



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA-RESIDUOS**

**INGENIERÍA AMBIENTAL**

**HIDRÓLISIS SEMICONTINUA DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS  
MEDIANTE MICROORGANISMOS RUMINALES PARA LA PRODUCCIÓN  
DE METANO**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**PRESENTA:  
ING. JULIÁN OSVALDO SÁNCHEZ LARA**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. JULIÁN CARILLO REYES**

**COMITÉ TUTORAL:  
DRA. MA. DE LOURDES BERENICE CELIS GARCÍA- IPICYT  
DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ- INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM**

Ciudad de México, agosto de 2019



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: Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis

Secretario: Dra. Idania Valdez Vázquez

Vocal: Dr. Arturo Sánchez

2<sup>do</sup> Vocal: Dr. Oscar González Barceló

3<sup>er</sup> Vocal: Dr. Julián Carrillo Reyes

**LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:**

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA).  
Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México.

**TUTOR DE TESIS:**

Dr. Julián Carrillo Reyes

*Julián Carrillo R.*  
**FIRMA**

## **FINANCIAMIENTO**

Se agradece el financiamiento de este trabajo de investigación al Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT, Clúster Biocombustibles Gaseosos, 247006. Se agradece al proyecto PAPIIT IA100518, UNAM.

Se agradece a CONACYT por la beca otorgada para la realización del estudio de maestría durante el periodo del 2018-1 al 2019-2.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por llenarme de su fortaleza para vencer todos los obstáculos de la vida, por protegerme durante mi camino y por su amor infinito.

A mi querida madre por ser siempre incondicional, comprensible, escucharme, aconsejarme, educarme, y lo más importante por amarme.

A mi padre por regresar a mi vida y demostrarme su apoyo, nunca es tarde para perdonar y amar.

A mis tíos Gladis y Alfredo, por quererme como un hijo, por su apoyo y su cariño.

A mi familia que a pesar de la distancia siempre los tengo presentes.

A mi tutor, el Dr. Julián Carrillo Reyes por guiarme de manera acertada, por todo el aprendizaje transmitido y por alentarme siempre a dar mi mayor esfuerzo en la realización de este trabajo. Mi admiración hacia usted como persona y como tutor.

A los miembros de mi comité el Dr. Oscar González Barceló, a la Dra. Berenice Celis García y al Dr. Arturo Sánchez Carmona por sus comentarios y aportaciones para mejorar este trabajo de tesis.

A la Dra. Idania Valdez y al Dr. Cristian Hernández por su disponibilidad de responder cualquier inquietud y compartirme su conocimiento profesional.

A los maestros Jaime Pérez y Gloria Moreno por su asistencia técnica en el laboratorio, así como también sus comentarios de apoyo durante los momentos de arduo trabajo.

Con quienes compartí estos dos años de maestría: Sharon, Alberto, David, Alejandra, Yara, Dayanira, Adán y Mauricio, gracias por las alegrías y tristezas, por el apoyo personal y profesional; les deseo mucho éxito en todo lo que se propongan.

A Jonathan, Caro Mejía, Karina, Caro Arellano, Yeinner, Felipe, Sharon Villegas, Jaime Rueda y Rocher. No saben lo mucho que estoy agradecido de tenerlos en mi vida y ser parte de esa familia que formé lejos de casa. Aprendí muchas cosas de cada uno de ustedes; nunca dejen de darlo todo por lo que quieren en la vida.

A Martin Barragán por enseñarme todo lo necesario para el desarrollo experimental de este trabajo. Gracias por compartir tus conocimientos del tema y por tener la disponibilidad de ayudarme.

Finalmente, a todos los investigadores, doctorantes y post doctorantes que de alguna forma no dudaron en ayudarme en alguna cuestión académica.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Marco Teórico</b> .....	<b>2</b>
2.1 Residuos lignocelulósicos en México.....	2
2.2 Composición de la biomasa lignocelulósica.....	2
2.3 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica.....	5
2.3.1 Pretratamientos físicos.....	6
2.3.2 Pretratamientos químicos.....	6
2.3.3 Pretratamientos fisicoquímicos.....	7
2.3.4 Pretratamientos biológicos.....	7
2.4 Microorganismos ruminales.....	9
2.4.1 Hidrólisis de residuos lignocelulósicos con microorganismos ruminales.....	9
2.5 Digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos.....	11
<b>3. Justificación</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
4.1 Objetivo General.....	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>6. Metodología</b> .....	<b>15</b>
6.1 Biomasa lignocelulósica e inóculos.....	15
6.1.1 Biomasa lignocelulósica.....	15
6.1.2 Contenido ruminal.....	15
6.1.3 Lodo anaerobio.....	15
6.2 Medios de cultivo.....	15
6.2.1 Medio de cultivo para experimentos con microorganismos ruminales.....	15
6.2.2 Medio para los ensayos de producción de metano.....	15
6.3 Diseño de experimentos.....	16
6.3.1 Evaluación de hidrólisis con diferentes biomazas lignocelulósicas.....	16
6.3.2 Enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos.....	16
6.3.3 Hidrólisis semicontinua de bagazo de <i>A. tequilana</i> .....	16
6.3.4 Evaluación de metano a partir del hidrolizado y del bagazo pretratado.....	18
6.3.5 Cinética durante la operación del reactor semi continuo.....	19
6.3.6 Pretratamiento biológico de bagazo <i>A. tequilana</i> en un volumen mayor.....	19
6.4 Métodos analíticos.....	20
6.5 Actividad enzimática.....	20
6.6 Caracterización de la biomasa lignocelulósica.....	20
6.7 Microscopía Electrónica de Barrido.....	20
6.8 Análisis de comunidad microbiana.....	21
6.9 Ecuaciones.....	21
6.10 Análisis estadísticos.....	22
<b>7. Resultados y discusión</b> .....	<b>23</b>
7.1 Caracterización de biomasa lignocelulósica y contenido ruminal.....	23
7.2 Evaluación de la hidrólisis con diferentes biomazas lignocelulósicas.....	24
7.2.1 Cambios en la actividad enzimática.....	25
7.2.2 Análisis de comunidad microbiana.....	27
7.2.3 Relación de la composición de la biomasa lignocelulósica con el rendimiento de hidrólisis.....	29
7.3 Enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos.....	30
7.4 Hidrólisis semicontinua de bagazo de <i>A. tequilana</i> .....	31
7.5 Cinética de hidrólisis.....	33
7.6 Evaluación de metano a partir del hidrolizado y del bagazo pretratado.....	34
7.7 Pretratamiento biológico de bagazo <i>A. tequilana</i> en un volumen mayor.....	36
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>38</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>39</b>

## Índice de figuras

Figura 2. 1. Estructura y composición de la biomasa lignocelulósica.....	3
Figura 2.2. Estructura de la celulosa. ....	4
Figura 2.3. Monómeros de la hemicelulosa .....	4
Figura 2.4. Estructura de la lignina .....	5
Figura 2.5. Fases de la digestión anaerobia y poblaciones de microorganismos .....	12
Figura 6.1. Diagrama general de operación del reactor semicontinuo. ....	17
Figura 6.2. Montaje experimental para la prueba de PBM. ....	18
Figura 6.3. Montaje de reactor de 100 L. ....	19
Figura 7.1. Composición de los tres bagazos evaluados. ....	23
Figura 7.2. Rendimiento de hidrólisis de las biomásas lignocelulósicas pretratadas con microorganismos ruminales vs microorganismos nativos. ....	24
Figura 7.3. Metabolitos generados en el hidrolizado obtenido en los tres diferentes bagazos.....	26
Figura 7.4. Cambios en las actividades enzimáticas CMC y Xilanasas en la hidrólisis de biomásas lignocelulósicas. ....	26
Figura 7.5. A) Análisis de la comunidad microbiana a nivel de filo. Solo se muestran los phylum con abundancia relativa mayor al 1%; B) Dendograma de las comunidades microbianas. ....	28
Figura 7.6. Análisis de la comunidad fúngica seleccionada, a nivel de género, durante el pretratamiento con contenido ruminal. Solo se muestran los géneros con abundancia relativa mayor al 1%. ....	29
Figura 7.7. Correlación de RH vs lignina.....	30
Figura 7.8. Perfil de la DQO soluble durante la etapa de enriquecimiento, cada medición corresponde a un ciclo diferente.....	30
Figura 7.9. Análisis de la comunidad microbiana seleccionada, a nivel de filo, durante los ciclos de enriquecimiento. Solo se muestran los phylum con abundancia relativa mayor al 1%.....	31
Figura 7.10. Perfil de DQO soluble obtenida en el hidrolizado durante la operación en semicontinuo. ....	32
Figura 7.11. Metabolitos generados en los ciclos de hidrólisis semi continua de bagazo de <i>Agave tequilana</i> .....	33
Figura 7.12. Cambios en la concentración de DQO soluble, AGVT y azúcares totales durante la hidrólisis de bagazo <i>A. tequilana</i> . ....	34
Figura 7.13. Imágenes MEB de fibras del bagazo <i>A. tequilana</i> durante la cinética de hidrolisis.....	35
Figura 7.14. A) Perfiles de DQO soluble y AGV del hidrolizado y B) producción acumulada de biogás durante el pretratamiento.....	37

## Índice de tablas

Tabla 2.1. Composición media de distintos tipos de biomasa lignocelulósica.....	3
Tabla 2.2. Incremento de la producción de metano después del pretratamiento en biomasa lignocelulósica.....	6
Tabla 2.3. Pretratamientos biológicos de biomasa lignocelulósica para el incremento de la producción de metano.....	8
Tabla 2.4. Microorganismos presentes en el rumen de acuerdo a su función .....	10
Tabla 7.1. Caracterización del contenido ruminal.....	24
Tabla 7.2. Caracterización de biomasa lignocelulósicas.....	24
Tabla 7.3. Comparación de rendimiento de hidrólisis de otros pretratamientos en residuos lignocelulósicos.....	25
Tabla 7.4. Correlación entre la biomasa lignocelulósica y el rendimiento de hidrólisis.....	29
Tabla 7.5. Desempeño del reactor semicontinuo.....	32
Tabla 7.6. Rendimientos experimentales de metano obtenidos del hidrolizado.....	36
Tabla 7.7. Rendimientos experimentales de metano obtenido del hidrolizado (fracción líquida + bagazo). .....	36
Tabla 7.8. Comparación de rendimiento de proceso con otros pretratamientos de bagazo de <i>A. tequilana</i> . .....	36



## Resumen

Los microorganismos ruminales tienen la capacidad enzimática de degradar la biomasa lignocelulósica y convertirla principalmente en ácidos grasos volátiles, no obstante, es posible que la composición de la biomasa tenga un efecto con el rendimiento de hidrólisis. En este sentido, se evaluó el rendimiento de hidrólisis en términos de solubilización de los sólidos totales del bagazo en términos de demanda química de oxígeno (DQO), de 3 diferentes biomásas lignocelulósicas (bagazo *A. tequilana*, bagazo *A. angustifolia* y bagazo de caña de azúcar) con microorganismos ruminales y también el rendimiento de hidrólisis mediante microorganismos nativos, es decir aquellos que naturalmente se encuentran en cada bagazo. Los resultados demuestran que el contenido de lignina (% ST) tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en el rendimiento de hidrólisis en las biomásas lignocelulósicas evaluadas. En este sentido, al utilizar bagazo de *A. tequilana* y bagazo de caña de azúcar (8.8% y 6% ST de lignina respectivamente), el rendimiento de hidrólisis por microorganismos ruminales incrementó el doble en comparación con el rendimiento por acción de microorganismos nativos. Caso contrario con el *A. angustifolia* (13.5% ST de lignina), el cual el rendimiento de hidrólisis no incremento significativamente con el uso de microorganismos ruminales.

Posteriormente, se desarrolló un sistema hidrolítico semicontinuo de bagazo de *Agave tequilana*, basado en microorganismos ruminales, para el incremento de la producción de metano en una etapa posterior. Para lo cual se operaron tres reactores semicontinuos en forma simultánea (botellas de vidrio tipo Schott) con una masa de trabajo de 0.333 kg, 10% de Sólidos Totales (ST) de bagazo *A. tequilana*, 37°C, 150 rpm y un pH de 7; primero se realizó una etapa de enriquecimiento, el cual consistió en aumentar gradualmente la concentración de bagazo en el reactor hasta llegar al 10% ST, posteriormente se operó el sistema en semicontinuo, evaluando 4 diferentes Tiempos de Retención Hidráulica (TRH: 18, 12, 8 y 5 días). Posteriormente se evaluó el potencial bioquímico de metano utilizando la fracción líquida y sólida recuperada durante la operación del reactor semicontinuo con un TRH de 5 días, en un sistema automático (AMPTS II, Bioprocess Control, Suecia). Esto se realizó en botellas de 600 mL, con un volumen de trabajo de 360 mL, 37°C y agitación 120 rpm. Del trabajo realizado se encontró que el sistema de hidrólisis semicontinuo de bagazo *A. tequilana* fue estable por más de 200 días, en donde el TRH tuvo un efecto significativo en la productividad de Ácidos Grasos Volátiles Totales (AGVT). Un TRH de 8 días obtuvo la mayor productividad de  $1692 \pm 185$  mg AGVT L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y un rendimiento de hidrólisis de  $18.8 \pm 1.5\%$ . En relación con la producción de metano, se obtuvo 10 veces más metano de la combinación de fracción sólida y líquida que únicamente metanizar la fracción líquida del hidrolizado obtenido el reactor semicontinuo. Al utilizar el pretratamiento con microorganismos ruminales, se logró incrementar 2.8 veces el rendimiento de metano del bagazo *A. tequila* a comparación de bagazo sin pretratar.

## 1. Introducción

La economía mundial se basa principalmente en combustibles fósiles no renovables, como el petróleo y el gas natural, lo que resulta en un rápido agotamiento de sus reservas, además de la grave amenaza para el medio ambiente derivado del uso de dichos combustibles (Divya et al., 2015). Para satisfacer las crecientes demandas de energía por el rápido crecimiento poblacional y resolver los problemas causados como el cambio climático, la producción de energía limpia debe desarrollarse con urgencia (Ziemiński et al., 2012). Los biocombustibles de segunda generación se obtienen a partir de materias primas que no tienen usos alimentarios, por ejemplo, de residuos de cosecha de granos. El desarrollo de este tipo de biocombustibles permite el uso de residuos y ofrece la oportunidad de aprovechar suelos no aptos para cultivos alimentarios (Sexton and Zilberman, 2008).

La biomasa lignocelulósica es la más abundante en el mundo, su producción anual se ha estimado entre 10 y 50 mil millones de toneladas (Sánchez and Cardona, 2008). La composición de la biomasa varía dependiendo de su origen, ya sea de la madera dura, madera blanda, residuos agrícolas y/o pastos (Cai et al., 2017). Debido a que la biomasa lignocelulósica tiene una pared celular recalcitrante, se requiere de un pretratamiento que facilite la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, para obtener monosacáridos u otros compuestos de menor peso molecular que pueden ser convertidos a productos de valor agregado y/o biocombustibles (Cao et al., 2010).

Existen diferentes tipos de pretratamientos, estos se agrupan en: físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos (Agbor et al., 2011). Los pretratamientos físicos aumentan el área superficial de la biomasa lignocelulósica lo que facilita su hidrólisis enzimática y no producen sustancias inhibitorias durante su tratamiento, pero generalmente requieren grandes cantidades de energía y gastos en mantenimiento (Amin et al., 2017; Mohapatra et al., 2017; Taherzadeh and Karimi, 2008). Aunque los pretratamiento químicos y fisicoquímicos generalmente son eficientes en degradación de lignina, estos son costosos por el uso de reactivos químicos y generan residuos tóxicos que no pueden ser valorizados ni reutilizados (Agbor et al., 2011). Los pretratamientos biológicos han generado interés ya que no forman inhibidores, requieren baja demanda energética y no se emplean sustancias químicas tóxicas, el obstáculo más destacable de estos procesos son los tiempos prolongados de retención y que requieren de cuidados especiales para el crecimiento de los microorganismos, por ende, se han investigado alternativas que minimicen estas desventajas (Zheng et al., 2014). Se considera que el uso de enzimas comerciales mejora considerablemente los rendimientos; aunque, sus elevados costos limitan su uso a escala industrial (Muñoz et al., 2014). Recientemente, Carrillo-Reyes et al. (2016), discutieron sobre los pretratamientos biológicos donde sugieren el uso de cultivos hidrolíticos naturales. Los microorganismos ruminales, secretan enzimas como la celulasa, hemicelulasa, pectinasa, entre otras. Estas enzimas facilitan la conversión del material lignocelulósico a monosacáridos y ácidos grasos volátiles (AGV). No obstante, debido a que la composición y estructura de la biomasa lignocelulósica varía de acuerdo con su origen, es posible que los rendimientos de conversión sean diferentes de acuerdo con la naturaleza de la biomasa. Diversos estudios muestran el potencial que tienen los microorganismos ruminales para producir AGV a partir de biomasa lignocelulósica en sistemas semi continuos (Barnes and Keller, 2004; Lazuka et al., 2015; Zhao et al., 2016). Barragán-Trinidad et al. (2017) realizaron la hidrólisis de bagazo *A. tequilana* y demostraron una eficiencia de hidrólisis del 60%. Por ende, el presente trabajo tiene como objetivos evaluar el efecto de la composición de la biomasa lignocelulósica en su hidrólisis con microorganismos ruminales, además de desarrollar un sistema hidrolítico semi-continuo de bagazo de *A. tequilana*, basado en microorganismos ruminales, para incrementar la producción de metano en una etapa posterior.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Residuos lignocelulósicos en México

La biomasa lignocelulósica es un recurso orgánico abundante que actualmente es subestimado, pero tiene un alto potencial para la producción de biogás. Como fuentes de generación de este tipo de biomasa, podemos considerar los residuos que se acumulan a partir de actividades agrícolas, forestales, municipales e industriales (Zheng et al., 2014).

De los residuos secundarios, el bagazo de caña de azúcar es la principal fuente de biomasa para generar energía eléctrica en México, en donde del 2005 al 2015 este incrementó su capacidad instalada de producción energética en un 906.5%. Esto se debe a que existen 52 ingenios azucareros, de los cuales una gran parte de ellos cuentan con combustión directa, aportando así el 83% de la bioenergía generada en México. Sin embargo, aún existe un potencial de generación de energía eléctrica a partir de bagazo de caña de azúcar de 71.1%. Actualmente, existen proyectos para obtención de bioenergía con otras fuentes de biomasa con potencial energético, en donde son de interés los bagazos de agave resultantes de la industria del tequila y mezcal (SENER, 2016).

En este sentido, la producción de tequila en México, específicamente en el estado de Jalisco, es creciente debido a la demanda continua a nivel nacional e internacional. En 2017, el Consejo Regulador de Tequila reportó que el consumo de agave para la industria tequilera en México fue estimada en 956 100 toneladas, donde aproximadamente 40% es considerado como residuo durante la producción del tequila, lo que resulta en un problema ambiental y económico en su disposición final (Arreola-Vargas et al., 2016).

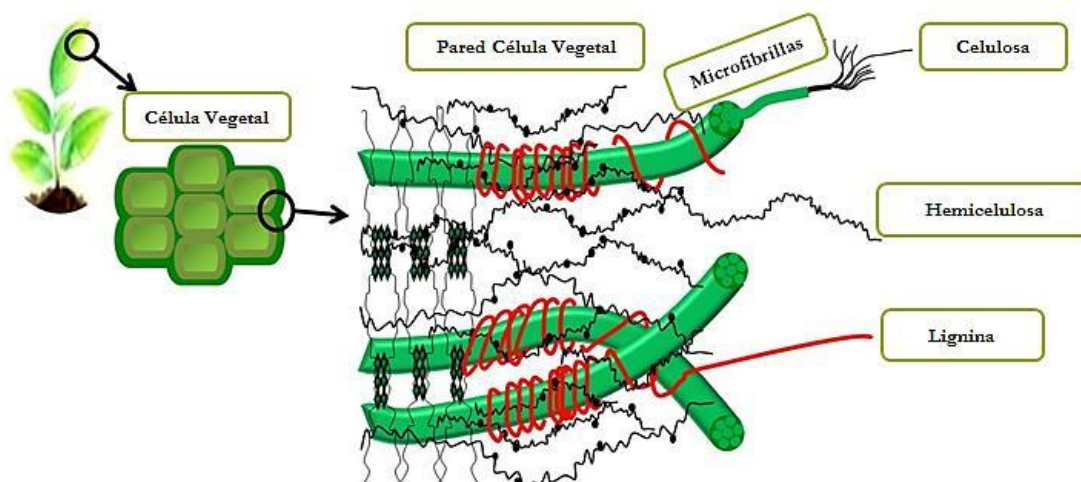
Oaxaca es el estado con mayor producción de mezcal, de acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal en 2018 se envasaron aproximadamente 2.5 millones de litros de mezcal. Sin embargo, se producen anualmente 122 696 toneladas de bagazo, producto que es vertido en ríos, arroyos o utilizado mínimamente como combustible en hornos ladrilleros, ocasionando un grave problema al ambiente (Martínez-Gutiérrez et al., 2013).

Se han realizado diversas investigaciones para evaluar el uso potencial del bagazo de *A. tequilana* y *A. angustifolia* en la fabricación de papel, muebles, ladrillos y uso como composta. Recientemente, existen trabajos que demuestran que de estos residuos es posible obtener azúcares fermentables, estos a su vez, pueden ser aprovechados para la producción de biogás en un proceso de digestión anaerobia. Sin embargo, debido a la composición recalcitrante de estos dos tipos de bagazo, es necesario de un pretratamiento que facilite la obtención de azúcares (Pérez-Pimienta et al., 2017).

### 2.2 Composición de la biomasa lignocelulósica

La mayor parte de la pared celular de la biomasa lignocelulósica se constituye de: 40-50% ST de celulosa, 20-30% ST de hemicelulosa y 10-25% ST de lignina, así como también trazas de pectina, compuestos nitrogenados e inorgánicos. Todos estos compuestos están asociados entre sí y varían dependiendo de su origen (**Tabla 1.1**), ya sea de la madera dura, madera blanda, residuos agrícolas y/o pastos (Cai et al., 2017).

La lignina es un polímero fenólico largo y complejo que enlaza la celulosa y hemicelulosa, formando en conjunto una rígida estructura de la pared celular (**Figura 1.1**). Esto le confiere a la pared celular propiedades recalcitrantes, haciendo que la biomasa lignocelulósica sea resistente a la biodegradación por enzimas y microorganismos (de Souza, 2013).



**Figura 2. 1.** Estructura y composición de la biomasa lignocelulósica (Gurdo, 2016).

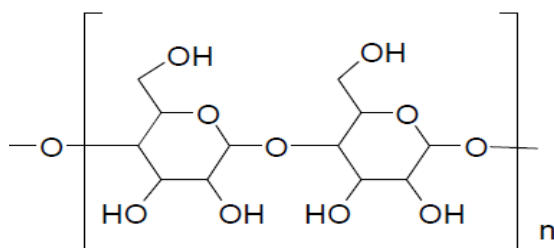
**Tabla 2.1.** Composición media de distintos tipos de biomasa lignocelulósica (Hu and Ragauskas, 2012; Saucedo-Luna et al., 2011).

	Composición (% base seca)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Pasto varilla	45	30	12
Álamo	45	21	24
Hojas de maíz	40	25	17
Paja de arroz	37	34	12
Bagazo de caña de azúcar	40	24	25
Bagazo de <i>Agave tequilana</i>	42	20	15

### 2.2.1 Celulosa

La celulosa es un biopolímero lineal de glucosa y con alto peso molecular (**Figura 1.2**). Consiste de unidades de anhidro glucosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos, por lo tanto, es un 1,4- $\beta$ -d-glucano (Bledzki and Gassan, 1999). La longitud de cadena de la celulosa es tan grande e insoluble, que resulta bastante difícil de medir, esto debido a la degradación enzimática y mecánica que puede ocurrir durante los análisis (O'Sullivan, 1997).

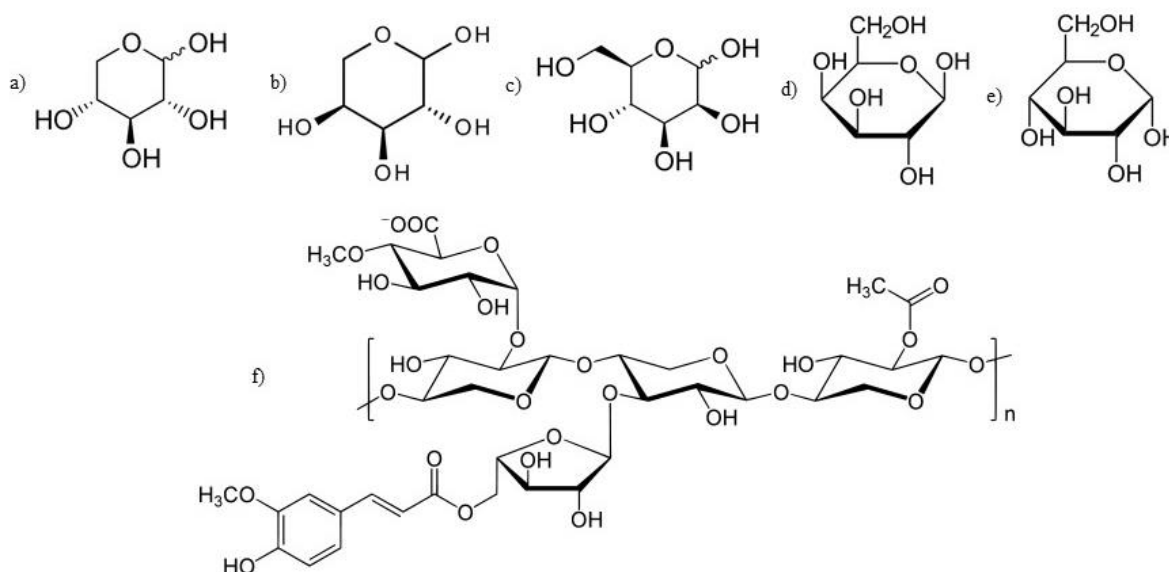
Se puede considerar que la celulosa consta de dos regiones, y esto depende de la cantidad de enlaces de hidrógeno que contenga cada cadena de celulosa. La región amorfa contiene pocos enlaces de hidrógeno, por lo tanto, tiene una baja cristalinidad, mientras que la región cristalina tiene más enlaces, lo cual genera una alta cristalinidad, siendo esta última región la más difícil para la biodegradación enzimática (Guarnizo-Franco et al., 2009).



**Figura 2.2.** Estructura de la celulosa.

### 2.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo constituido por diversos azúcares: pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (manosa, galactosa y glucosa) estos se encuentran frecuentemente acetilados y enlazados con grupos tales como ácido urónico y el 4-o-metiléster (**Figura 1.3**). La naturaleza química de la hemicelulosa depende de su fuente, en general su componente más abundante es el xilano. La hemicelulosa es más amorfa que la celulosa, y considerando que básicamente está compuesta de monómeros, resulta más susceptible a la hidrólisis ya sea biológica, térmica o química. (Hu and Ragauskas, 2012).

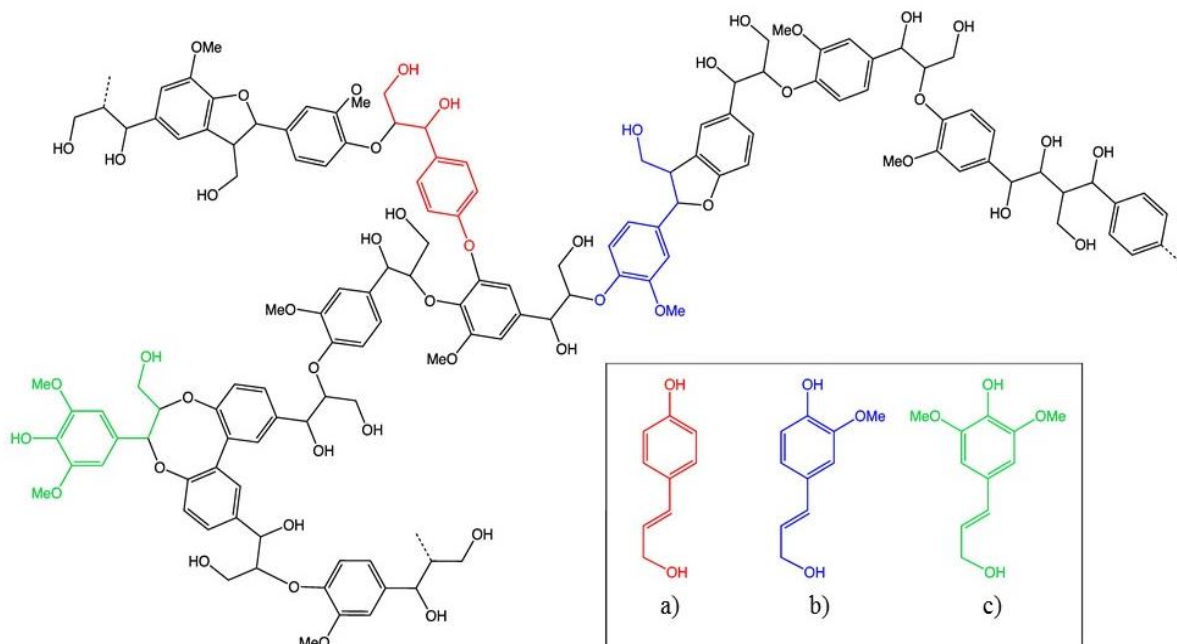


**Figura 2.3.** Monómeros de la hemicelulosa: a) xilosa, b) arabinosa, c) manosa, d) galactosa, e) glucosa; f) polisacárido de xilano.

### 2.2.3 Lignina

La lignina es un biopolímero ramificado, amorfo y heterogéneo que se encuentra principalmente en la lámina media y las capas de la pared celular, formando con la hemicelulosa una matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa. De modo que protege a la celulosa y otros polisacáridos estructurales de ataques biológicos, presentando actividad anti-microbial y anti-fúngica (Doherty et al., 2011).

Como se muestra en la **Figura 1.4**, la composición química de la lignina consiste principalmente en tres tipos de unidades repetidas: p-hidroxifenil, guaiacil y siringil. Estas unidades derivan de los denominados monolignoles, los alcoholes p-cumarílico (4-hidroxicinámico), alcohol coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) y alcohol sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico) que son los precursores en la biosíntesis de lignina (Ralph et al., 2004).



**Figura 2.4.** Estructura de la lignina; monolignoles: a) alcohol p-cumarílico, b) alcohol coniferílico, c) alcohol sinapílico.

### 2.3 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

Se le denomina pretratamiento al conjunto de acciones para modificar la estructura de la biomasa lignocelulósica, su objetivo principal es separar la lignina de tal manera que la hemicelulosa y celulosa estén disponibles para las enzimas y así convertir los polímeros complejos en azúcares fermentables (Guarnizo-Franco et al., 2009). El método y las condiciones óptimas de pretratamiento dependen en gran parte de la composición de la biomasa y de los productos que se deseen obtener. Varias propiedades estructurales y de composición tienen impacto sobre la biodegradabilidad de la biomasa lignocelulósica, incluyendo la cristalinidad de celulosa, el área superficial accesible, el grado de polimerización de celulosa, la presencia de lignina y hemicelulosa y el grado de acetilación de la hemicelulosa (Zheng et al., 2014).

Taherzadeh & Karimi (2008) propusieron una serie de requerimientos para alcanzar un pretratamiento económico y efectivo, tales requerimientos incluyen:

- a) Producir una fibra celulósica apropiada para el ataque enzimático.
- b) Evitar la destrucción de celulosa y hemicelulosa.
- c) Evitar la formación de posibles inhibidores para la hidrólisis enzimática y para los microorganismos fermentativos.
- d) Minimizar la demanda de energía.
- e) Bajar los costos de reducción de tamaño de materia prima.

- f) Reducción de costos de material para la construcción de reactores de pre- tratamiento.
- g) Producir menos residuos en el proceso de pretratamiento.
- h) Evitar el uso de químicos o un bajo consumo de ellos, así como el empleo de químicos baratos.

En la actualidad existen diferentes tecnologías disponibles para pretratar la biomasa lignocelulósica, las cuales pueden ser clasificadas según su naturaleza. Una clasificación generalizada de los métodos de pretratamiento los agrupa en: físico, químico, fisicoquímico y biológico (Agbor et al., 2011). En la **Tabla 1.2** se describen las ventajas y desventajas de ciertos pretratamientos, así como el incremento de la producción de metano respecto al sustrato sin pretratar.

**Tabla 2.2.** Incremento de la producción de metano después del pretratamiento en biomasa lignocelulósica (Amin et al., 2017).

Pretratamiento	Tipo de pretratamiento	Incremento de la producción de metano, %	Ventaja (+) / Desventaja (-)
Físicos	Pulverización mecánica	11-13	(-) Costo energético alto
Fisicoquímicos	Explosión por vapor	56	(+) Incremento en la velocidad de generación de gas
Químicos	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75	(-) Tóxico, manejo corrosivo y costoso.
	HCl	62	(-) Tóxico, manejo corrosivo y costoso.
	NaOH	73	(-) Tóxico y difícil de reciclar.
	KOH	95	(+/-) Efectivo pero costoso.
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	115	(+/-) Barato pero largo tiempo de pretratamiento.
Biológicos	Microorganismos mixtos	88	(-) Largo tiempo de pretratamiento y eficiencia baja.
	Co-digestión con estiércol	41	(-) Altamente dependiente de las características fisicoquímicas del estiércol.
	Pretratamiento microorganismos anaeróbicos	16	(+)Efectivo y económico

### 2.3.1 Pretratamientos físicos

El pretratamiento físico puede aumentar el área superficial accesible y el tamaño de los poros, y disminuir la cristalinidad y los grados de polimerización de la celulosa. Para mejorar la hidrólisis enzimática o la biodegradabilidad de la biomasa lignocelulósica se pueden utilizar diferentes tipos de procesos físicos. La molienda es un pretratamiento físico que puede emplearse para alterar la estructura inicial por reducción de tamaño y grado de cristalinidad, en consecuencia, hace más susceptible a la celulosa para la hidrólisis enzimática. Otro tipo de pretratamiento físico es la radiación, por ejemplo, los procesos de haz de electrones y microondas, estos acondicionan apropiadamente las fibras para la degradación enzimática, pero en fibras frágiles la celulosa puede ser degradada, lo cual afecta negativamente el aprovechamiento de la biomasa (Amin et al., 2017; Taherzadeh and Karimi, 2008).

Aunque los procesos de pretratamiento físicos tienen la ventaja de no producir subproductos tóxicos o inhibidores en el sustrato, estos métodos son caros y presentan dificultades en la aplicación industrial, esto se debe al alto requerimiento de energía y el costoso mantenimiento de los equipos, como los molinos o trituradores, puesto que sus superficies metálicas necesitan reemplazos constantes después de dos a tres ciclos de pretratamiento (Mohapatra et al., 2017).

### 2.3.2 Pretratamientos químicos



Los métodos de pretratamiento químico se utilizan más a menudo que los métodos de pretratamiento biológicos o físicos porque son más eficaces y mejoran la biodegradación de materiales complejos (Zhou et al., 2012). Se ha reportado que algunos productos químicos tales como ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y líquidos iónicos tienen un efecto significativo sobre la estructura nativa de la biomasa lignocelulósica (Agbor et al., 2011).

Una de las grandes desventajas de este tipo de pretratamiento, es que se requieren grandes cantidades de compuestos químicos, lo cual hace que el proceso sea altamente costoso, así como también los efluentes que se generan representan un potencial de contaminación ambiental (Behera et al., 2014).

### 2.3.3 Pretratamientos fisicoquímicos

Esta categoría incluye la gran mayoría de las tecnologías de pretratamiento tales como: pretratamiento con vapor, pretratamiento con agua caliente, pretratamiento con oxidación húmeda, explosión de fibra de amoníaco, la adición de ácido sulfúrico (0.07%) con altas temperaturas (205 °C), el pretratamiento con amoníaco acuoso y el pretratamiento con organosolv. Recientemente se han propuesto los líquidos iónicos y el fraccionamiento de lignocelulosa a base de disolvente de celulosa. Estas formas de pretratamiento explotan el uso de condiciones y compuestos que afectan las propiedades físicas y químicas de la biomasa (Agbor et al., 2011). Aunque este tipo de pretratamiento es considerado altamente efectivo para solubilizar el contenido de lignina y hemicelulosa, los altos costos de energía y los elevados consumos en agua durante el proceso, siguen siendo su principal inconveniente (Mohapatra et al., 2017).

### 2.3.4 Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos se pueden clasificar principalmente en: fúngico, consorcios microbianos y enzimas comerciales (**Tabla 1.3**). A diferencia de las otras categorías, este no requiere compuestos químicos para su tratamiento. Debe mencionarse que uno de sus obstáculos más destacados, es que usualmente no resultan eficientes en la degradación de la biomasa lignocelulósica y su tiempo de retención es alto (Zheng et al., 2014).

#### 2.3.4.1 Pretratamiento fúngico

Los hongos son los microorganismos más conocidos capaces de degradar principalmente la lignina. Los hongos de podredumbre blanca, café y blanda están incluidos en este tipo de pretratamiento. Se ha demostrado que el hongo de podredumbre blanca es altamente efectivo para la degradación de la lignina, en este sentido, Mustafa et al. (2017) empleando el hongo *P. ostreatus* logró degradar 30.4% ST de lignina en la paja de arroz en un tiempo de pretratamiento de 30 días.

La barrera más significativa en el pretratamiento fúngico es que para obtener una alta degradación de la lignina se requiere de tiempos más prolongados. El tiempo de cultivo y crecimiento del hongo toma usualmente 7 días, y la etapa del pretratamiento tiene una duración de por lo menos 30 días (Mustafa et al., 2017; Zhao et al., 2014). Una opción para reducir el tiempo de operación es combinando el pretratamiento fúngico con uno fisicoquímico, químico o físico, con las consecuentes desventajas que ya se conocen de los pretratamientos diferentes a los biológicos (Kadimaliev et al., 2003).



**Tabla 2.3.** Pretratamientos biológicos de biomasa lignocelulósica para el incremento de la producción de metano.

Pretratamiento biológico	Microorganismos y enzimas	Biomasa lignocelulósica	Condiciones de pretratamiento	Incremento de la producción de metano, %*	Referencia
Fúngico	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i> (hongo de podredumbre blanca)	Residuos de jardín	Incubación a 28°C durante 30 días sin agitación.	154	(Zhao et al., 2014)
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (hongo de podredumbre blanca)	Paja de arroz	Incubación a 28°C durante 10,20 y 30 días de evaluación.	92	(Mustafa et al., 2017)
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (hongo de podredumbre blanca)	Paja de arroz	Incubación a 28°C durante 10,20 y 30 días de evaluación, previo pretratamiento físico (molienda).	165	(Mustafa et al., 2017)
Consorcio microbiano	Consorcio microbiano enriquecido en un medio con elevada degradabilidad de celulosa ( <i>Clostridium, Thermoanaerobacterium</i> )	Residuos de yuca	Incubación a 55 °C por periodo de 12 horas.	96.6	(Zhang et al., 2011)
	Consorcio microbiano ( <i>K. pneumoniae, Citrobacter freundii, E. acetylicum, Sugiyamaella smithiae, Micrococcus luteus</i> )	Residuos de aserrín	Incubación a 30°C durante 10 días.	72.6	(Ali et al., 2017)
	Consorcio microbiano MC1 ( <i>Clostridium, Pseudoxanthomonas, Bordetella</i> )	Papel periódico	Incubación a 50 °C por periodo de 12 días.	156	(Yuan et al., 2012)
Hidrólisis enzimática	Mezcla de enzimas comerciales Celustar XL y Agropect pomace	Pulpa de remolacha	Hidrólisis a 50 °C durante 24 horas.	27.6	(Ziemiński et al., 2012)
	Microorganismos ruminales	Paja de arroz	Incubación anaeróbica a 39°C con agitación de 120 rpm por 120 horas.	82.6	(Zhang et al., 2016)
	Microorganismos ruminales	Colza ( <i>Brassica napus</i> )	Incubación a 37 °C con agitación a 170 rpm durante 24 horas.	32.4	(Baba et al., 2017)

\*Comparado con la producción de la biomasa lignocelulósica sin pretratamiento.

### 2.3.4.2 Pretratamiento con enzimas comerciales

La degradación enzimática de la celulosa a glucosa se realiza por la acción sinérgica de tres actividades enzimáticas: endoglucanasas, exo-glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. El primer grupo inicia la hidrólisis rompiendo los enlaces  $\beta$ -1-4 de la celulosa para así generar nuevos finales de cadena no reductores, después las exo-glucanasas atacan esas nuevas cadenas para producir celobiosa, posteriormente este disacárido de glucosa (celobiosa) es finalmente hidrolizado por  $\beta$ -glucosidasas para producir glucosa (Sun and Cheng, 2002). También existen enzimas que atacan a la hemicelulosa, tales como la xilanasa y mananasa, para la lignina se utilizan las enzimas oxidoreductasas, las cuales son la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa oxidasa y oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno (Salcedo-M. et al., 2011).

Debido a la complejidad de la matriz de la biomasa se tienen que emplear enzimas muy específicas. En diversos trabajos que han empleado enzimas comerciales para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, obtienen incrementos de rendimiento de metano de hasta 24%, estos datos son menores a los obtenidos en pretratamientos físicos o químicos. De igual manera, su uso a nivel industrial es restringido por sus altos costos y su biodegradabilidad limitada. Aunque una de sus ventajas más importantes la contribuye sus tiempos cortos de reacción que oscilan desde 4 a 24 horas (Bruni et al., 2010; Schroyen et al., 2015, 2014).

### 2.3.4.3 Pretratamiento con consorcios microbianos

El pretratamiento de residuos lignocelulósicos empleando consorcios microbianos se enfoca en la selección de microorganismos encontrados en ambientes naturales. En este tipo de sistema la biomasa lignocelulósica se emplea como sustrato para el crecimiento de los microorganismos, logrando obtener una mayor degradación de celulosa y hemicelulosa (Zheng et al., 2014). Zhang et al. (2011) elaboraron un consorcio microbiano para la hidrólisis de residuos de yuca, en donde en 12 horas de pretratamiento, obtuvieron un incremento en el rendimiento de metano de 96.6% en comparación del control. En los consorcios los microorganismos trabajan de forma simbiótica, lo que favorece una mayor eficiencia en la degradación de la biomasa lignocelulósica, en comparación a los cultivos puros (Kato et al., 2005).

Recientemente, Carrillo-Reyes et al. (2016) sugiere el uso de cultivos hidrolíticos, ya que puede ser menos costoso que usar enzimas purificadas. En este contexto, existen microorganismos con capacidad de secretar enzimas para degradar biomasa lignocelulósica, como es el caso de los microorganismos ruminales, que facilitan la conversión de material lignocelulósico a monosacáridos y finalmente a AGV, siendo estos últimos empleados como sustrato para la producción de metano en una etapa subsecuente (Hu and Yu, 2005).

## 2.4 Microorganismos ruminales

El rumen es uno de los cuatro estómagos de los rumiantes, y éste tiene un contenido de materia seca de 10-13%, y la temperatura se regula típicamente entre 38 y 41°C. El rango fisiológico del pH está entre 5.5 y 6.9. El tiempo de retención de sólidos en el rumen se encuentra entre 48 y 60 horas (Puniya et al., 2015). Los microorganismos ruminales forman parte de la microbiota del rumen y éstos tienen una capacidad de degradación que implica hasta 21 actividades enzimáticas diferentes, tales como celulasa, xilanas,  $\beta$ -glucanasa, pectinasa, amilasa y proteasa, entre otras (**Tabla 1.4**). El fluido ruminal ha sido probado para la degradación de la celulosa y residuos lignocelulósicos, tales como residuos de la industria del papel, desechos vegetales, fracción celulósica de los sólidos municipales, bagazo, entre otros, para obtener bioetanol, metano y ácidos grasos volátiles (Carrillo-Reyes et al., 2016).

### 2.4.1 Hidrólisis de residuos lignocelulósicos con microorganismos ruminales

Estudios previos reportan el uso del fluido ruminal para el pretratamiento de diferentes tipos de biomasa lignocelulósicas. En este sentido, Zhang et al. (2016) realizaron el pretratamiento de paja de arroz 5% (p/v) empleando fluido ruminal, después de 120 horas de pretratamiento obtuvieron una generación aproximada de AGV totales de 8.5 g L<sup>-1</sup>, así como distintas proporciones de degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina, a 48% ST, 59% ST y 21% ST, respectivamente. De manera similar, Li et al. (2017) realizaron una hidrólisis con fluido ruminal empleando residuos de hojas y tallos de maíz 10% (p/v), obteniendo en 72 horas una generación máxima de AGV de 13.2 g L<sup>-1</sup>. Recientemente, Barragán-Trinidad (2018) realizó la hidrólisis enzimática de bagazo de *A. tequilana* empleando como inóculo fluido ruminal, con distintas relaciones sustrato e inóculo (S/X), de la cual encontró que con una relación S/X de 0.33 se obtiene una máxima degradación del bagazo de agave de 60% (p/p), no obstante, no fue posible demostrar la estabilidad del sistema a largo plazo.

**Tabla 2.4.** Microorganismos presentes en el rumen de acuerdo a su función (Adaptado de Puniya et al., 2015).

Tipos de microorganismos	Géneros y especies importantes
<b>Bacteria</b>	
Acetógeno	<i>Acetitomaculum ruminis, Eubacterium limosum</i>
Consumidores de ácido	<i>Megasphaera elsdeni, Wolinella succinogenes, Veillonella gazogene, Micrococcus lactolytica, Oxalobacter formigenes, Desulfovibrio desulfuricans, Desulfotomaculum ruminis, Succiniclasticum ruminis</i>
Celulolítico	<i>Fibrobacter succinogenes, Butyrivibrio fi brisolvens, Ruminococcus fl avefaciens, Ruminococcus albus, Clostridium cellobioparum, Clostridium longisporum, Clostridium lochheadii, Eubacterium cellulosolvens</i>
Hemicelulolítico	<i>Prevotella ruminicola, Eubacterium xylanophilum, Eubacterium uniformis</i>
Lipolítico	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Pectinolítico	<i>Treponema saccharophilum, Lachnospira multiparus</i>
Proteolítico	<i>Prevotella ruminicola, Ruminobacter amylophilus, Clostridium bifermentans</i>
Aminolítico	<i>Streptococcus bovis, Ruminobacter amylophilus, Prevotella ruminicola</i>
Sacarolítico	<i>Succinivibrio dextrinosolvens, Succinivibrio amylolytica, Selenomonas ruminantium, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus helveticus, Bifi dobacterium globosum, Bifi dobacterium longum, Bifi dobacterium thermophilum, Bifi dobacterium ruminale, Bifi dobacterium ruminantium</i>
Taninnolítico	<i>Streptococcus caprinus, Eubacterium oxidoreducens</i>
Ureolítico	<i>Megasphaera elsdenii</i>
<b>Arqueas Metanógenas</b>	
<i>Methanobacterium formicicum, Methanobacterium bryantii, Methanobrevibacter ruminantium, Methanobrevibacter smithii, Methanomicrobium mobile, Methanosarcina barkeri, Methanoculleus olentangyi</i>	
<b>Hongos</b>	
Celulolítico, Hemicelulolítico y Pectinolítico	<i>Neocallimastix frontalis, Neocallimastix patriciarum, Caecomyces communis, Piromyces communis</i>
Celulolítico y Hemicelulolítico	<i>Neocallimastix joyonii, Orpinomyces bovis, Ruminomyces elegans</i>
<b>Protozoos</b>	
Celulolítico, Hemicelulolítico y Pectinolítico	<i>Eudiplodinium maggii, Ostracodinium dilobum, Metadinium affine, Eudiplodinium bovis, Orphyroscolex caudatus, Polyplastron multivesiculatum, Isotricha intestinalis, Isotricha prostoma</i>
Celulolítico	<i>Diplodinium pentacanthum, Endoploplastron triloricaum, Orphyroscolex tricoronatus, Ostracodinium gracile</i>

Estudios previos han reportado la hidrólisis semicontinua de residuos lignocelulósicos; Lazuka et al. (2015) inocularon con fluido ruminal de vaca un sistema AnSBR (reactor discontinuo secuencial anaerobio) de 2 L, a temperatura regulada de 35°C y manteniendo el pH en 6.15, con la finalidad de seleccionar el sistema con microorganismos hidrolíticos. Después de 5 ciclos de enriquecimiento, se observó una comunidad microbiana estable y eficiente constituida principalmente por los filos de Endobacterias y Bacteroidetes, este enriquecimiento de microorganismos logra degradar la paja de trigo crudo hasta 55.5% (p/p) en 15 días y de manera simultánea una producción de AGV de 2.92 g L<sup>-1</sup>. Pavlostathis et al. (1988) estudiaron la cinética de hidrólisis de celulosa por *Ruminococcus albus* en un fermentador anaerobio continuo completamente agitado, y encontraron que la hidrólisis de celulosa aumentaba a medida que incrementaba el TRH, así como los productos solubles (AGV y etanol). Por otro lado, Hu y Yu (2005) emplearon un sistema semicontinuo de degradación de rastrojo de maíz por microorganismos ruminales, ellos demostraron que a mayores TRH decrece la degradación (% SV), probablemente a una disminución del pH debido a la acumulación de AGV.

Barragán-Trinidad et al. (2017), realizaron un pretratamiento de un cultivo mixto de microalgas empleando como inóculo fluido ruminal y concluyeron que, separando el proceso en dos etapas, hidrólisis y metanogénesis, el tiempo total se reducía a 7 días; en comparación con digerir las microalgas directamente por un consorcio metanogénico. Además, se encontró que manipulando el TRH se afecta la composición del hidrolizado; a menor TRH la composición principalmente es por azúcares y a mayor TRH se obtiene un hidrolizado rico en AGV; por lo tanto, el hidrolizado recuperado se puede aprovechar ya sea para la producción de hidrógeno y/o metano en una etapa posterior.

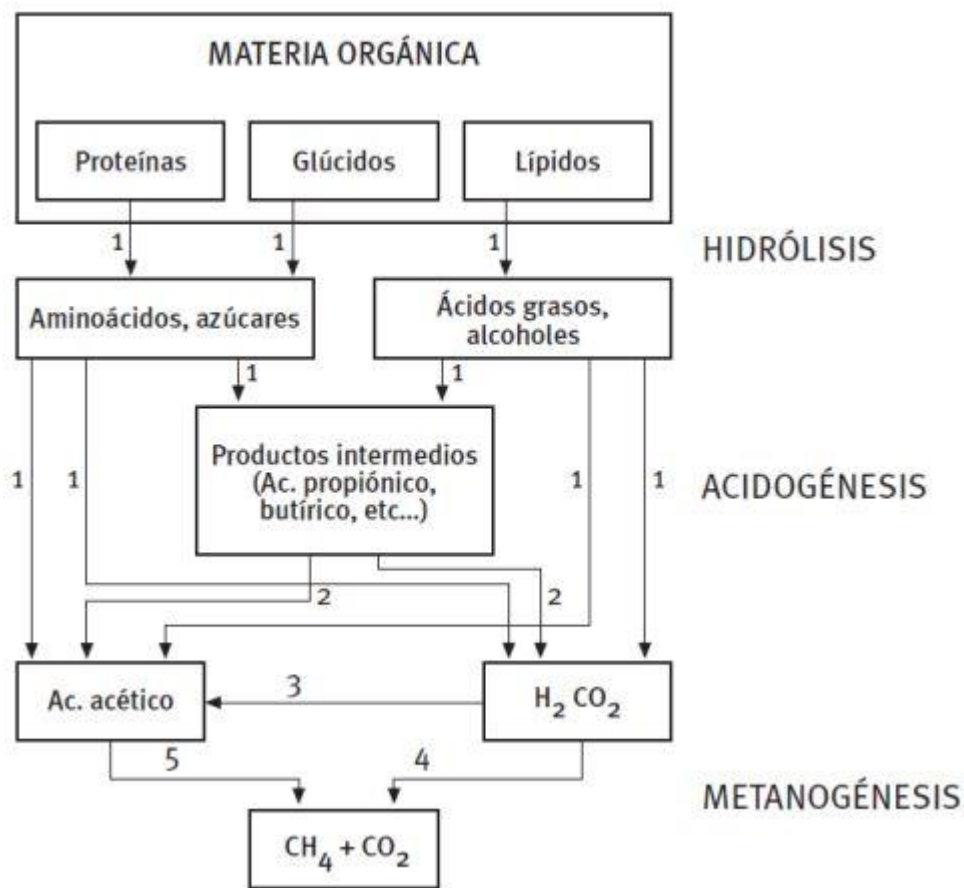
Cabe destacar que no se han encontrado estudios que evalúen el efecto del TRH ni la estabilidad en un sistema semi continuo de hidrólisis de bagazo de *A. tequilana*.

## 2.5 Digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos

La digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos es una alternativa para la generación de biogás, debido a la gran disponibilidad de este tipo de residuos y la conversión de estos desechos en materia prima para obtener un producto de valor agregado (Stamatelatos et al., 2014). La digestión anaerobia es un proceso bioquímico en ausencia de oxígeno, en el cual la materia orgánica se degrada por medio de microorganismos específicos (**Figura 1.5**) que da lugar a una mezcla de gases (biogás) cuya composición volumétrica típica es 50-75% de metano y 25-50% de dióxido de carbono. La característica principal de cada una de las poblaciones microbianas que participan en este proceso es que tienen diferentes velocidades de crecimiento. Para residuos que son solubles, la fase limitante suele ser la metanogénesis, y para aumentar la velocidad es necesario realizar estrategias que estimulen el crecimiento de microorganismos metanogénicos y acetogénicos en el reactor. En caso contrario, cuando son residuos particulados o con baja solubilidad, la fase limitante es la hidrólisis, puesto que este proceso enzimático depende de la superficie de las partículas y de las capacidades hidrolíticas del consorcio metanogénico (IDAE, 2007).

Convencionalmente las cuatro fases del proceso de digestión anaerobia se llevan a cabo en un solo reactor. No obstante, diversos autores se han enfocado en separar la digestión anaerobia de sustratos lignocelulósicos en dos etapas, siendo estas hidrólisis-acidogénesis y acetogénesis-metanogénesis. Esta separación incrementa la producción de metano y mejora la estabilidad microbiana del sistema, debido a la adaptación de los consorcios microbianos en cada etapa, es decir, en una primera etapa se puede favorecer la selección de microorganismos con altas capacidades hidrolíticas y en la segunda etapa una comunidad enriquecida con arqueas metanogénicas (Akobi et al., 2016; Demirel and Yenigün, 2002; Massanet-Nicolau et al., 2015; Meng et al., 2016).

Arreola-vargas et al. (2016) compararon la digestión anaerobia de hidrolizados generados del pretratamiento químico y enzimático del bagazo *A. tequilana*, en una sola etapa y en dos etapas. El análisis de recuperación de energía demostró que el proceso de dos etapas superó en rendimiento a 3.3 veces el proceso de una sola etapa al comparar las recuperaciones de energía más altas obtenidas en cada proceso. En este sentido los sistemas de hidrólisis con microorganismos ruminales funcionan como reactores hidrolíticos-acidogénicos, los cuales tienen el potencial de acoplarse a reactores de acetogénesis-metanogénesis para recuperar metano a partir de los residuos.



**Figura 2.5.** Fases de la digestión anaerobia y poblaciones de microorganismos: 1) bacterias hidrolíticas-acidogénicas; 2) bacterias acetogénicas; 3) bacterias homoacetogénicas; 4) bacterias metanogénicas hidrogenófilas; 5) bacterias metanogénicas acetoclásticas (Adaptado de Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

### 3. Justificación

Los materiales lignocelulósicos se consideran como una fuente renovable para producir biocombustibles y/o productos químicos, con un gran potencial para suministrar energía (Bozell et al., 2000). Dentro de la gran variedad de residuos lignocelulósicos se encuentra el bagazo de *A. tequilana* en donde solo una pequeña porción se emplea como abono y el resto es desechada sin tener un aprovechamiento o valorización. La digestión anaerobia es una tecnología bioquímica empleada a nivel mundial para el tratamiento y digestión de residuos orgánicos, su uso se debe a su bajo costo, su bajo impacto medioambiental, su baja producción de biomasa residual y, sobre todo, la obtención de energía a partir de fuentes renovables en forma de biogás, reduciendo así, el uso de combustibles fósiles (Tobergte and Curtis, 2009).

Considerando la estructura recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, se necesitan de pretratamientos que faciliten la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, obteniendo así monosacáridos u otros compuestos de menor peso molecular que favorecerán el proceso de digestión anaerobia (Cao et al., 2010). Se tiene conocimiento de que los microorganismos ruminales tienen alta capacidad hidrolítica, son potencialmente efectivos en la degradación de residuos lignocelulósicos y en generación de AGV, siendo estos últimos el sustrato para la generación de metano (Carrillo-Reyes et al., 2016; Pérez et al., 2002).

Se ha demostrado que separar la digestión anaerobia en dos etapas (acidogénesis y metanogénesis) se obtiene un mayor rendimiento de metano a partir de hidrolizados de bagazo (Arreola-Vargas et al., 2016). Los trabajos existentes de hidrólisis de diferentes biomásas lignocelulósicas con fluido ruminal concluyen generalmente que es un pretratamiento eficiente en degradación de biomasa, generación de AGV, aumento en el rendimiento de metano e inclusive resulta menos costoso y de fácil operación en comparación de otros pretratamientos biológicos, químicos, físicos o fisicoquímicos (Gijzen et al., 1988; Lazuka et al., 2015; Li et al., 2017; Zhang et al., 2016). Además, trabajos previos demuestran que el TRH tiene un efecto en el hidrolizado obtenido durante la etapa de hidrólisis (Barragán-Trinidad, 2018; Hu and Yu, 2005). No obstante, actualmente en la literatura no se encuentra ningún trabajo de hidrólisis semi continua de bagazo de *A. tequilana* empleando como inóculo fluido ruminal, por lo que es necesario evaluar la estabilidad de la obtención de AGV, principalmente debido a la selección y enriquecimiento de microorganismos con capacidad de hidrolizar este tipo de biomasa. En este sentido, la producción semicontinua de AGV puede acoplarse a una segunda etapa para la producción de metano.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Desarrollar un sistema hidrolítico semicontinuo de bagazo de *Agave tequilana*, basado en microorganismos ruminales, para incrementar la producción de metano en una etapa posterior.

### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de la composición de diferentes fuentes de biomasa lignocelulósica en el rendimiento de hidrólisis, mediante microorganismos ruminales.
- Determinar el efecto del TRH en un reactor semicontinuo escala laboratorio sobre el rendimiento de hidrólisis y la productividad de ácidos grasos volátiles de bagazo de *A. tequilana*, mediante microorganismos ruminales.
- Evaluar la selección y enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos durante la operación del reactor semicontinuo.
- Determinar el efecto de la relación hidrolizado/lodo anaerobio (S/X) para incrementar la producción de metano.
- Evaluar el efecto en la reproducibilidad de hidrólisis, al dimensionar a mayor escala el proceso (100 L) de hidrólisis de bagazo de *A. tequilana* con microorganismos ruminales.

## 5. Hipótesis

Basado en la capacidad hidrolítica de los microorganismos ruminales, será posible desarrollar un sistema de hidrólisis semicontinua de bagazo de *A. tequilana*, con la finalidad de incrementar la producción de metano en una segunda etapa.



## 6. Metodología

### 6.1 Biomasa lignocelulósica e inóculos

#### 6.1.1 Biomasa lignocelulósica

El bagazo de *A. tequilana*, se obtuvo de una destilería situada en el Valle de Amatlán, Jalisco. El bagazo de caña de azúcar se recolectó de un ingenio del municipio de Carlos A. Carrillo, Veracruz. El bagazo de *A. angustifolia* se obtuvo de la población de Santiago Matatlán, Oaxaca. Cada una de las biomásas se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a un pretratamiento mecánico para reducción de tamaño en una licuadora industrial, posteriormente se tamizó y se recuperó la biomasa de tamaño comprendida entre 0.25-2 mm (mallas no.10 y no.60 ASTM). Las muestras se resguardaron a temperatura ambiente en bolsas de plástico selladas hasta su uso.

#### 6.1.2 Contenido ruminal

Se utilizó contenido ruminal de ovino el cual se obtuvo del rastro municipal TIF-412 ubicado en el municipio de Santiago de Querétaro, Qro., Mex. La muestra fue preservada en un frasco de vidrio tipo Schott con tapón de rosca y se mantuvo en una temperatura de 37-40 °C hasta su uso en laboratorio. Antes de realizar los análisis de sólidos volátiles (SV), sólidos totales (ST) y actividad enzimática xilanasas y CMCasa, el frasco fue gaseado con N<sub>2</sub> durante 1 min y su uso fue inmediato.

#### 6.1.3 Lodo anaerobio

Para los ensayos de producción de metano se utilizó lodo granular anaerobio como inóculo, procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera, con un contenido de 10.93% ST y 80.6% SV en la biomasa seca.

### 6.2 Medios de cultivo

#### 6.2.1 Medio de cultivo para experimentos con microorganismos ruminales

Se utilizó el propuesto por McDougall (1948), el cual guarda similitud con la saliva de los rumiantes y cuya composición final es la siguiente (mg/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1300; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2040; NaHCO<sub>3</sub>, 400; NaCl, 80; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 19.2; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.1; CaCl<sub>2</sub>, 8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40.

#### 6.2.2 Medio para los ensayos de producción de metano

Como medio anaerobio para la producción de metano, se empleó el siguiente, en concentraciones de g L<sup>-1</sup>: (A) NH<sub>4</sub>Cl, 100; NaCl, 10; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5; (B) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 200; (C) FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05; ZnCl<sub>2</sub>, 0.05; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.038; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.05; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.05; AlCl<sub>3</sub>, 0.05; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.05; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.092; EDTA, 0.5; HCl concentrado, 1 mL; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 y (D) Mezcla de vitaminas (mg L<sup>-1</sup>): Biotina, 2; ácido fólico, 2; ácido piridoxina, 10; riboflavina, 5; clorhidrato de tiamina, 5; cianocobalamina, 0.1; ácido nicotínico, 5; Ácido p-aminobenzoico, 5; ácido lipoico, 5; (Angelidaki and Sanders, 2004).



## 6.3 Diseño de experimentos

### 6.3.1 Evaluación de hidrólisis con diferentes biomásas lignocelulósicas

El ensayo para evaluar la hidrólisis se realizó en botellas de vidrio tipo Schott con tapón de rosca, de capacidad volumétrica de 500 mL, empleando un volumen de trabajo de 333 mL y se adicionó medio mineral MCDougall (1948). Se evaluaron las siguientes biomásas lignocelulósicas: bagazo de *Agave tequilana*, bagazo de caña de azúcar y bagazo de *Agave angustifolia*, el pretratamiento fue llevado a cabo por duplicado y empleando una relación sustrato/inóculo de 0.333 (2.1/6.2 g/g ST), además, se realizó un control endógeno de contenido ruminal (6.2 g de ST) y controles de cada una de las biomásas lignocelulósicas (2.1 g de ST), para determinar la hidrólisis que se genera a partir de los microorganismos nativos. El experimento se realizó con agitación constante a 150 rpm, 37°C, pH inicial de 7, por un periodo de 13 días. Durante el ensayo se tomaron periódicamente muestras de la fracción soluble para cuantificar la demanda química de oxígeno soluble (DQOs), AGV, azúcares totales y actividad enzimática (carboximetilcelulasa y xilanasas). También se midió la producción de biogás mediante el método de probeta invertida ( $\text{pH} \leq 2$ ) y la composición se determinó mediante cromatografía de gases. Al final del pretratamiento se tomaron muestras de biomásas para caracterizar la comunidad microbiana de bacterias y arqueas.

### 6.3.2 Enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos

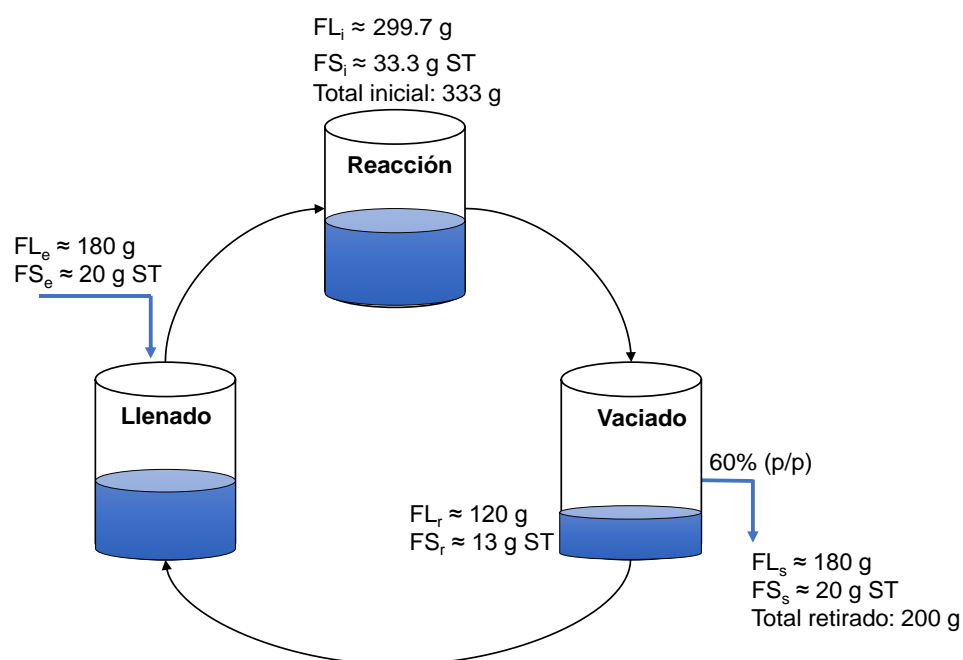
El enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos se realizó de forma simultánea en tres reactores (botellas de vidrio tipo Schott con tapón de rosca) con un volumen de trabajo de 0.666 L. Se utilizó bagazo de *Agave tequilana* y contenido ruminal en una relación inicial de sustrato/inóculo de 0.33 (2.1/6.2 g/g ST). El enriquecimiento consistió en 6 ciclos, en el cual, al finalizar un ciclo, se retiraba 50% del sobrenadante, se reponía el volumen con agua destilada, medio mineral y se adicionaban 5 g ST de bagazo de *Agave tequilana*. Esto con la finalidad de que al ciclo 6 se alcanzara una concentración de sustrato de 10% ST, dicha condición fue establecida para la operación del sistema en semicontinuo con base a lo sugerido por Zhang et al. (2011). Las condiciones de incubación fueron 37 °C, pH 7, 150 rpm por un tiempo de 13 días por ciclo. Al finalizar cada ciclo, se tomaron muestras para análisis de AGV y DQO soluble, así como también se tomaron muestras para la caracterización de las comunidades microbianas.

### 6.3.3 Hidrólisis semicontinua de bagazo de *A. tequilana*

Después de los 6 ciclos de enriquecimiento (78 días) y lograr una concentración de sustrato de 10%, se cambió la operación de los reactores a semicontinuo, con un tiempo de operación total de 231 días. Las condiciones de operación y el diagrama de operación se muestran en la **Tabla 6.1** y **Figura 6.1**, respectivamente. Del 60% (p/p) de intercambio, se tomó muestra para determinar ST, SV, AGV y DQO soluble. La variable de estudio en esta etapa fue el TRH, entre 18, 12, 8 y 5 días. Para evaluar cada uno de los TRH propuestos, se estableció como criterio de estabilidad que por lo menos 3 ciclos consecutivos tuvieran un coeficiente de variación menor a 20 % en términos de DQO soluble y los AGV en el hidrolizado.

**Tabla 6.1.** Condiciones de operación del reactor hidrolítico semicontinuo con bagazo de *Agave tequilana*.

Parámetro	Valor			
TRH (d)	18	12	8	5
Tiempo de ciclo (d)	11	7	5	3
Periodo de operación (d)	78-144	144-186	186-216	216-231
Concentración de sustrato (% ST)	10			
Intercambio (% m/m)	60			
Carga orgánica (g ST d <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	3	5	7	11
Temperatura (°C)	37			
pH inicial	7±0.1			
Agitación (rpm)	150			
Masa de trabajo (kg)	0.333			



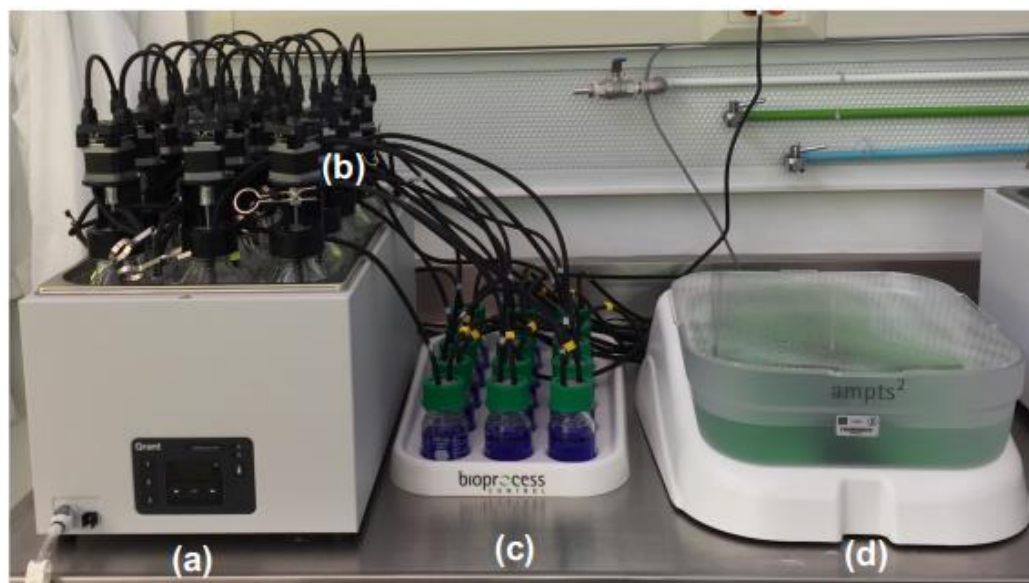
Fracción sólida (FS): Bagazo de *A. tequilana*  
 Fracción líquida (FL): Agua y medio mineral  
 i: inicial; e: entrada; s: salida; r: remanente

**Figura 6.1.** Diagrama general de operación del reactor semicontinuo.

### 6.3.4 Evaluación de metano a partir del hidrolizado y del bagazo pretratado

Los hidrolizados obtenidos en la operación semicontinua a un TRH de 5 d, se sometieron a digestión anaerobia en el Sistema Automático de Prueba de Potencial de Metano (AMPTS II, Bioprocess Control, Suecia). Esto se realizó en botellas de 600 mL, con un volumen de trabajo de 360 mL. Las condiciones evaluadas se muestran en la **Tabla 6.2**, cada una por triplicado. También se evaluó de forma paralela un control endógeno con lodo granular ( $10 \text{ g SV L}^{-1}$ ) y un control positivo de glucosa ( $5 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) para determinar la actividad metanogénica específica del inóculo utilizado. Se añadió medio mineral (sección 6.2.2) y se agregó  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  para aumentar la alcalinidad, el pH inicial se ajustó a 7.8 y las botellas se purgaron con gas  $\text{N}_2$  durante 30 s para garantizar las condiciones anaerobias. Los ensayos se realizaron a  $37^\circ\text{C}$  y agitación 120 rpm (60 s encendido- 180 s apagado) (**Figura 6.2**). La experimentación se dio por concluida aplicando el criterio de tiempo de paro, el cual se obtiene cuando la curva de producción de  $\text{CH}_4$  es asintótica.

Para evaluar la producción de metano del hidrolizado obtenido con pretratamiento mediante microorganismos nativos, previamente se realizó el pretratamiento en condiciones similares al utilizar microorganismos ruminales. Se utilizaron botellas de 600 mL (triplicado), con un volumen de trabajo de 333 mL, 10% ST de bagazo *A. tequilana*, se completó el volumen de trabajo con agua destilada y se adicionó medio mineral (sección 6.2.1). Se incubó por 3 días, para comparar con el hidrolizado obtenido el reactor semicontinuo (TRH 5 días). Agitación constante de 150 rpm y a  $37^\circ\text{C}$ .



**Figura 6.2.** Montaje experimental para la prueba de PBM. (a) Baño regulador de temperatura; (b) Reactores con agitación; (c) Trampa para  $\text{CO}_2$  con solución alcalina y (d) Sistema de medición de metano normalizado.

**Tabla 6.2.** Condiciones evaluadas en la producción de metano.

Pretratamiento	Fracción evaluada	S/X	Concentración total de sustrato
Microorganismos ruminales (reactor semicontinuo)	Hidrolizado fracción líquida	0.50, 0.33, 0.25 y 0.20	3 g DQO L
Microorganismos ruminales (reactor semicontinuo)	Hidrolizado fracción líquida + bagazo pretratado	0.50	
Microorganismos nativos (reactor en lote)	Hidrolizado fracción líquida + bagazo pretratado	0.50	4.5 g SV L
Sin pretratamiento	Bagazo crudo	0.50	

### 6.3.5 Cinética durante la operación del reactor semi continuo

Después de operación y evaluación del reactor semi continuo, se realizó una cinética durante la hidrólisis de este mismo reactor empleando el TRH de mayor rendimiento (8 días), esto con la finalidad de tener un mayor entendimiento de la hidrólisis en puntos más específicos de tiempo durante la operación semi continua. Se tomaron muestras de hidrolizado a diferentes tiempos para determinar la DQO soluble, AGV y azúcares totales. También se tomaron muestras de biomasa para caracterización microbiana y Microscopía Electrónica de Barrido.

### 6.3.6 Pretratamiento biológico de bagazo *A. tequilana* en un volumen mayor

El pretratamiento fue realizado en un reactor de 100 L con un volumen de trabajo de 80 L (**Figura 6.3**). Se utilizó una relación S/X de 9, con un contenido de 10% de ST en el reactor y se añadió medio mineral (sección 6.2.1). El reactor fue agitado dos veces al día manualmente y se mantuvo a temperatura ambiente (12 a 31°C). Se midió la producción y composición de biogás generado. Se tomaron muestras de hidrolizado a diferentes tiempos durante el pretratamiento para determinar la DQO soluble y AGV.



**Figura 6.3.** Montaje de reactor de 100 L.

## 6.4 Métodos analíticos

Para la cuantificación de Demanda Química de Oxígeno (DQO), azúcares totales, azúcares reductores, AGV y solventes en la fracción soluble, la muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min (Eppendorf MiniSpin) y posteriormente se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (MF-Millipore). Para el análisis de AGV, la muestra se acidificó hasta un  $\text{pH} \leq 2$ , con HCl 2N.

Las concentraciones de SV, ST y DQO soluble se determinaron de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 2005). Los azúcares totales se cuantificaron por el método fenol-ácido sulfúrico, usando D-glucosa como estándar (Dubois et al., 1956). Los azúcares reductores se determinaron por el método de Miller (Miller, 1959).

La fracción soluble de ácidos grasos volátiles (AGV) y solventes se determinaron por cromatografía de gases (CG) (7890B, Agilent Technologies, 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  $\text{min}^{-1}$ ; posteriormente, la temperatura se incrementó a 170°C a una velocidad de 25°C  $\text{min}^{-1}$  y se mantiene por 4 min. Se empleó gas nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 2.5 mL  $\text{min}^{-1}$ .

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  $\text{min}^{-1}$ . 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  $\text{min}^{-1}$ .

## 6.5 Actividad enzimática

Se adicionó 0.1 mL de la fracción soluble del hidrolizado y se incubó 1 hora a 40 °C con cada uno de los sustratos, carboximetilcelulosa y xilano, específicos para las actividades carboximetilcelulasa (CMCasa) y xilanasa, respectivamente. Se determinó el incremento de poder reductor de la mezcla de reacción debido a la liberación de glucosa y xilosa (Miller, 1959). Las diferentes actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (UI), las cuales se definen como la cantidad de enzima que genera un  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores por minuto (Barragán-Trinidad et al., 2018).

## 6.6 Caracterización de la biomasa lignocelulósica

Se utilizó un analizador de fibras semiautomático (A200, ANKOM Technology, NY, USA) para la cuantificación de la fracción de extractivos, celulosa, hemicelulosa y lignina en la biomasa utilizada, de acuerdo con el procedimiento propuesto por Van Soest et al. (1991).

## 6.7 Microscopía Electrónica de Barrido

Se observó la posible adhesión de microorganismos en el bagazo de *A. tequilana* durante la operación del reactor semicontinuo, empleando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las muestras fueron tomadas en determinado tiempo de operación del reactor semi continuo, posteriormente recubiertas con oro y analizadas en un microscopio electrónico modelo EVO-50 (Carl Zeiss).

## 6.8 Análisis de comunidad microbiana

Las muestras tomadas de los reactores semi continuos se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 min para obtener la biomasa y posteriormente conservadas a -20 °C hasta que su uso para realizar la extracción. La extracción de ADN se realizó usando el kit de PowerLyzer Power Soil KH DNA (QIAGEN, Hilden, Germany). La concentración del ADN se determinó con NanoDrop (Thermo Scientific). El ADN total obtenido de las comunidades se secuenció con base en el gen 16s rADN para bacterias y arqueas, e ITS (Internal Transcribed Spacer, espaciador transcrito interno) para hongos; mediante la plataforma de secuenciación masiva MiSeq (Illumina, San Diego, EUA) en el laboratorio RTL genomics (Texas, EUA). Los primers universales utilizados amplificaron la región V4 del 16s rADN fueron 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT); mientras que para el ITS fueron ITS3F (GCATCGATGAAGAACGCAGC) y ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC). El análisis de secuencias y clasificación de la unidad taxonómica (OTU, por sus siglas en inglés) y asignación taxonómica se realizó por el proveedor como se describe previamente (Barragán-Trinidad et al., 2017).

## 6.9 Ecuaciones

De acuerdo con (Orozco et al., 2013) la eficiencia de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica puede ser medida mediante los siguientes indicadores: rendimiento de hidrólisis y rendimiento de acidificación. Ambos rendimientos se calcularon respectivamente mediante las ecuaciones 1 y 2. También se calculó el rendimiento específico de solubilización (mg DQO<sub>soluble</sub> g ST<sup>-1</sup>) por cantidad de biomasa lignocelulósica añadida en la etapa de pretratamiento, mediante la ecuación 3.

$$\text{Rendimiento de hidrólisis} = \frac{DQO_{s,f} - DQO_{s,i}}{DQO_{t,i}} * 100 \quad [\text{Ec.1}]$$

$$\text{Rendimiento de acidificación} = \frac{AGVT_f}{DQO_{s,f}} * 100 \quad [\text{Ec.2}]$$

$$\text{Rendimiento específico de solubilización} = \frac{DQO_{s,f} * VH}{g \text{ ST}_{\text{añadidos}}} \quad [\text{Ec.3}]$$

Donde DQO<sub>s,f</sub> es la concentración de DQO soluble al final de la experimentación expresada en mg DQO L<sup>-1</sup> y DQO<sub>t,i</sub> es la DQO total al inicio; AGVT<sub>f</sub> es la concentración total de AGV expresada en mg DQO equivalentes; VH es el volumen de hidrolizado obtenido al finalizar el pretratamiento (L); g ST<sub>añadidos</sub> es la cantidad de biomasa lignocelulósica añadida en la etapa de llenado en cada ciclo del pretratamiento.

Las ecuaciones 4 a 6 son específicas para a producción de metano: i) el Potencial Bioquímico de Metano (PBM, mL CH<sub>4</sub> g DQO<sub>añadida</sub><sup>-1</sup>) se determinó de acuerdo con la ecuación 4; ii) el rendimiento de metano por g ST añadido en la etapa de hidrólisis (RMH, mL CH<sub>4</sub> g ST<sup>-1</sup>) se calculó con la ecuación 5; y iii) el incremento de rendimiento de metano (IRM, %) se determinó mediante la ecuación 6.

$$PBM = \frac{VCH_4}{S_a} \quad [\text{Ec.4}]$$

$$RMH = RHP * PBM \quad [\text{Ec.5}]$$

$$IRM = \frac{RMH_p - PBM_{sp}}{PBM_{sp}} * 100 \quad [\text{Ec. 6}]$$

Donde VCH<sub>4</sub> es el volumen máximo de metano (restándole el metano generado por el endógeno) generado expresado en NmL; S<sub>a</sub> es la cantidad de DQO añadida expresada en g; RMH<sub>p</sub> es el rendimiento de metano obtenido por g ST añadido de biomasa lignocelulósica pretratada con microorganismos ruminales o nativos; y PBM<sub>sp</sub> es el Potencial Bioquímico de Metano obtenido por g ST de bagazo sin pretratamiento añadidos directamente a metanogénesis.

Para calcular el TRH (d) de operación en semi continuo se empleó la ecuación 7.

$$TRH = T_c * \frac{M_t}{M_i} \quad [\text{Ec.7}]$$

M<sub>i</sub> es la cantidad de masa añadida en la etapa de llenado; M<sub>t</sub> es la masa de trabajo en el reactor; T<sub>c</sub> es tiempo total del ciclo.

## 6.10 Análisis estadísticos

La significancia estadística de los resultados obtenidos fue evaluada por ANOVA y prueba de Tukey, con un nivel de confianza de 95% usando Minitab (Versión 15, Minitab, Inc., State College, PA, USA) para determinar la correlación de variables se realizó una regresión lineal simple usando el mismo software. Para describir la diversidad de las comunidades microbianas se usó el índice de Shannon-Weaver y también se realizaron los agrupamientos de las diferentes muestras mediante el software Rstudio v.1.0.153.

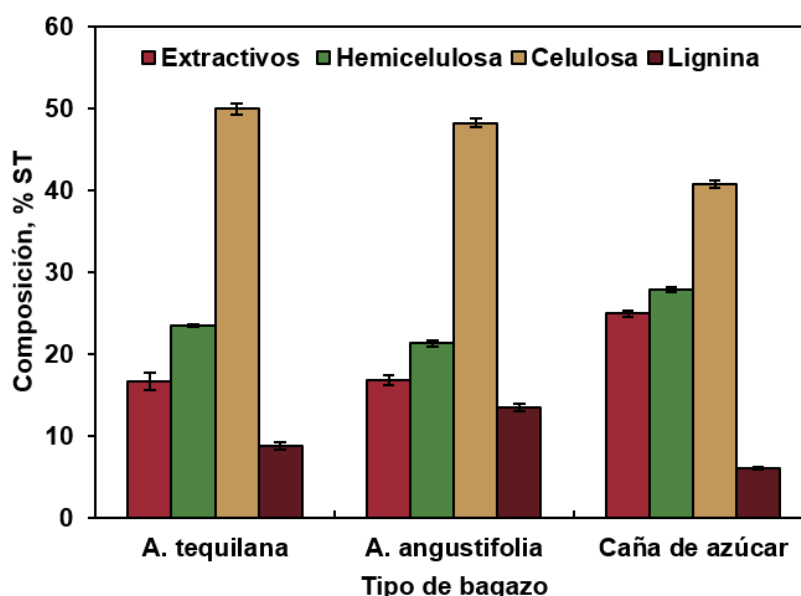


## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Caracterización de biomasa lignocelulósica y contenido ruminal

La composición la biomasa lignocelulósica es un factor importante que influye en la eficiencia de hidrólisis (Zheng et al., 2014). Se determinó la composición de tres biomásas lignocelulósicas, encontrando que la fracción de celulosa y hemicelulosa se encuentra alrededor del 70%, el cual representa un alto contenido de azúcares que pueden ser potencialmente hidrolizados (**Figura 7.1**). El bagazo de *Agave angustifolia* contiene la mayor composición de lignina (13.5% ST) en comparación con los otros dos bagazos evaluados. Esta fracción es el componente más recalcitrante de la pared celular, por lo tanto, un mayor contenido de lignina resulta en una mayor resistencia a la degradación biológica (de Souza, 2013).

El contenido de lignina del bagazo de *A. tequilana* es dos veces menor con respecto al 15% ST reportado por Saucedo-Luna et al. (2011). Esta diferencia podría deberse al origen de la biomasa, el tamaño de partícula, las condiciones de cosecha y también las condiciones del proceso para el aprovechamiento de la materia prima (Pérez-Pimienta et al., 2017).



**Figura 7.1.** Composición de los tres bagazos evaluados.

Con respecto a la actividad enzimática xilanasa del contenido ruminal (**Tabla 7.1**), se obtuvo un valor 1.3 veces mayor que lo reportado al inicio del pretratamiento de rastrojo de maíz con fluido ruminal (Li et al., 2017). También, se muestra en la **Tabla 7.2** la caracterización de las biomásas lignocelulósicas.



**Tabla 7.1.** Caracterización del contenido ruminal.

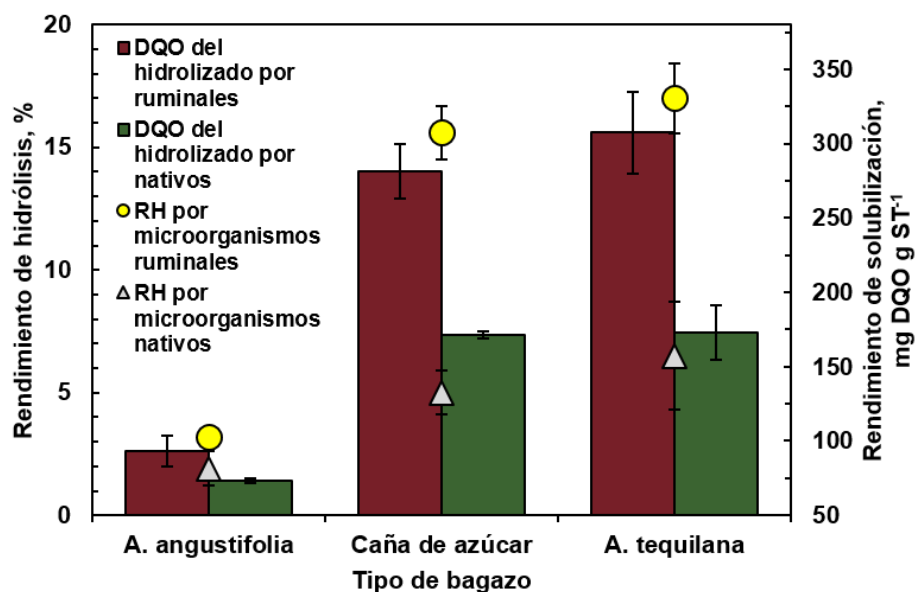
Muestra	Parámetro	Valor
Contenido ruminal	Sólidos totales (ST) (g g <sup>-1</sup> )	0.1287 ± 0.00
	Sólidos volátiles (SV) (g g <sup>-1</sup> )	0.111 ± 0.00
	Actividad CMCasa (UI mL <sup>-1</sup> )	0.88 ± 0.01
	Actividad Xilanasa (UI mL <sup>-1</sup> )	2.17 ± 0.28
	pH	6.9

**Tabla 7.2.** Caracterización de biomazas lignocelulósicas.

Muestra	Sólidos totales (ST) (g g <sup>-1</sup> )	Sólidos volátiles (SV) (g g <sup>-1</sup> )	g DQO g ST <sup>-1</sup>
Bagazo de <i>Agave tequilana</i>	0.932 ± 0.002	0.904 ± 0.002	1.29
Bagazo de <i>Agave angustifolia</i>	0.936 ± 0.001	0.882 ± 0.010	1.56
Bagazo de caña de azúcar	0.930 ± 0.000	0.887 ± 0.002	1.03

## 7.2 Evaluación de la hidrólisis con diferentes biomazas lignocelulósicas

Se realizó un ensayo de hidrólisis de las tres biomazas con los microorganismos ruminales. Los resultados demostraron que el uso de microorganismos ruminales logró alcanzar un rendimiento de hidrólisis de 17% y 15.6% para la *A. tequilana* y la caña de azúcar respectivamente, siendo significativamente mayor al rendimiento de hidrólisis obtenido con microorganismos nativos ( $p < 0.05$ , **Figura 7.2**). Sin embargo, en el bagazo *A. angustifolia* no se presentó un incremento significativo en el rendimiento de hidrólisis; esto puede deberse al alto contenido de lignina presente en este bagazo, el cual dificultó la hidrólisis por acción de microorganismos ruminales. Además del contenido de lignina, es probable que las saponinas presentes en la biomasa lignocelulósica afectaron en la hidrólisis enzimática, ya que estos son metabolitos involucrados en la defensa de las plantas contra el ataque microbiano. A pesar de que este mecanismo no está del todo entendido, se ha reportado previamente que el *A. angustifolia* y *A. tequilana* tienen presencia de saponinas de carácter esterooidal, aunado a eso, el tipo y concentración de saponinas varía de una especie a otra (Alcázar-Valle, 2016). No obstante, no es posible determinar el efecto de las saponinas en este trabajo puesto que no se realizó la determinación de este compuesto.


**Figura 7.2.** Rendimiento de hidrólisis de las biomazas lignocelulósicas pretratadas con microorganismos ruminales vs microorganismos nativos.

Al comparar los resultados del rendimiento de solubilización en este experimento con la literatura (**Tabla 7.3**), es notable el mayor rendimiento de hidrólisis de los pretratamientos químicos, mientras que el potencial del fluido ruminal es prometedor, con resultados similares a los obtenidos con otras biomásas lignocelulósicas. En este sentido, Arreola-vargas et al. (2016) pretrataron bagazo *A. tequilana* empleando HCl, en el cual su rendimiento de hidrólisis es dos veces mayor que el obtenido en la presente experimentación. Si bien el pretratamiento químico obtiene un rendimiento mayor, el uso de reactivos, la generación de compuestos inhibitorios y el uso de altas temperaturas puede limitar el proceso a escala real (Behera et al., 2014). Pretratando residuo de papel con fluido ruminal, Takizawa et al. (2018) obtuvieron un rendimiento 10 veces menor al presente trabajo, esto se debe principalmente al alto contenido de cenizas en el residuo lignocelulósico (66% ST), puesto que la hidrólisis se afectada por los minerales presentes en las cenizas (Min et al., 2015). Por su parte, Zhang et al. (2016) alcanzaron un rendimiento similar al reportado en el presente trabajo, sin embargo, es muy probable que el rendimiento que reportan dichos autores este sobreestimado ya que no mencionan la cantidad de DQO que corresponde al fluido ruminal.

La desventaja más importante de los pretratamientos biológicos es el tiempo de pretratamiento, ya que este es 260 veces más lento que un pretratamiento químico. Por ello posteriormente se evaluó el rendimiento de hidrólisis en un sistema semicontinuo, donde se esperaba que el enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos permita obtener una mayor productividad.

**Tabla 7.3.** Comparación del rendimiento de hidrólisis de distintos pretratamientos con residuos lignocelulósicos.

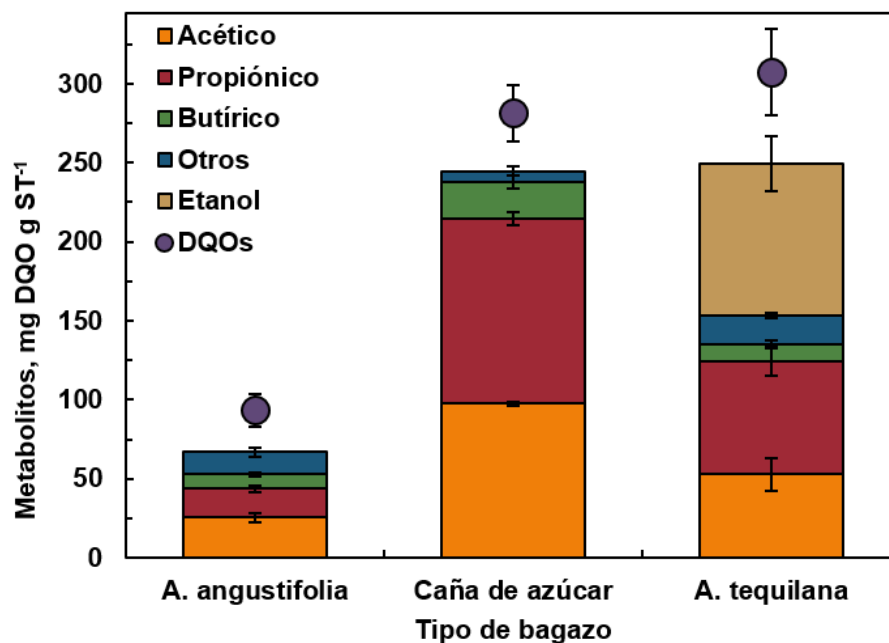
Residuo lignocelulósico	Pretratamiento	Condiciones	mg DQO g ST <sup>-1</sup>	Referencia
Bagazo <i>A. tequilana</i>	Químico	2.7% HCl, 124°C, 1.3 horas.	604	(Arreola-vargas et al., 2016)
Residuos de papel	Fluido ruminal	37°C, 170 rpm, 6 horas.	20	(Takizawa et al., 2018)
Paja de arroz	Fluido ruminal	39°C, 120 rpm, 5 días.	326*	(Zhang et al., 2016)
Bagazo <i>A. tequilana</i> / Bagazo caña de azúcar	Contenido ruminal	37°C, 150 rpm, 13 días.	307/281	<b>Presente trabajo</b>
Bagazo <i>A. angustifolia</i>	Contenido ruminal	37°C, 150 rpm, 13 días.	93	<b>Presente trabajo</b>

\*AGV como DQO.

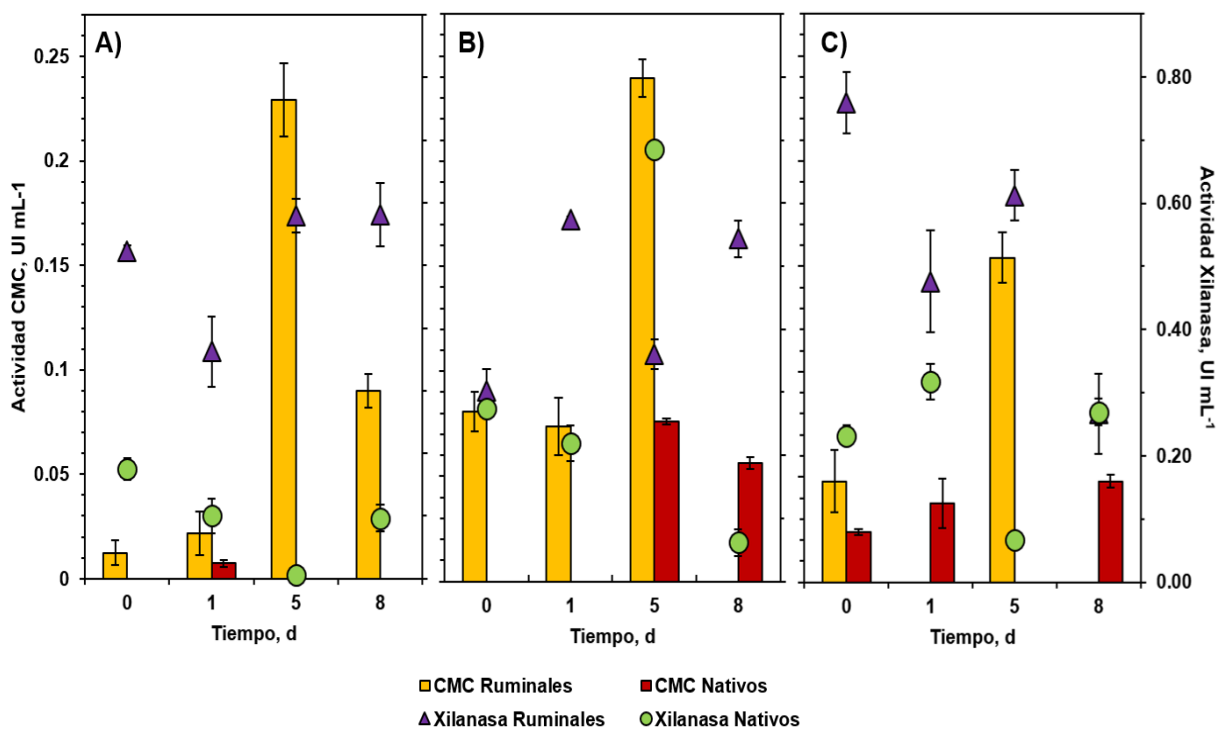
Del resultado de la hidrólisis y fermentación de las biomásas lignocelulósicas pretratadas con contenido ruminal se obtuvieron hidrolizados con alta presencia de AGV (**Figura 7.3**). Los AGV más abundantes producidos fueron el acético> propiónico>butírico; en donde los rendimientos de acidificación fueron 96, 90, y 49% para los bagazos de *A. angustifolia*, caña de azúcar y *A. tequilana*, respectivamente. La diferencia del rendimiento de acidificación obtenido con el bagazo de *A. tequilana* comparado los otros dos bagazos se debe principalmente a la generación de etanol. Es posible que en un sistema semicontinuo el rendimiento de acidificación incremente y por ende se logre un mejor aprovechamiento de los AGV en la producción de metano en una etapa posterior (Barragán-Trinidad, 2018).

### 7.2.1 Cambios en la actividad enzimática

Se midieron las actividades CMC y xilanasas generadas durante el pretratamiento de las biomásas lignocelulósicas (**Figura 7.4**). En los tres bagazos pretratados con microorganismos ruminales las actividades CMC y xilanasas fueron en promedio 4 veces mayores con respecto a los valores obtenidos por pretratamiento con microorganismos nativos. El bagazo de *A. angustifolia* pretratado por microorganismos nativos presentó las actividades CMC y xilanasas más bajas en comparación con los otros dos bagazos, esto puede relacionarse con el bajo rendimiento de hidrólisis obtenido durante el pretratamiento (1.9%).



**Figura 7.3.** Metabolitos generados en el hidrolizado obtenido con los tres diferentes bagazos pretratados con microorganismos ruminales.



**Figura 7.4.** Cambios en las actividades enzimáticas CMC y Xilanasas en la hidrólisis de biomásas lignocelulósicas. A) Bagazo *Agave angustifolia*, B) Bagazo *Agave tequilana* y C) Bagazo caña de azúcar.

Para ambos pretratamientos (ruminales y nativos) la actividad xilanasa siempre fue detectada durante la experimentación. Los bagazos pretratados con ruminales obtuvieron en promedio un valor de actividad xilanasa de  $0.53 \text{ UI mL}^{-1}$ , de forma similar Lazuka et al. (2015) emplearon pretratamiento de paja de trigo con fluido ruminal, donde esta actividad posterior al día 7, se mantuvo constante en un rango de 0.8 a  $0.7 \text{ UI mL}^{-1}$ . La actividad xilanasa implicó un papel importante en la degradación de las biomásas lignocelulósicas evaluadas, lo cual se ve reflejado en que durante los puntos donde se midieron ambas actividades, la actividad xilanasa siempre fue de magnitud más grande que la CMC, es probable a que se deba puesto que ya que la hemicelulosa tiene una naturaleza ramificada que le confiere una estructura amorfa, (Scheller and Ulvskov, 2010).

En ambas actividades enzimáticas (CMC y xilanasa) no se observa un comportamiento estable, esta variación puede deberse a diversos factores, la ubicación de las enzimas después de su biosíntesis (libre o unida a la célula) y la estabilidad de las enzimas; además es posible que las enzimas generadas por los microorganismos del rumen actúen directamente sobre la biomasa lignocelulósica y por lo tanto la medición de las actividad en la fracción soluble no tengan un comportamiento predecible (Li et al., 2017; Parawira et al., 2005).

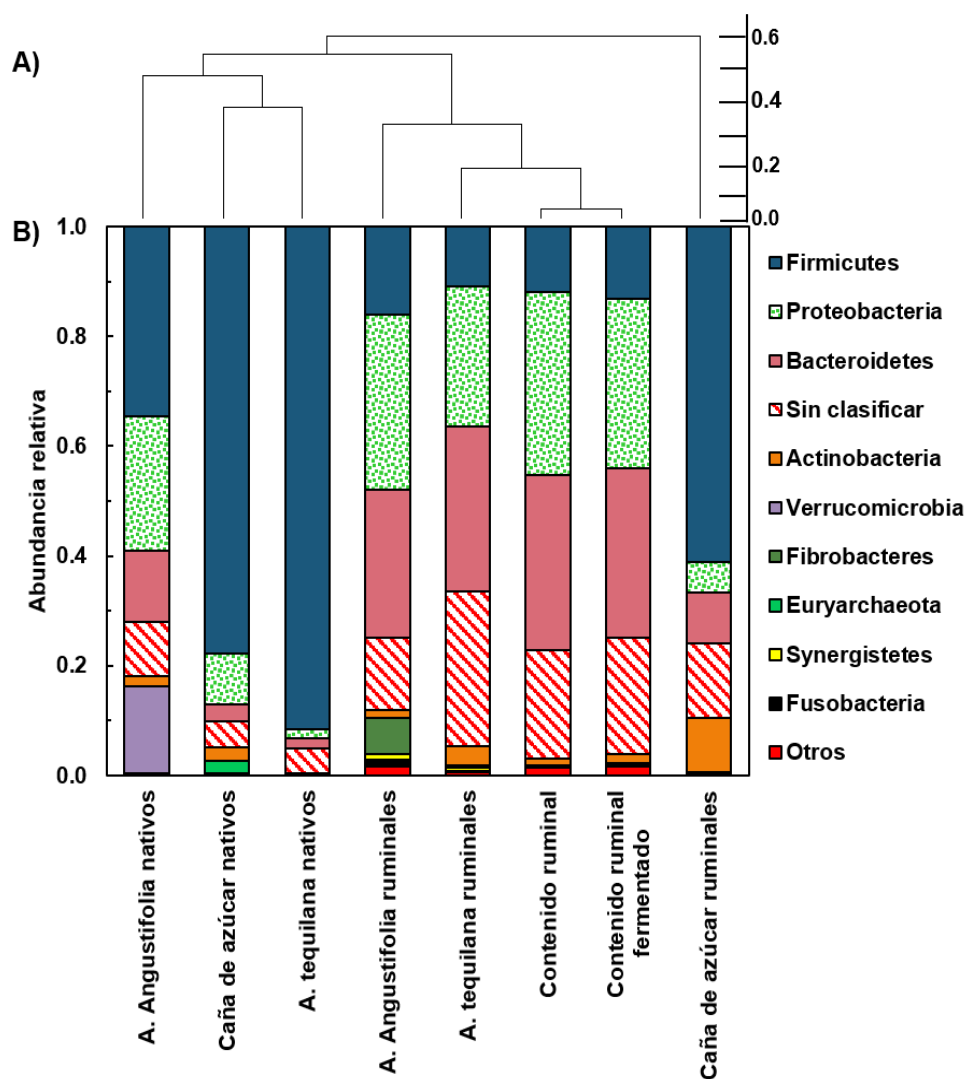
## 7.2.2 Análisis de comunidad microbiana

El análisis de agrupamiento de las comunidades microbianas muestra que la comunidad del contenido ruminal guarda mayor similitud con aquella que logró adaptarse en los bagazos de *A. angustifolia* y *A. tequilana* al final del pretratamiento con microorganismos ruminales (**Figura 7.5**). La suma de los filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* representa entre el 66 y 76% de la comunidad bacteriana en los dos bagazos mencionados; estos filos tienen géneros bacterianos con capacidad hidrolítica. En este sentido, el filo *Bacteroidetes* está conformado entre el 76 y 87% por el género *Prevotella*, el cual se caracteriza por tener capacidad de degradar polisacáridos estructurales (Puniya et al., 2015). Por lo tanto, se demuestra que el uso de contenido ruminal logró la selección y enriquecimiento de microorganismos con capacidad hidrolítica, en comparación de los bagazos cuando fueron pretratados con microorganismos nativos.

Un segundo grupo lo constituyen las comunidades bacterianas de los bagazos pretratados por microorganismos nativos. Para *A. Angustifolia*, la comunidad bacteriana está representada en su mayoría por el filo *Firmicutes* (34.7%), el cual está constituido principalmente por *Ruminoclostridium* (15.6%); en la caña de azúcar el filo *Firmicutes* (77.7%) está conformada en su mayoría por *Clostridium* (35.3%) y en el bagazo *A. tequilana* el filo *Firmicutes* (91.6%) por: *Ruminoclostridium* (17%), *Bacillus* (17.8%) y *Clostridium* (20.4%). La mayoría de los microorganismos reportados previamente con capacidad de degradar celulosa y hemicelulosa pertenecen al filo de *Firmicutes* (Puniya et al., 2015).

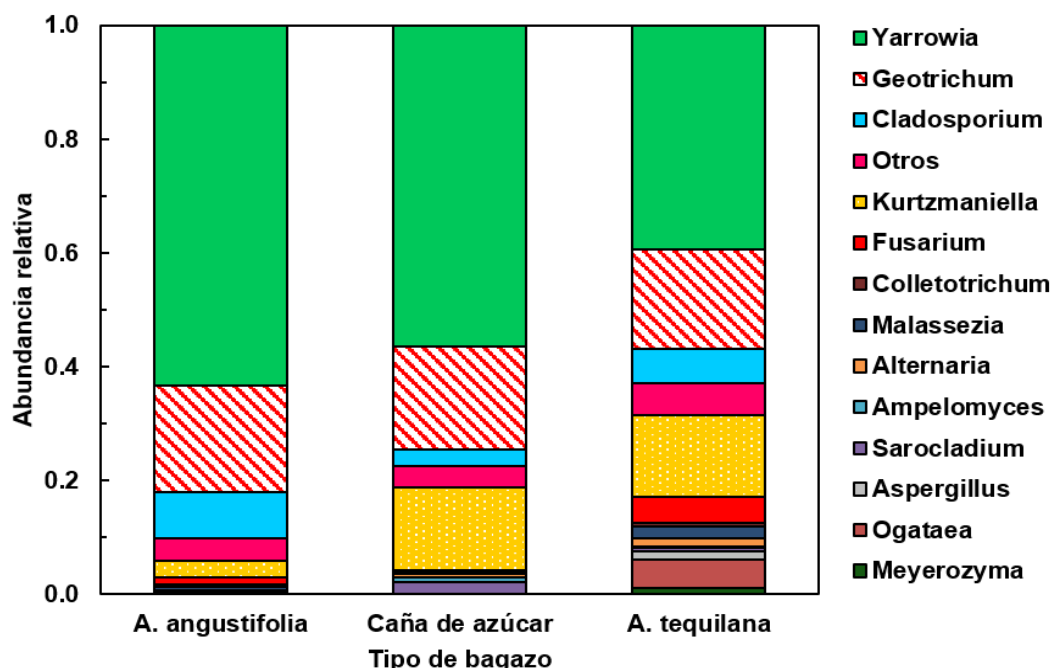
Pérez-Rangel et al. (2015) reportaron que la comunidad microbiana nativa de la paja de trigo fue robusta para degradar la fracción del material lignocelulósico, pero usando fluido ruminal como fuente de inóculo el rendimiento fue menor, esto lo atribuyen a la alta sensibilidad al oxígeno y la falta de factores que requieren los microorganismos ruminales para su crecimiento, sin embargo, en el presente trabajo, el rendimiento de hidrólisis fue mayor que el obtenido por microorganismos nativos. Por otra parte, la caña de azúcar pretratada con microorganismos ruminales no presentó similitud con la comunidad del contenido ruminal, sin embargo, la comunidad seleccionada si favoreció el incremento del rendimiento de hidrólisis.

Con respecto a las arqueas, estas representaron menos del 3% de las procariotas, esto explica que el biogás generado durante el pretratamiento contenía una composición de metano del 8-13%.



**Figura 7.5.** A) Análisis de la comunidad microbiana a nivel de filo. Solo se muestran los phyla con abundancia relativa mayor al 1%; B) Dendrograma de las comunidades microbianas.

Con respecto al análisis de comunidades fúngicas, los géneros de hongos hidrolíticos más abundantes en los tres bagazos pretratados con contenido ruminal fueron: *Geotrichum* y *Yarrowia* (**Figura 7.6**). *Geotrichum* se caracteriza por tener alta actividad xilanas, celulasas y quitinasas (Piegza et al., 2014). Mientras tanto, el género *Yarrowia* está representado en su totalidad por *Y. lipolytica*, esta especie es capaz de usar los AGV como fuente de carbono para la producción de lípidos (Fontanille et al., 2012).



**Figura 7.6.** Análisis de la comunidad fúngica seleccionada, a nivel de género, durante el pretratamiento con contenido ruminal. Solo se muestran los géneros con abundancia relativa mayor al 1%.

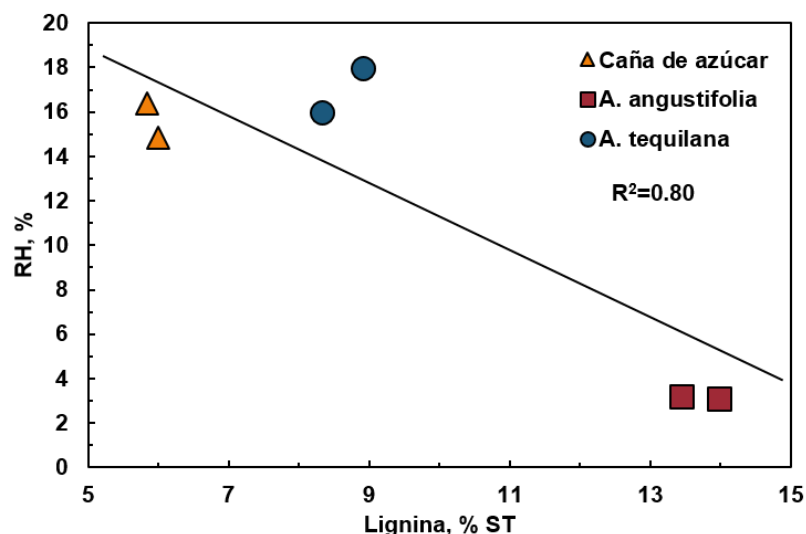
### 7.2.3 Relación de la composición de la biomasa lignocelulósica con el rendimiento de hidrólisis

Con los resultados obtenidos, se encontró que la lignina es el compuesto de la biomasa lignocelulósica que tiene una correlación negativa significativa ( $p < 0.05$ ) con el rendimiento de hidrólisis mediante microorganismos ruminales (**Tabla 7.4** y **Figura 7.7**). De forma similar, Triolo et al. (2011) evaluaron la influencia de la lignina sobre el potencial bioquímico de metano (PBM) de diversas biomásas lignocelulósicas; mediante regresiones lineales simples, observaron que existe una correlación negativa significativa entre el PBM y el contenido de lignina ( $R^2 = 0.775$ ). La lignina entrelaza la celulosa y hemicelulosa, lo cual dificulta la hidrólisis enzimática de estos polisacáridos, por lo tanto, la lignina es una de las características de los sustratos lignocelulósicos que más afectan el BPM (Xu et al., 2014).

**Tabla 7.4.** Correlación entre la biomasa lignocelulósica y el rendimiento de hidrólisis.

Variable de predicción vs rendimiento de hidrólisis	P*	R <sup>2</sup> **
Extractivos	0.318	0.245
Celulosa	0.64	0.06
Hemicelulosa	0.116	0.501
Lignina	0.016	0.799

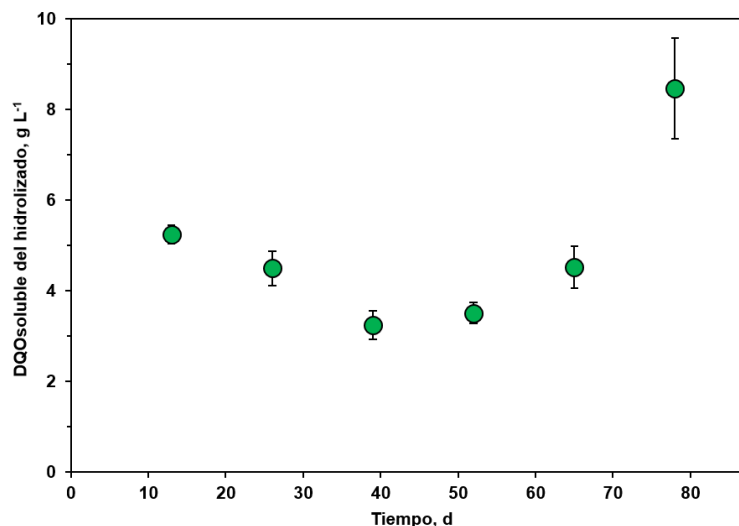
\*  $\alpha = 0.05$  \*\* Coeficiente de determinación



**Figura 7.7.** Correlación de rendimiento de hidrólisis vs lignina.

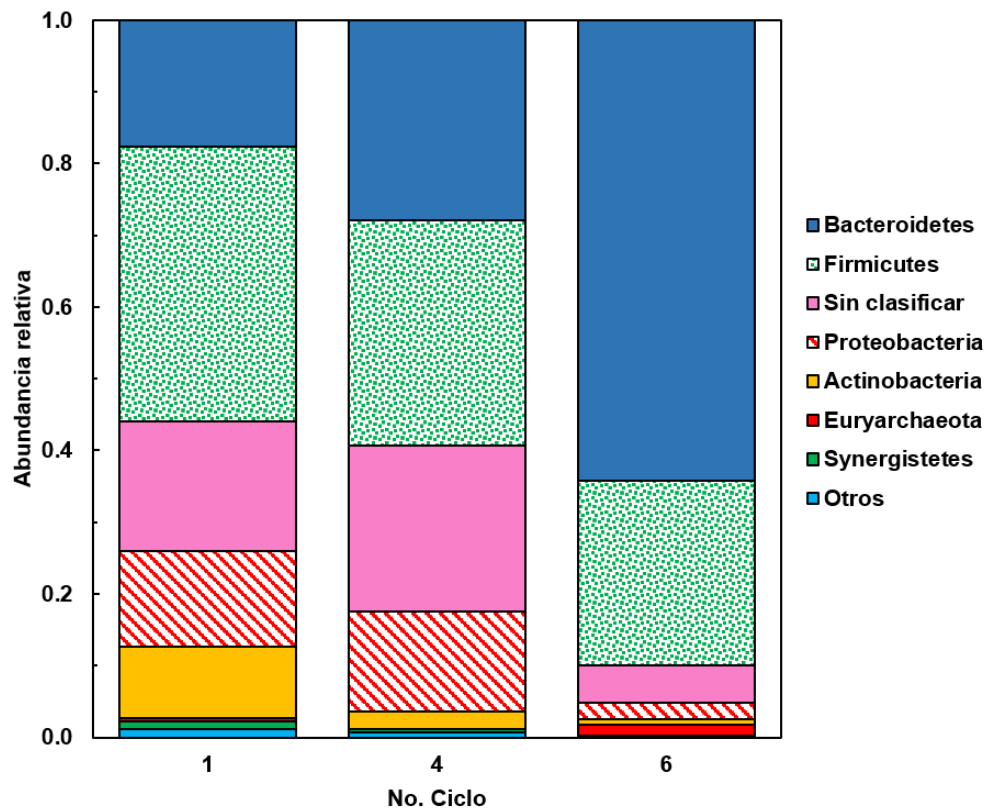
### 7.3 Enriquecimiento de microorganismos hidrolíticos

El objetivo en esta etapa fue enriquecer los microorganismos hidrolíticos para incrementar el rendimiento de hidrólisis y posteriormente operar el sistema en semicontinuo. Se observó que la DQO soluble incrementó de  $5.2 \text{ g L}^{-1}$  (Ciclo 1) a  $8.5 \text{ g L}^{-1}$  (Ciclo 6) (**Figura 7.8**). Durante los ciclos de enriquecimiento se obtuvo un cambio en la comunidad microbiana principalmente por las OTUs relacionada con el filo de Bacteroidetes (**Figura 7.9**). El filo Bacteroidetes fue representando en su mayoría por el género *Prevotella* conocido como una bacteria ruminal con actividad hemicelulolítica (Krause et al., 2003). La OTU de *Prevotella* incrementó su abundancia relativa de 7.4% en el ciclo 1 hasta 38.4% en el ciclo 6. La segunda OTU más predominante durante el enriquecimiento (desde 0% hasta 8%) se relaciona con *Ruminoclostridium cellulosi*, el cual tiene capacidad de degradar principalmente celulosa (Koeck et al., 2014).



**Figura 7.8.** Perfil de la DQO soluble durante la etapa de enriquecimiento, cada punto corresponde a un ciclo diferente.

Con respecto a las OTUs que disminuyeron en su abundancia relativa durante la etapa de enriquecimiento, fueron las que se relacionan con los géneros: *Olsenella* (de 9.5% a 0%) y *Paenisporosarcina* (de 10.1% a 0%). Estos microorganismos son capaces de generar ácido láctico y ácidos de cadena larga (Kraatz et al., 2011; Krishnamurthi et al., 2009). También se determinó el índice de Shannon para cada ciclo, disminuyendo de 2.17 (Ciclo 1) a 1.60 (Ciclo 6), la pérdida en la diversidad se explica por la mayor abundancia de microorganismos hidrolíticos.



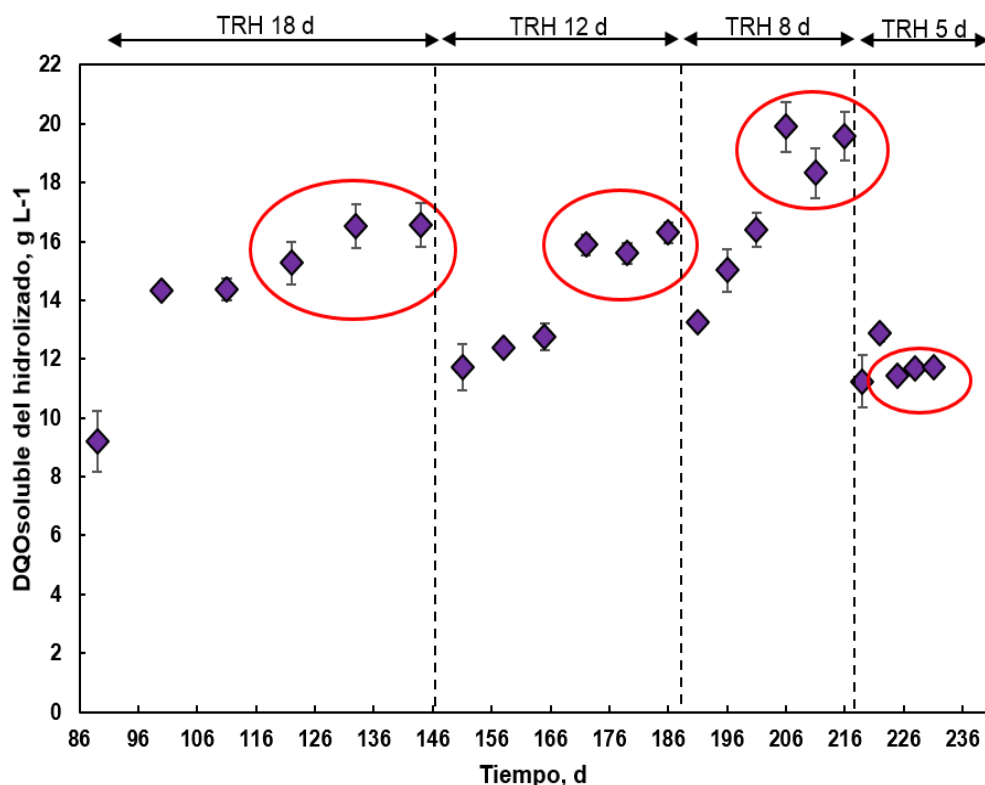
**Figura 7.9.** Análisis de la comunidad microbiana seleccionada, a nivel de filo, durante los ciclos de enriquecimiento. Solo se muestran los phylum con abundancia relativa mayor al 1%.

#### 7.4 Hidrólisis semicontinua de bagazo de *A. tequilana*

Durante la operación del reactor semicontinuo (**Figura 7.10**) se determinó que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los últimos tres ciclos de cada TRH evaluado, lo que demuestra la estabilidad del sistema. El desempeño del reactor semicontinuo se muestra en la **Tabla 7.5**, en el cual la producción de DQO soluble aumentó con la disminución del TRH de 18 a 8 días, no obstante, con un TRH de 5 días, la productividad de DQO<sub>soluble</sub> no aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ). Con respecto a las productividades de AGVT, el valor más alto obtenido es de  $1692 \pm 185 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  con un TRH de 8 días. Con este mismo TRH se logra el rendimiento de hidrólisis más alto ( $18.8 \pm 1.5\%$ ).

La producción de AGVT no mostró la misma tendencia. Se obtuvo la mayor productividad de AGVT en un TRH de 8 d ( $1692 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), sin embargo, esta decrece significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando se disminuye el TRH a 5 d. Esto se debe principalmente al bajo rendimiento de acidificación en un TRH de 5 días, es probable que a este tiempo en el sistema se estén formando otros metabolitos intermediarios.





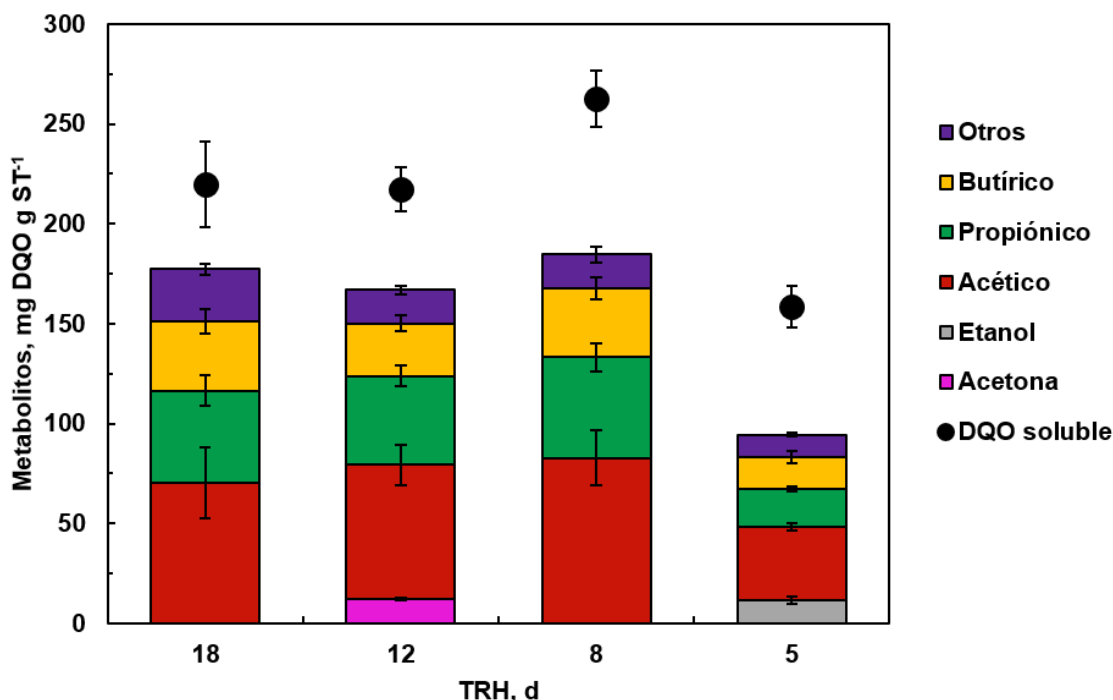
**Figura 7.10.** Perfil de DQO soluble obtenida en el hidrolizado durante la operación en semicontinuo.

**Tabla 7.5.** Desempeño del reactor semicontinuo.

TRH, d	Productividad DQO <sub>soluble</sub> , mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Productividad AGVT, mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Rendimiento de hidrólisis, %	Rendimiento de acidificación, %	pH
18	895 ± 87	722 ± 133	15.3 ± 2.2	80.4 ± 9.6	5.1 ± 0.2
12	1328 ± 66	945 ± 102	12.8 ± 1.0	71.3 ± 8.2	5.2 ± 0.1
8	2408 ± 131	1692 ± 185	18.8 ± 1.5	70.6 ± 9.8	5.5 ± 0.2
5	2324 ± 150	1213 ± 58	9.5 ± 1.0	52.3 ± 2.6	5.3 ± 0.2

En la **Figura 7.11** se muestran los metabolitos correspondientes a la fracción soluble del hidrolizado. La mayor parte de la DQO soluble está conformada principalmente por AGVT (52 a 72%), de los cuales el acético, propiónico, butírico y otros (isobutírico, isovalérico, valérico y caproico) representa el 32.4%, 19.7%, 13.4% y 6.6% respectivamente; mientras que el 27.9% restante corresponde a metabolitos no determinados. Esta proporción de AGV es similar a lo reportado previamente por Baba et al. (2017), donde la concentración de DQO soluble está representada por acético (34.3%), propiónico (12.2%) y butírico (6.3%). Las composiciones de AGV mencionadas anteriormente son características de la fermentación de carbohidratos o compuestos lignocelulósicos dentro del rumen (Puniya et al., 2015).

Comparando con otros trabajos similares, Hu y Yu (2005) emplearon un sistema semicontinuo para la degradación de rastrojo de maíz usando microorganismos ruminales, cuando operaron el sistema a 35°C y con una carga orgánica de 10 g ST d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, obtuvieron una alta eficiencia de conversión de SV del 34.5% y una producción de AGVT de 2001 ± 271 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Esta producción de AGV es mayor a la obtenida en el presente trabajo a condiciones similares (1213 ± 58 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).



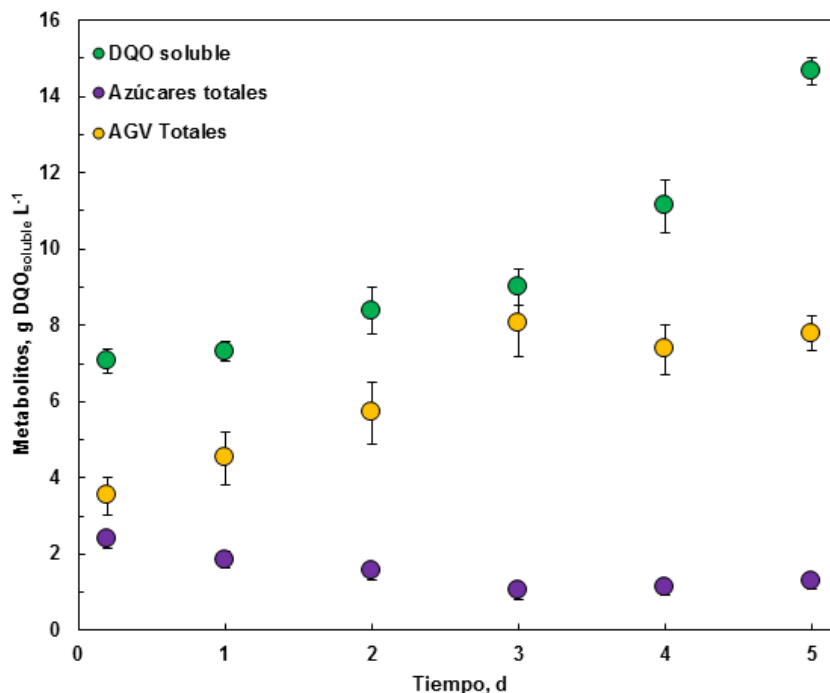
**Figura 7.11.** Metabolitos generados en los ciclos de hidrólisis semi continua de bagazo de *Agave tequilana*.

Hu y Yu (2005) desacoplaron el TRS (3-4 días) y el TRH (12-18 horas), situación que no se realizó en el presente estudio, dichos autores demostraron que a un mayor TRH la eficiencia de conversión de SV disminuye, y esto lo atribuyen principalmente a la sobreacumulación de AGV. En este contexto, Siegert and Banks (2005) mostraron que una concentración de 2 g L<sup>-1</sup> de AGV inhibe la actividad celulolítica y por ende el rendimiento de hidrólisis en reactores en lote. En este estudio, la mayoría de las concentraciones de AGV fueron mayores a lo reportado por el estudio de Siegert y Banks, sin embargo, la actividad celulolítica no fue determinada durante la operación del reactor semicontinuo, por lo tanto, no es posible dar por hecho que en el presente trabajo ocurrió una inhibición por acumulación de AGV.

De forma similar, Li et al. (2017) observaron que las actividades enzimáticas (CMCasa y xilanasa) comenzaron a decrecer después de las 8 horas de pretratamiento, esto lo atribuyen al decremento del pH y a la generación de AGV en el mismo lapso de tiempo. Por ello, se recomienda para futuros trabajos, desacoplar el TRH y el TRS para evitar la sobreacumulación de AGV. Así como también, controlar el pH o aumentar la capacidad buffer del reactor.

## 7.5 Cinética de hidrólisis

Durante la hidrólisis del reactor semicontinuo con un TRH de 8 días (**Figura 7.12**) se observó que la DQO comienza a aumentar significativamente a partir del tercer día hasta alcanzar 14.4 g L<sup>-1</sup> en el día 5; de manera similar los AGV alcanzan la máxima concentración en el día 3 (8 g L<sup>-1</sup>), pero después la concentración comienza a decrecer, con la disminución del rendimiento de acidificación en el hidrolizado. En caso de los azúcares totales, estos comienzan a decrecer desde el primer día, pero posterior al día 3 la concentración no cambió significativamente.



**Figura 7.12.** Cambios en la concentración de DQO soluble, AGVT y azúcares totales durante la hidrólisis de bagazo *A. tequilana*.

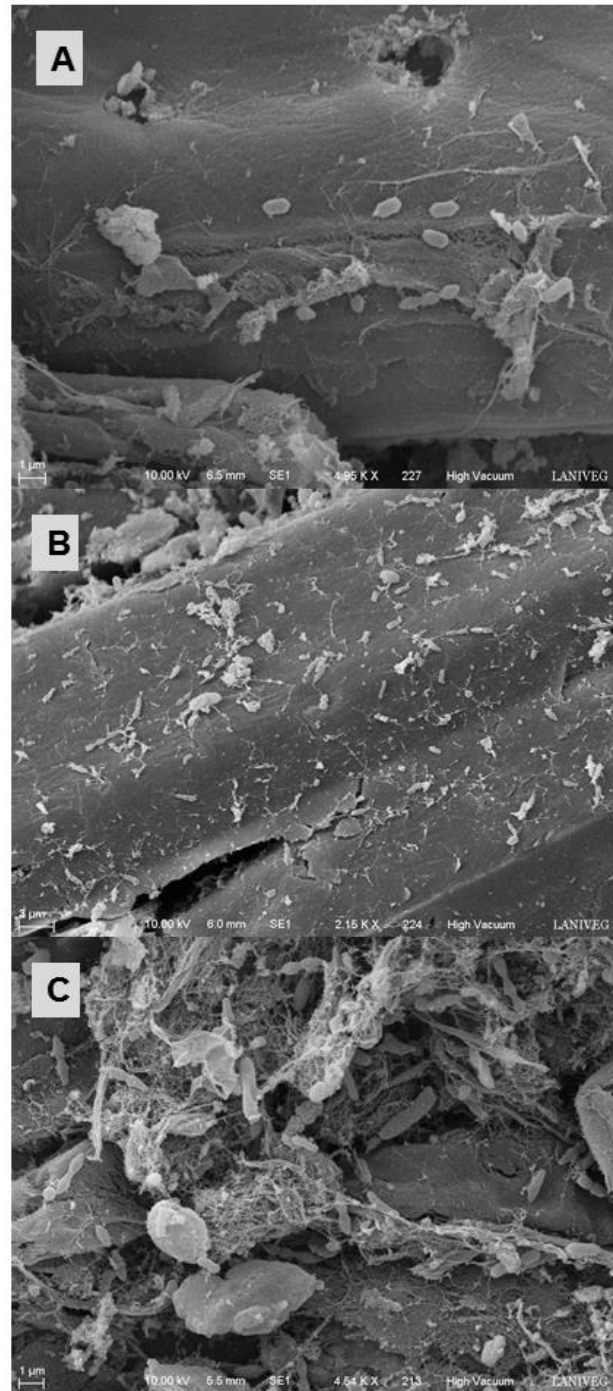
Las imágenes de MEB de las fibras del *A. tequilana* (**Figura 7.13**) muestran que ciertos microorganismos se adhieren a la superficie de la biomasa durante el tiempo de pretratamiento, además se observaron más microorganismos en el día 5 en comparación del primer día, no obstante, esto es únicamente por observación ya que no se empleó un método de cuantificación de microorganismos. Previamente se ha discutido acerca de que diferentes tipos de microorganismos, incluyendo bacterias, protozoos y hongos, que se asocian con las paredes celulares de las plantas durante la incubación con el fluido ruminal (Miron et al., 2001).

## 7.6 Evaluación de metano a partir del hidrolizado y del bagazo pretratado

En la evaluación de metano en la fracción líquida (**Tabla 7.6**) no se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las relaciones S/X de 0.50 y 0.33. Sin embargo, cuando la relación disminuye a 0.25 el PBM aumenta significativamente. Con una relación S/X de 0.20 se obtiene el mayor PBM de 253 NmL CH<sub>4</sub> g DQO<sub>a</sub><sup>-1</sup> siendo 115% mayor que lo obtenido con una S/X de 0.50, en este sentido, Holliger et al. (2016) sugieren que los sustratos con mayor facilidad de degradabilidad requieren un S/X menor a 0.25 para evitar inhibición. De igual forma el valor de 253 NmL CH<sub>4</sub> g DQO<sub>a</sub><sup>-1</sup> es 1.6 veces mayor que lo reportado previamente en hidrolizados ácidos de *A. tequilana* (Arreola-Vargas et al., 2016).

Los resultados de la **Tabla 7.7** muestran que al metanizar ambas fracciones del pretratamiento ruminal, el rendimiento de proceso incrementa 3 veces más a comparación del bagazo sin pretratar. En cuestión a la productividad, también resulta 2 veces mayor que únicamente producir metano de la fracción líquida. Es decir, que una parte importante del metano generado proviene del material particulado sometido a pretratamiento.

También se compararon los rendimientos de proceso con trabajos previos (**Tabla 7.8**), en donde Galindo-Hernández et al. (2018) obtuvieron un rendimiento de proceso 2.8 veces mayor que el obtenido en el presente trabajo. Aunque este valor fue mayor, debe considerarse que en el pretratamiento ruminal no se requiere reactivos químicos ni enzimas comerciales, lo que puede disminuir los costos de producción, no obstante, se requiere de una comparación en balance energético y simulación de procesos para tener una conclusión que dictamine que pretratamiento es más efectivo y menos costoso.



**Figura 7.13.** Imágenes MEB de fibras del bagazo *A. tequilana* durante la cinética de hidrólisis, A) día 1, B) día 3 y C) día 5.

**Tabla 7.6.** Rendimientos experimentales de metano obtenidos del hidrolizado.

Pretratamiento	Fracción evaluada	S/X	PBM, NmL CH <sub>4</sub> g DQO <sub>añadida</sub> <sup>-1</sup>	PBM, NmL CH <sub>4</sub> g DQO <sub>consumida</sub> <sup>-1</sup>	Rendimiento de proceso, L CH <sub>4</sub> kg bagazo <sub>añadidos</sub> <sup>-1</sup>	Tiempo de incubación, d	Productividad, L CH <sub>4</sub> kg bagazo <sub>añadidos</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
Microorganismos ruminales (reactor semicontinuo)	Hidrolizado fracción líquida	0.50	221 ± 3	258 ± 4	19	4	4.6
		0.33	223 ± 4	264 ± 5	18	4	4.5
		0.25	244 ± 3	289 ± 3	20	4	4.9
		0.20	253 ± 0	285 ± 0	20	4	5.1

**Tabla 7.7.** Rendimientos experimentales de metano obtenido del hidrolizado (fracción líquida + bagazo).

Pretratamiento	Fracción evaluada	Rendimiento de proceso, L CH <sub>4</sub> kg bagazo <sub>añadidos</sub> <sup>-1</sup>	Tiempo de incubación, d	Productividad, L CH <sub>4</sub> kg bagazo <sub>añadidos</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
Sin pretratamiento	Bagazo crudo	80	19	4.2
Microorganismos nativos (reactor en lote)	Hidrolizado fracción líquida + bagazo pretratado	93	20	4.7
Microorganismos ruminales (reactor semicontinuo)	Hidrolizado fracción líquida + bagazo pretratado	224	20	11.2

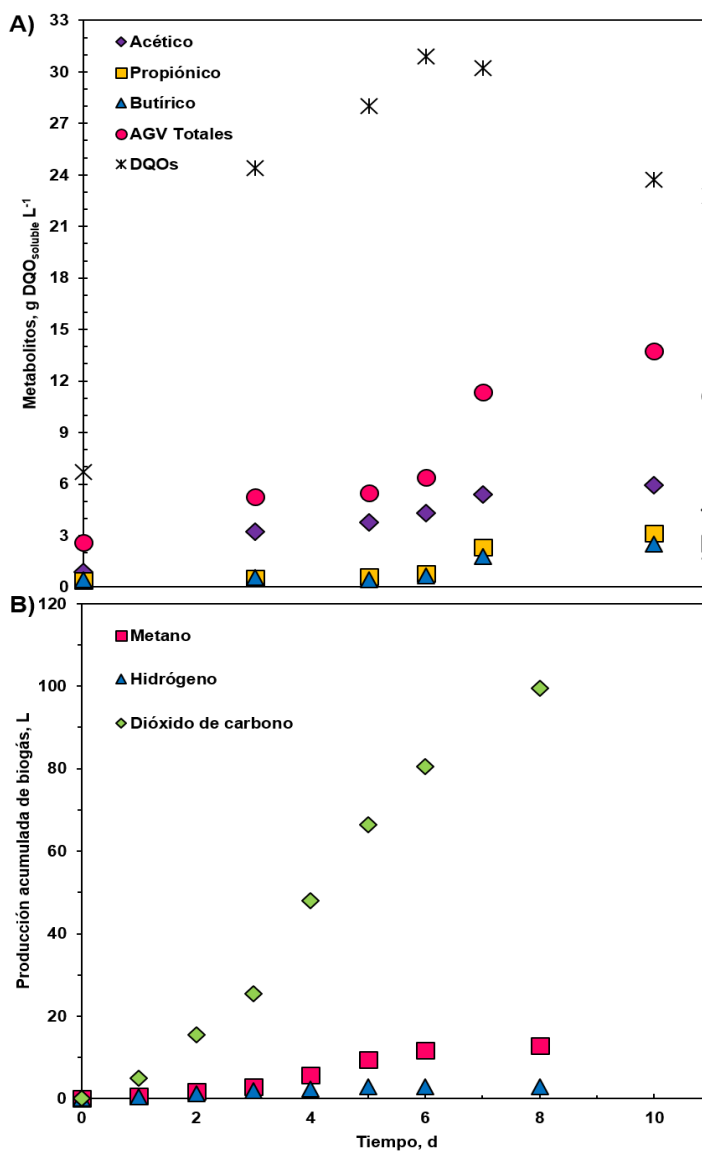
**Tabla 7.8.** Comparación de rendimiento de proceso con otros pretratamientos de bagazo de *A. tequilana*.

Pretratamiento	Fracción evaluada	Rendimiento de proceso, L CH <sub>4</sub> kg bagazo <sub>añadidos</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Químico, HCl	Hidrolizado fracción líquida	151	(Arreola-Vargas et al., 2016)
Microorganismos ruminales (reactor semicontinuo)	Hidrolizado fracción líquida + bagazo pretratado	223.5	Presente trabajo
Peróxido de Hidrógeno Alcalino; Mezcla de enzimas Celluclast 1.5 L® y Viscozyme L®	Hidrolizado fracción líquida	393	(Galindo-Hernández et al., 2018)

### 7.7 Pretratamiento biológico de bagazo *A. tequilana* en un volumen mayor

Durante el pretratamiento, el ácido acético fue el producto de fermentación predominante (**Figura 7.14**), incrementando de 0.9 a 4.5 g L<sup>-1</sup>, seguido del ácido propiónico y ácido butírico de 0.4 a 2.5 g L<sup>-1</sup> y 0.4 a 2.1 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos resultados confirman la capacidad de los microorganismos ruminales para convertir el bagazo de *A. tequilana* en AGV. Al finalizar el pretratamiento se obtuvieron 11.1 g L<sup>-1</sup> de AGV totales, esto representa un 52% de rendimiento de acidificación.

La producción de gas acumulado aumentó significativamente antes del día 6. El gas se compuso principalmente de dióxido de carbono (80%-83%), el contenido de metano fue entre 9.8% y 10.8% y ligeramente mayor que el hidrógeno (6.6%-3.4%). En este contexto, es posible que el decrecimiento de la DQO soluble se debe a producción de metano y de dióxido de carbono, pues esto indica que la materia orgánica se está oxidando. Por lo tanto, 5 días es un tiempo recomendable para el pretratamiento, ya que se tendría una mayor cantidad de materia orgánica disponible para la producción de metano en una etapa posterior.



**Figura 7.14.** A) Perfiles de DQO soluble y AGV del hidrolizado y B) producción acumulada de gas durante el pretratamiento.

---

## 8. Conclusiones

El contenido de lignina (% ST) tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en el rendimiento de hidrólisis en las biomásas lignocelulósicas evaluadas. En este sentido, al utilizar bagazo de *A. tequilana* y bagazo de caña azúcar (8.8% y 6% ST de lignina, respectivamente), el rendimiento de hidrólisis por microorganismos ruminales incrementó el doble en comparación con el rendimiento por acción de microorganismos nativos.

El sistema de hidrólisis semicontinua de bagazo *A. tequilana* desarrollado fue estable por más de 200 días, en donde el TRH tuvo un efecto significativo en la productividad de AGV. Un TRH de 8 días obtuvo la mayor productividad de  $1692 \pm 185$  mg AGVT L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y un rendimiento de hidrólisis de  $18.8 \pm 1.5\%$ .

Una relación fracción líquida a lodo anaerobio (S/X) de 0.20 fue significativamente mejor en términos de PBM, aumentado 115% en relación con una S/X de 0.50.

En relación con la producción de metano, se obtuvo 10 veces más metano de la combinación de fracción sólida y líquida que únicamente metanizar la fracción líquida del hidrolizado obtenido del reactor semicontinuo. Al utilizar el pretratamiento con microorganismos ruminales, se logró incrementar 2.8 veces el rendimiento de metano del bagazo *A. tequila* en comparación del bagazo sin pretratar.

Se demostró el potencial del pretratamiento propuesto en un volumen mayor, ya que, a pesar de no tener condiciones controladas como la temperatura y la agitación, fue posible obtener un rendimiento de hidrólisis de 14% y un rendimiento de acidificación de 52%, lo que sugiere la posibilidad de escalamiento.

## 9. Bibliografía

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–685. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- Akobi, C., Yeo, H., Hafez, H., Nakhla, G., 2016. Single-stage and two-stage anaerobic digestion of extruded lignocellulosic biomass. *Appl. Energy* 184, 548–559. doi:10.1016/j.apenergy.2016.10.039
- Alcázar-Valle, E.M., 2016. Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y *salmiana*, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Ali, S.S., Sun, J., Abomohra, A.E.F., Ali, S.S., Abomohra, A.E.F., 2017. Effective bio-pretreatment of sawdust waste with a novel microbial consortium for enhanced biomethanation. *Bioresour. Technol.* 238, 425–432. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.187
- Amin, F.R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S. u, Zhang, R., Liu, G., Chen, C., 2017. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* 7, 72. doi:10.1186/s13568-017-0375-4
- Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 117–129.
- APHA, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. American Public Health Association, Washington, 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. Hydrogen Energy* 1, 897–904. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.11.016
- Baba, Y., Matsuki, Y., Mori, Y., Suyama, Y., Tada, C., Fukuda, Y., Saito, M., Nakai, Y., 2017. Pretreatment of lignocellulosic biomass by cattle rumen fluid for methane production: Bacterial flora and enzyme activity analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 489–496. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.11.008
- Barnes, S.P., Keller, J., 2004. Anaerobic rumen SBR for degradation of cellulosic material. *Water Sci. Technol.* 50, 305–311.
- Barragán-Trinidad, M., 2018. Hidrólisis de biomásas celulósicas empleando fluido ruminal para la generación de hidrógeno y metano.



- 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. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.117
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 91–106. doi:10.1016/j.rser.2014.04.047
- Bledzki, A.K., Gassan, J., 1999. Composites reinforced with cellulose based fibers. *Prog. Polym. Sci.* 24, 221–274.
- Bozell, J.J., Moens, L., Elliott, D.C., Wang, Y., Neuenschwander, G.G., Fitzpatrick, S.W., Bilski, R.J., Jarnefeld, J.L., 2000. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Resour. Conserv. Recycl.* 28, 227–239. doi:10.1016/S0921-3449(99)00047-6
- Bruni, E., Jensen, A.P., Angelidaki, I., 2010. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresour. Technol.* 101, 8713–8717. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.108
- Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S.W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R., Bridgwater, A. V., 2017. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76, 309–322.
- Cao, G.L., Ren, N.Q., Wang, A.J., Guo, W.Q., Xu, J.F., Liu, B.F., 2010. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 13475–13480. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.11.127
- 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. doi:10.1016/j.algal.2016.07.004
- de Souza, W.R., 2013. Microbial degradation of lignocellulosic biomass. *Sustain. Degrad. Lignocellul. Biomass - Tech. Appl. Commer.* 207–248. doi:10.5772/54325
- Demirel, B., Yenigün, O., 2002. Two-phase anaerobic digestion processes: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 743–755. doi:10.1002/jctb.630
- Divya, D., Gopinath, L.R., Christy, P.M., 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 690–699.

doi:10.1016/j.rser.2014.10.055

- Doherty, W.O.S., Mousavioun, P., Fellows, C.M., 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.* 33, 259–276. doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.022
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 114, 443–449. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.091
- Galindo-Hernández, K.L., Tapia-Rodríguez, A., Alatríste-Mondragón, F., Celis, L.B., Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., 2018. Enhancing saccharification of Agave tequilana bagasse by oxidative delignification and enzymatic synergism for the production of hydrogen and methane. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 22116–22125. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.10.071
- Gijzen, H.J., Schoenmakers, T.J.M., Caerteling, C.G.M., Vogels, G.D., 1988. Anaerobic degradation of papermill sludge in a two-phase digester containing rumen microorganisms and colonized polyurethane foam. *Biotechnol. Lett.* 10, 61–66. doi:10.1007/BF01030025
- Guarnizo-Franco, A., Martínez-Yepez, P.N., Sánchez-Valencia, H.A., 2009. Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación . biomass and cellulose pretreatments for saccharification. *Sci. Tech.* 15, 284–289.
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buf, P., Carballa, M., Wilde, V. De, Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J., Laclos, H.F. De, Ghasimi, S.M., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Horvath, I.S., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Pfund, F.R., Strömberg, S., Torrijos, M., Hack, G., Andrade, D., Bougrier, C., Koch, K., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Sci. Technol.* 2515–2522. doi:10.2166/wst.2016.336
- Hu, F., Ragauskas, A., 2012. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Res.* 5, 1043–1066. doi:10.1007/s12155-012-9208-0
- Hu, Z.H., Yu, H.Q., 2005. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochem.* 40, 2371–2377. doi:10.1016/j.procbio.2004.09.021

- IDAE, 2007. *Biomasa: Digestores anaerobios*. Madrid.
- Kadimaliev, D.A., Revin, V. V., Atykyan, N.A., Samuilov, V.D., 2003. Effect of Wood Modification on Lignin Consumption and Synthesis of Lignolytic Enzymes by the Fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 488–492. doi:10.1023/A:1025448703138
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z.J., Ishii, M., Igarashi, Y., 2005. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7099–7106. doi:10.1128/AEM.71.11.7099-7106.2005
- Koeck, D.E., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Albersmeier, A., Zverlov, V. V., Liebl, W., Pühler, A., Schwarz, W.H., Schlüter, A., 2014. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *J. Biotechnol.* 188, 136–137. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.08.024
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., Mcsweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 663–693. doi:10.1016/S0168-6445(03)00072-X
- 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. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.084
- Li, F., Zhang, P., Zhang, G., Tang, X., Wang, S., Jin, S., 2017. Enhancement of corn stover hydrolysis with rumen fluid pretreatment at different solid contents: Effect, structural changes and enzymes participation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* doi:10.1016/j.ibiod.2016.10.038
- Martínez-Gutiérrez, G.A., Íñiguez-Covarrubias, G., Ortiz-Hernández, Y.D., López-Cruz, J. yolanda, Bautista-Cruz, M.A., 2013. Tiempo de apilado del bagazo del maguey mezcalero y su efecto en las propiedades del compost para sustrato de tomate. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 29, 209–216.
- Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R., Guwy, A., Shipley, G., 2015. Utilising biohydrogen to increase methane production, energy yields and process efficiency via two stage anaerobic digestion of grass. *Bioresour. Technol.* 189, 379–383. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.116
- McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99–109.
- Meng, Y., Jost, C., Mumme, J., Wang, K., Linke, B., 2016. An analysis of single and two stage,

- mesophilic and thermophilic high rate systems for anaerobic digestion of corn stalk. *Chem. Eng. J.* 288, 79–86. doi:10.1016/j.cej.2015.11.072
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. doi:10.1021/ac60147a030
- Min, B.C., Bhayani, B. V., Jampana, V.S., Ramarao, B. V., 2015. Enhancement of the enzymatic hydrolysis of fines from recycled paper mill waste rejects. *Bioresour. Bioprocess.* 2. doi:10.1186/s40643-015-0068-2
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M., 2001. Invited Review : Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *J. Dairy Sci.* 84, 1294–1309. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2
- Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S.S., Thatoi, H., 2017. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 78, 1007–1032. doi:10.1016/j.rser.2017.05.026
- 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. doi:10.1128/AEM.00827-14
- Mustafa, A.M., Poulsen, T.G., Xia, Y., Sheng, K., 2017. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 224, 174–182. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.028
- O’Sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207. doi:Chemistry and Materials Science
- Orozco, A.M., Nizami, A.S., Murphy, J.D., Groom, E., 2013. Optimizing the thermophilic hydrolysis of grass silage in a two-phase anaerobic digestion system. *Bioresour. Technol.* 143, 117–125. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.118
- Parawira, W., Murto, M., Read, J.S., Mattiasson, B., 2005. Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochem.* 40, 2945–2952. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.010
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment. *Water Sci. Technol.* 24, 35–59.

- Pavlostathis, S.G., Miller, T.L., Wolin, M.J., 1988. Kinetics of Insoluble Cellulose Fermentation by Continuous Cultures of *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2660–2663.
- Pérez-Pimienta, J.A., López-Ortega, M.G., Sánchez, A., 2017. Recent developments in Agave performance. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 11, 732–748. doi:10.1002/bbb.1776; *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 11:732–748 (2017)
- 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. Hydrogen Energy* 40, 151–160. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.10.050
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int. Microbiol.* 5, 53–63. doi:10.1007/s10123-002-0062-3
- Piegza, M., Witkowska, D., Stempniewicz, R., 2014. Enzymatic and molecular characteristics of *Geotrichum candidum* strains as a starter culture for malting. *J. Inst. Brew.* 341–346. doi:10.1002/jib.167
- Puniya, A.K., Singh, R., Kamra, D.N., 2015. Rumen microbiology: From evolution to revolution. *Rumen Microbiol. From Evol. to Revolut.* 1–379. doi:10.1007/978-81-322-2401-3
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, P.G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P., Marita, J., Hatfield, R., Ralph, S., Christensen, J., Boerjan, W., 2004. Lignins: Natural polymer from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* 3, 29–60. doi:10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4
- Salcedo-M., J.G., López-Galán, J.E., Flórez-Pardo, L.M., 2011. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna* 182–190.
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–5295. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A.J., Martínez-Pacheco, M.M., Sosa-Aguirre, C.R., Campos-García, 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. doi:10.1007/s10295-010-0853-z
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315

- Schroyen, M., Vervaeren, H., Van Hulle, S.W.H., Raes, K., 2014. Impact of enzymatic pretreatment on corn stover degradation and biogas production. *Bioresour. Technol.* 173, 59–66. doi:10.1016/j.biortech.2014.09.030
- Schroyen, M., Vervaeren, H., Vandepitte, H., Van Hulle, S.W.H., Raes, K., 2015. Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. *Bioresour. Technol.* 192, 696–702. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.051
- SENER, 2016. *Prospectiva de Energías Renovables 2016-2030*, Diario Oficial de la Federación. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sexton, S.E., Zilberman, D., 2008. *Biofuel impacts on climate change, the environment and food*. University of California, Berkeley.
- Siegert, I., Banks, C., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* 40, 3412–3418. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.025
- Stamatelatou, K., Antonopoulou, G., Michailides, P., 2014. Biomethane and biohydrogen production via anaerobic digestion/fermentation, *Advances in Biorefineries*. doi:10.1533/9780857097385.2.476
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7
- 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. doi:10.3390/ijms9091621
- Takizawa, S., Baba, Y., Tada, C., Fukuda, Y., Nakai, Y., 2018. Pretreatment with rumen fluid improves methane production in the anaerobic digestion of paper sludge. *Waste Manag.* 78, 379–384. doi:10.1016/j.wasman.2018.05.046
- Tobergte, D.R., Curtis, S., 2009. Biological Treatment Process, *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Triolo, J.M., Sommer, S.G., Møller, H.B., Weisbjerg, M.R., Jiang, X.Y., 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour. Technol.* 102, 9395–9402. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.026

- Xu, F., Wang, Z.W., Li, Y., 2014. Predicting the methane yield of lignocellulosic biomass in mesophilic solid-state anaerobic digestion based on feedstock characteristics and process parameters. *Bioresour. Technol.* 173, 168–176. doi:10.1016/j.biortech.2014.09.090
- Yuan, X., Cao, Y., Li, J., Wen, B., Zhu, W., Wang, X., Cui, Z., 2012. Effect of pretreatment by a microbial consortium on methane production of waste paper and cardboard. *Bioresour. Technol.* 118, 281–288. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.058
- 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. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 113, 9–16. doi:10.1016/j.ibiod.2016.03.022
- Zhang, Q., He, J., Tian, M., Mao, Z., Tang, L., Zhang, J., Zhang, H., 2011. Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 102, 8899–8906. doi:10.1016/j.biortech.2011.06.061
- 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. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.120
- Zhao, J., Zheng, Y., Li, Y., 2014. Fungal pretreatment of yard trimmings for enhancement of methane yield from solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 156, 176–181. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.011
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog. Energy Combust. Sci.* 42, 35–53. doi:10.1016/j.peccs.2014.01.001
- Zhou, S., Zhang, Y., Dong, Y., 2012. Pretreatment for biogas production by anaerobic fermentation of mixed corn stover and cow dung. *Energy* 46, 644–648. doi:10.1016/j.energy.2012.07.017
- Ziemiński, K., Romanowska, I., Kowalska, M., 2012. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste Manag.* 32, 1131–1137. doi:10.1016/j.wasman.2012.01.016