Lysis. *PLOS ONE* 6, e21032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021032>
- Pavlostathis, S.G., Miller, T.L., Wolin, M.J., 1988. Fermentation of Insoluble Cellulose by Continuous Cultures of *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2655–2659.
- Pérez-Pimienta, J.A., Vargas-Tah, A., López-Ortega, K.M., Medina-López, Y.N., Mendoza-Pérez, J.A., Avila, S., Singh, S., Simmons, B.A., Loaces, I., Martínez, A., 2017. Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 225, 191–198.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.064>
- Pérez-Rangel, M., Quiroz-Figueroa, F.R., González-Castañeda, J., Valdez-Vazquez, I., 2015. Microscopic analysis of wheat straw cell wall degradation by microbial consortia for hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 40, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.050>
- Petri, R.M., Schwaiger, T., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Forster, R.J., McKinnon, J.J., McAllister, T.A., 2013. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. *PLoS ONE* 8, 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083424>
- Piegza, M., Witkowska, D., Stempniewicz, R., 2014. Enzymatic and molecular characteristics of *Geotrichum candidum* strains as a starter culture for malting. *J. Inst. Brew.* 120, 341–346. <https://doi.org/10.1002/jib.167>
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Marsic, D., Whitman, W.B., Lupa, B., Tang, J., Krader, P., 2009. *Proteocatella sphenisci* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, spore-forming anaerobe isolated from penguin guano. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2302–2307. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002816-0>
- Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sebkova, A., Sisak, F., Rychlik, I., 2016. Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1569–1576.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03473-15>
-

- Popper, Z.A., Tuohy, M.G., 2010. Beyond the Green: Understanding the Evolutionary Puzzle of Plant and Algal Cell Walls. *Plant Physiol.* 153, 373–383. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158055>
- Pourramezan, Z., Ghezelbash, G.R., Romani, B., Ziaei, S., Hedayatkah, A., 2012. Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus* (Silvestri). *Microbiology* 81, 736–742. <https://doi.org/10.1134/S0026261712060124>
- Prajapati, S.K., Bhattacharya, A., Malik, A., Vijay, V.K., 2015. Pretreatment of algal biomass using fungal crude enzymes. *Algal Res.* 8, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.011>
- Prajapati, S.K., Choudhary, P., Malik, A., Vijay, V.K., 2014. Algae mediated treatment and bioenergy generation process for handling liquid and solid waste from dairy cattle farm. *Bioresour. Technol.* 167, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.038>
- Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, V.K., 2013. Phycoremediation and biogas potential of native algal isolates from soil and wastewater. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.069>
- Raposo, F., Banks, C., Siegert, I., Heaven, S., Borja, R., 2006. Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochem.* 41, 1444–1450.
- Raposo, F., Borja, R., Martín, M.A., Martín, A., de la Rubia, M.A., Rincón, B., 2009. Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation. *Chem. Eng. J.* 149, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.10.001>
- Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2000. Dynamics of Bacterial Community Composition and Activity during a Mesocosm Diatom Bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 578–587. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.578-587.2000>
- Rios-González, L.J., Morales-Martínez, T.K., Rodríguez-Flores, M.F., Rodríguez-De la Garza, J.A., Castillo-Quiroz, D., Castro-Montoya, A.J., Martínez, A., 2017. Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresour. Technol., Special Issue on International Conference on Current Trends in Biotechnology & post ICCB-2016 conference on Strategies for Environmental Protection and Management (ICSEPM-2016)* 242, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.039>
- RStudio Team, (primero), 2016. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, Inc., Boston, MA.

-
- Russell, J.B., Rychlik, J.L., 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292, 1119–1122.
- Sacristán, N., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2012. Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. *Food Microbiol.* 30, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.003>
- Sadhu, S., Saha, P., Mayilraj, S., Maiti, T.K., 2012. Characterization of a *Bosea* sp. strain SF5 (MTCC 10045) isolated from compost soil capable of producing cellulase. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2, 576–591.
- Salazar, O., Asenjo, J.A., 2007. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol. Lett.* 29, 985–994. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9345-2>
- Salyers, A.A., Palmer, J.K., Wilkins, T.D., 1977. Laminarinase (beta-glucanase) activity in *Bacteroides* from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1118–1124.
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A.J., Martinez-Pacheco, M.M., Sosa-Aguirre, C.R., Campos-Garcia, J., 2011. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 725–732. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0853-z>
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Scholz, M.J., Weiss, T.L., Jinkerson, R.E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M.C., Gerken, H.G., 2014. Ultrastructure and Composition of the *Nannochloropsis gaditana* Cell Wall. *Eukaryot. Cell* 13, 1450–1464. <https://doi.org/10.1128/EC.00183-14>
- Schwarz, W., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 634–649. <https://doi.org/10.1007/s002530100710>
- Selinger, L.B., Forsberg, C.W., Cheng, K.-J., 1996. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. *Anaerobe* 2, 263–284. <https://doi.org/10.1006/anae.1996.0036>
- Seshadri, R., Leahy, S.C., Attwood, G.T., Teh, K.H., Lambie, S.C., Cookson, A.L., Eloe-Fadrosh, E.A., Pavlopoulos, G.A., Hadjithomas, M., Varghese, N.J., Paez-Espino, D., Collaborators, H. project, Palevich, N., Janssen, P.H., Ronimus, R.S., Noel, S., Soni, P., Reilly, K., Atherly, T., Ziemer, C., Wright, A.-D., Ishaq, S., Cotta, M., Thompson, S., Crosley, K., McKain, N., Wallace, R.J., Flint, H.J., Martin, J.C., Forster, R.J., Gruninger, R.J., McAllister, T.,
-

- Gilbert, R., Ouwerkerk, D., Klieve, A., Jassim, R.A., Denman, S., McSweeney, C., Rosewarne, C., Koike, S., Kobayashi, Y., Mitsumori, M., Shinkai, T., Cravero, S., Cucchi, M.C., Perry, R., Henderson, G., Creevey, C.J., Terrapon, N., Lapebie, P., Drula, E., Lombard, V., Rubin, E., Kyripides, N.C., Henrissat, B., Woyke, T., Ivanova, N.N., Kelly, W.J., 2018. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nat. Biotechnol.* 36, 359–367. <https://doi.org/10.1038/nbt.4110>
- Sethi, R., Padmavathi, T., Sullia, S., 2013. Lignocellulose biomass degradation by marine microorganisms. *Eur. J. Exp. Biol.* 3, 129–138.
- Sheath, R.G., Wehr, J.D., 2003. 1 - INTRODUCTION TO FRESHWATER ALGAE, in: *Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification*. Academic Press, Amsterdam, pp. 1–9.
- Shrestha, P., Ibáñez, A.B., Bauer, S., Glassman, S.I., Szaro, T.M., Bruns, T.D., Taylor, J.W., 2015. Fungi isolated from *Miscanthus* and sugarcane: biomass conversion, fungal enzymes, and hydrolysis of plant cell wall polymers. *Biotechnol. Biofuels* 8, 38. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0221-3>
- Silley, P., 1985. A note on the pectinolytic enzymes of *Lachnospira multiparus*. *J. Appl. Bacteriol.* 58, 145–149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb01441.x>
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., Taylor, M., 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.* 101, 1570–1580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>
- Singh, P.B., Saini, H.S., Kahlon, R.S., 2016. *Pseudomonas*: The Versatile and Adaptive Metabolic Network, in: Kahlon, R.S. (Ed.), *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer International Publishing, pp. 81–126.
- Song, H., Clarke, W.P., Blackall, L.L., 2005. Concurrent microscopic observations and activity measurements of cellulose hydrolyzing and methanogenic populations during the batch anaerobic digestion of crystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 369–378. <https://doi.org/10.1002/bit.20517>
- Staehelein, L.A., Pickett-Heaps, J.D., 1975. The ultrastructure of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). I. Species with the “reticulate” or “warty” type of ornamental layer. *J. Phycol.* 11, 163–185. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1975.tb02765.x>
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., 1997. The rumen bacteria, in: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, Dordrecht, pp. 10–72.

- Stokes, R.S., Emon, V., L, M., Loy, D.D., Hansen, S.L., 2015. Assessment of algae meal as a ruminant feedstuff: Nutrient digestibility in sheep as a model species. *J. Anim. Sci.* 93, 5386–5394. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9583>
- Sun, J., Yuan, X., Shi, X., Chu, C., Guo, R., Kong, H., 2011. Fermentation of *Chlorella sp.* for anaerobic bio-hydrogen production: Influences of inoculum–substrate ratio, volatile fatty acids and NADH. *Bioresour. Technol.* 102, 10480–10485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.016>
- Surendhiran, D., Vijay, M., 2014. Effect of Various Pretreatment for Extracting Intracellular Lipid from *Nannochloropsis oculata* under Nitrogen Replete and Depleted Conditions [WWW Document]. *Int. Sch. Res. Not.* URL <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/536310/> (accessed 2.12.18).
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Takeda, H., 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry* 42, 673–675. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00952-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00952-3)
- Taylor, B.F., 1983. Aerobic and anaerobic catabolism of vanillic acid and some other methoxy-aromatic compounds by *Pseudomonas sp.* strain PN-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1286–1292.
- Tracy, B.P., Jones, S.W., Fast, A.G., Indurthi, D.C., Papoutsakis, E.T., 2012. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 364–381. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.008>
- Uggetti, E., Sialve, B., Trably, E., Steyer, J.-P., 2014. Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 8, 516–529. <https://doi.org/10.1002/bbb.1469>
- Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., Amaya-Delgado, L., 2015. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel* 159, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.052>
- Valenzuela, A., 2011. A new agenda for blue agave landraces: food, energy and tequila. *GCB Bioenergy* 3, 15–24. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01082.x>
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vanegas, C.H., Hernon, A., Bartlett, J., 2015. Enzymatic and organic acid pretreatment of seaweed: effect on reducing sugars production and on biogas inhibition. *Int. J. Ambient Energy* 36, 2–7. <https://doi.org/10.1080/01430750.2013.820143>
- Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Manag.* 28, 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y., 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour. Technol.* 56, 229–237. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00034-X)
- Wang, H., Hill, R.T., Zheng, T., Hu, X., Wang, B., 2016. Effects of bacterial communities on biofuel-producing microalgae: stimulation, inhibition and harvesting. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 341–352. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.961402>
- Wang, X., Li, Z., Su, J., Tian, Y., Ning, X., Hong, H., Zheng, T., 2010. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarensense*, caused by bacteria from its phycosphere. *Biol. Control* 52, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.004>
- Wang, Y., McAllister, T.A., 2002. Rumen Microbes, Enzymes and Feed Digestion-A Review, Rumen Microbes, Enzymes and Feed Digestion-A Review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* Asian-Australas. J. Anim. Sci. 15, 1659–1676. <https://doi.org/2002.15.11.1659>
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W.H.A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B., 2016. *ggplots: Various R Programming Tools for Plotting Data.*
- Weimer, P.J., Russell, J.B., Muck, R.E., 2009. Lessons from the cow: What the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 5323–5331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.075>
- Whelan, W.J., Nasr, H., 1951. The amylase of *Clostridium butyricum*. *Biochem. J.* 48, 416–422. <https://doi.org/10.1042/bj0480416>

-
- Wiley, P.E., Campbell, J.E., McKuin, B., 2011. Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A Review of Process Train Options. *Water Environ. Res.* 83, 326–338. <https://doi.org/10.2175/106143010X12780288628615>
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5, 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>
- Wolin, M.J., Miller, T.L., Stewart, C.S., 1997. Microbe-microbe interactions, in: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, Dordrecht, pp. 467–491.
- Yamada, R., Hasunuma, T., Kondo, A., 2013. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol. Adv.*, “Bioenergy and Biorefinery from Biomass” through innovative technology development 31, 754–763. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.02.007>
- Yen, H.-W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.010>
- Young, E., Lee, S.-M., Alper, H., 2010. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnol. Biofuels* 3, 24. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-24>
- Yun, Y.-M., Jung, K.-W., Kim, D.-H., Oh, Y.-K., Cho, S.-K., Shin, H.-S., 2013. Optimization of dark fermentative H₂ production from microalgal biomass by combined (acid+ultrasonic) pretreatment. *Bioresour. Technol., Challenges in Environmental Science and Engineering (CESE-2012)* 141, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.054>
- Yun, Y.-M., Kim, D.-H., Oh, Y.-K., Shin, H.-S., Jung, K.-W., 2014. Application of a novel enzymatic pretreatment using crude hydrolytic extracellular enzyme solution to microalgal biomass for dark fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 159, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.129>
- Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerijs, A.L., Weckhuysen, B.M., 2010. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chem. Rev.* 110, 3552–3599. <https://doi.org/10.1021/cr900354u>
- Zhang, H., Zhang, P., Ye, J., Wu, Y., Fang, W., Gou, X., Zeng, G., 2016. Improvement of methane production from rice straw with rumen fluid pretreatment: A feasibility study. *Chall. Environ. Sci. Engineering – 2015* 113, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.022>
-

-
- Zhang, L., Chung, J., Jiang, Q., Sun, R., Zhang, J., Zhong, Y., Ren, N., 2017. Characteristics of rumen microorganisms involved in anaerobic degradation of cellulose at various pH values. *RSC Adv.* 7, 40303–40310. <https://doi.org/10.1039/C7RA06588D>
- Zhao, B., Liu, J., Frear, C., Holtzapple, M., Chen, S., 2016. Consolidated bioprocessing of microalgal biomass to carboxylates by a mixed culture of cow rumen bacteria using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Bioresour. Technol.* 222, 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.120>
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., Dou, C., 2011. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1215–1224. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9207-1>
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog. Energy Combust. Sci.* 42, 35–53. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>
- Ziemiński, K., Romanowska, I., Kowalska, M., 2012. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste Manag.* 32, 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.01.016>

PRODUCTOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Artículos en revistas indizadas

- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., 2017. Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresour. Technol.* 244, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.117>
- Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M., Buitrón, G., 2016. Biological pretreatments of microalgal biomass for gaseous biofuel production y the potential use of rumen microorganisms: A review. *Algal Res.* 18, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.004>
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Semi-continuous pretreatment of microalgal biomass with ruminal microorganisms to increase the gaseous biofuels recovery (En preparación).
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Ruminal fluid as pretreatment of agave bagasse to improve methane production (En preparación).

Presentaciones en congresos

- Barragán-Trinidad, M. and Buitrón, G. Pre-treatment of agave bagasse using ruminal fluid for methane production. 16th IWA World Conference on Anaerobic Digestion. Delft, Netherlands, 23-27 de junio de 2019.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Pretratamiento de bagazo de agave con microorganismos ruminal para incrementar la recuperación de biogás. IV Reunión Nacional de la Red Temática de Bioenergía. Cuernavaca, México, 13-15 de noviembre de 2017. Póster.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Hidrólisis de biomasa microalgal empleando microorganismos ruminales para la aplicación en la generación de biocombustibles gaseosos. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, México, 25-30 de junio de 2017. Presentación oral.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Hidrólisis de biomasa microalgal por microorganismos ruminales para incrementar la producción de hidrógeno. 5th IWA México Young Water Professionals Conference. Morelia, México, 24-26 de mayo de 2017. Presentación oral. Mejor presentación oral.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Hydrolysis of microalgal biomass by ruminal bacteria in a discontinuous reactor. 1st IWA Conference on Algal Technologies for Wastewater Treatment y Resource Recovery. Delft, Holanda, 16-17 de marzo de 2017. Póster.
- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Increase of the methane production from microalgal biomass by using ruminal microorganisms for pre-

treatment. International Conference Progress in Biogas IV. Stuttgart, Alemania, 8-11 de marzo de 2017. Presentación oral.

- Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G. Evaluación de métodos de hidrólisis de microalgas para incrementar la generación de biocombustibles gaseosos. 4th IWA México Young Water Professionals Conference. Guanajuato, México, 27-29 de abril de 2015. Póster.
- Barragán-Trinidad, M., Buitrón, G. Evaluación de métodos de hidrólisis de microalgas para incrementar la generación de biocombustibles gaseosos. 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Querétaro. Querétaro, México, 5-6 de noviembre de 2014. Póster.