



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE  
BAGAZO DE AGAVE EN UN REACTOR UASB

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

PRESENTA:  
SHARON ISABEL COBOS VALDEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ- INSTITUTO DE INGENIERÍA  
COMITÉ TUTORAL  
DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ- INSTITUTO DE INGENIERÍA  
DR. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA- INSTITUTO MEXICANO DE  
TECNOLOGÍA DEL AGUA

Juriquilla, Querétaro, Agosto 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: Dr. Oscar González Barceló  
Secretario: Dra. Idania Valdez Vazquez  
Vocal: Dra. Bibiana Cercado Quezada  
1 er. Suplente: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga  
2 do. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

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

**TUTOR DE TESIS:**

Dr. Germán Buitrón Méndez

-----  
**FIRMA**

## **Agradecimientos:**

Se agradece el apoyo del Fondo de Sustentabilidad Energética SENER – CONACYT a través del proyecto 247006 Clúster de Biocombustibles gaseosos.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM y el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Agua, UNAM Campus Juriquilla, por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones e inmobiliario.

A la Ing. Cristina Araóz y Lic. Lucila Correa por su disponibilidad y amabilidad para el seguimiento de los trámites administrativos durante todo el posgrado.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez por su dirección durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Karla María Muñoz Páez, Dr. René Cardeña Dávila, M. C. Gloria Moreno Rodríguez, M. C. Jaime Pérez Treviña por su apoyo técnico, científico y moral durante mi trayecto en el LIPATA.

## **Dedicatoria**

A mi Dios quien me recuerda todos los días que somos parte de una creación perfecta, que somos capaces de hacer cualquier cosa con un poco de amor, pasión, emoción y constancia.

A mis padres Carmen y Felipe, quienes siempre están al pie del cañón, por amarme incondicionalmente, brindarme su apoyo y cariño en cada paso de mi vida.

A mis hermanos Octavio y Ricardo, las personas en las que siempre podre confiar, abrazar y recibir consejos y orientación en todo momento. Tienen una hermosa luz en su interior que espero guie su camino a la felicidad.

A mi novio Alberto, por acompañarme en esta travesía. Por ser paciente, comprensivo, cariñoso y por enseñarme que todo se puede solucionar con creatividad.

A mis primos, tíos, sobrinos, abuelos, todas sus enseñanzas e historias las llevo en el corazón.

A Ale quien se volvió poco a poco en mi mejor amiga. La que me motivaba a no rendirme y a seguir luchando a pesar de la desilusión, quien me hacía fuerte cuando creía que no podía más, quien me daba valor para superar las adversidades donde quiera que aparecieran. A quien admiro por su enorme fuerza interior, lealtad y franqueza. Personas como tu hacen al mundo más hermoso.

A quienes se convirtieron en mi segunda familia, a mis amigos y compañeros durante maestría, Johnny, Julián D., Julián, Mauricio, Yeinner, Yara, Daya, Adán, Rocher, Lau, Dr. Gama, Karina, Sharon, Luz, Marce, Cinthia, Diego, Martha, Edith, Oscar, Ulises, René, Karla, sin ustedes nada hubiera sido igual.

A mis amiguis de toda la vida, Zeyda, Itzel y Antelmo por más lejos y más tiempo que pase, ustedes serán mis personas favoritas.

Por último y no por eso menos importante a mi hermosa kimi bebé, la que siempre me recibe feliz al llegar a casa, brincando, mordiendo y moviendo su colita. Su naturaleza le otorga la capacidad de ser inocente eternamente, creer en los demás y perdonar. Algo como ella no se encuentra en cualquier lado.

Todo el amor que he recibido en mi vida me ha impulsado para llegar hasta aquí y ser quien soy ahora.

# Contenido

## RESUMEN

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	OBJETIVOS .....	2
2.1	2.1 Objetivo.....	2
2.2	2.2 Objetivos específicos.....	2
3.	MARCO TEÓRICO.....	3
3.1	EL AGAVE Y LA INDUSTRIA TEQUILERA EN MÉXICO .....	3
3.2	BAGAZO DE AGAVE, RESIDUO DE LA INDUSTRIA TEQUILERA .....	3
3.3	MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	4
3.3.1	Celulosa.....	4
3.3.2	Hemicelulosa.....	4
3.3.3	Lignina .....	4
3.4	PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS .....	5
3.4.1	Físicos .....	5
3.4.2	Biológicos .....	5
3.4.3	Químicos .....	5
3.5	HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL BAGAZO DE <i>Agave Tequilana Weber Azul</i> .....	7
3.6	INHIBIDORES PROCEDENTES DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	8
3.6.1	Ácidos débiles .....	8
3.6.2	Compuestos fenólicos .....	9
3.6.3	Derivados de furanos.....	9
3.7	DESTOXIFICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS CON CARBÓN ACTIVADO	10
3.8	FERMENTACIÓN OSCURA .....	12
3.9	TIPOS DE REACTORES .....	13
3.10	FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.....	14
3.10.1	pH.....	14
3.10.2	Tiempo de retención hidráulica.....	14
3.10.3	Carga orgánica.....	14
3.10.4	Lodos granulares anaerobios .....	17
4.	METODOLOGÍA .....	18
4.1	ETAPA 1 .....	19

4.1.1	Obtención y caracterización del hidrolizado ácido .....	19
4.1.2	Destoxificación de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave .....	19
4.2	ETAPA 2.....	21
4.2.1	Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos sin y con destoxificación a distintas concentraciones.....	21
4.3	ETAPA 3.....	22
4.3.1	Operación de un reactor UASB en continuo con incrementos en las cargas orgánicas de hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados.....	22
5.	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	23
5.1	HIDROLISIS ÁCIDA DEL BAGAZO DE AGAVE .....	23
5.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS DEL BAGAZO DE AGAVE .....	23
5.2.1	Concentración de azúcares, furfurales y ácidos orgánicos .....	23
5.3	DESTOXIFICACIÓN DEL HIDROLIZADO.....	24
5.4	PRETRATAMIENTO TÉRMICO AL LODO .....	24
5.5	MEDICIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BIOGÁS.....	24
5.6	SECUENCIACIÓN DEL ADN TOTAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS .....	24
5.7	MODELO DE GOMPERTZ.....	25
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1	OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS DE BAGAZO DE AGAVE .....	26
6.2	DESTOXIFICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS CON CARBÓN ACTIVADO.....	27
6.3	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN LOTE A PARTIR DE HIDROLIZADOS ÁCIDOS SIN Y CON DESTOXIFICACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES .....	30
6.4	REACTOR UASB A DISTINTAS CARGAS ORGÁNICAS.....	35
6.4.1	Integridad de los gránulos .....	40
6.4.2	Comunidad microbiana .....	41
7.	CONCLUSIONES .....	44
7.1	ANEXO 1. Análisis estadísticos .....	46
7.2	ANEXO 1.2.....	48
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

## Índice de tablas

<b>Tabla 3.1</b> Composición química del bagazo de agave .....	4
<b>Tabla 3.2</b> Caracterización de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave. ....	7
<b>Tabla 3.3</b> Condiciones para la destoxificación de los hidrolizados ácidos con carbón activado y porcentajes de remoción.....	11
<b>Tabla 3.4</b> Productividad y rendimientos a diferentes cargas orgánicas.....	16
<b>Tabla 4.1</b> Métodos para caracterizar el bagazo de agave. ....	19
<b>Tabla 4.2</b> Estrategia experimental para la evaluación del efecto de la temperatura en la destoxificación de hidrolizados ácidos.....	20
<b>Tabla 4.3</b> Variaciones en el tiempo de contacto y en la cantidad de carbón activado para la destoxificación de los hidrolizados ácidos. ....	20
<b>Tabla 4.4</b> Experimento con distintas concentraciones de hidrolizado ácido de bagazo de agave....	21
<b>Tabla 6.1</b> Comparación de la composición de hidrolizados ácidos de bagazo de agave obtenidos a distintas condiciones. ....	26
<b>Tabla 6.2</b> Remoción de inhibidores a diferentes temperaturas de destoxificación con una concentración de 0.5 % (p/v) y un tiempo de contacto de 0.5 h.....	27
<b>Tabla 6.3</b> Remociones de furfural e HMF con distintas concentraciones de carbón activado y tiempos de reacción a 25 °C. ....	28
<b>Tabla 6.4</b> Comparación entre remociones de los inhibidores con carbón activado.....	29
<b>Tabla 6.5</b> Comparación entre los rendimientos de hidrógeno a partir de materiales lignocelulósicos. ....	34
<b>Tabla 6.6</b> Operación de reactores en continuo usando como sustrato hidrolizados de material lignocelulósico. ....	39
<b>Tabla 6.7</b> Comparación del tamaño de gránulos productores de H <sub>2</sub> .....	41
<b>Tabla 6.8</b> Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de materiales lignocelulósicos.	43
<b>Tabla 7.1</b> Pruebas estadística ANOVA para evaluar el efecto de la dilución y destoxificación sobre los rendimientos (p>0.05).....	46
<b>Tabla 7.2</b> Prueba estadística de Tukey para evaluar el efecto de la dilución y destoxificación sobre los rendimientos (p>0.05).....	46
<b>Tabla 7.3</b> Prueba estadística ANOVA para evaluar los efectos de dilución y destoxificación sobre la producción máxima (p>0.05).....	46
<b>Tabla 7.4</b> Prueba estadística de Tukey para evaluar el efecto de la dilución y destoxificación sobre la producción máxima (p>0.05).....	47
<b>Tabla 7.5</b> Prueba estadística ANOVA para evaluar los efectos de dilución y destoxificación sobre la velocidad de producción (p>0.05).....	47
<b>Tabla 7.6</b> Prueba estadística Tukey para evaluar los efectos de dilución y destoxificación sobre la velocidad de producción (p>0.05).....	47
<b>Tabla 7.7</b> Prueba ANOVA para evaluar los rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L (p>0.05).....	48

<b>Tabla 7.8</b> Prueba TUCKEY para evaluar los rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L (p>0.05).....	48
<b>Tabla 7.9</b> Prueba ANOVA para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L (p>0.05).....	48
<b>Tabla 7.10</b> Prueba TUCKEY para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L (p>0.05).....	48
<b>Tabla 7.11</b> Prueba ANOVA para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L (p>0.05).....	49
<b>Tabla 7.12</b> Prueba TUCKEY para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L (p>0.05).....	49
<b>Tabla 7.13</b> Prueba ANOVA para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L (p>0.05).....	49
<b>Tabla 7.14</b> Prueba TUCKEY para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L (p>0.05).....	49
<b>Tabla 7.15</b> Prueba ANOVA para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L (p>0.05).....	50
<b>Tabla 7.16</b> Prueba TUCKEY para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L (p>0.05).....	50
<b>Tabla 7.17</b> Prueba ANOVA para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L (p>0.05).....	50
<b>Tabla 7.18</b> Prueba TUCKEY para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L (p>0.05).....	50

## Índice de figuras

<b>Figura 3.1</b> Azúcares e inhibidores generados en la hidrólisis ácida (Palmqvist et al., 2000).....	8
<b>Figura 3.2</b> Esquema de un reactor UASB.....	13
<b>Figura 3.3</b> Ciclo de partículas en la formación de gránulos (Verawaty et al., 2013).....	17
<b>Figura 4.1</b> Metodología experimental.....	18
<b>Figura 4.2</b> Equipo AMPTS II.....	21
<b>Figura 4.3</b> Reactor UASB. A) Esquema del funcionamiento del reactor. B) Fotografía.....	22

<b>Figura 6.1</b> Remoción de compuestos durante la destoxificación a distintas condiciones de la tabla 6.2.....	28
<b>Figura 6.2</b> Remoción de los inhibidores y carbohidratos durante la destoxificación a 25 °C bajo las condiciones de la tabla 6.3.....	29
<b>Figura 6.3</b> Resultados de la producción de hidrógeno con diferentes concentraciones de hidrolizados ácidos de bagazo de agave. A) Rendimientos. B) velocidad de producción de H <sub>2</sub> .....	30
<b>Figura 6.4</b> Metabolitos generados por el control (glucosa) y el hidrolizado ácido a distintas concentraciones .....	31
<b>Figura 6.5</b> Comparación entre los tratamientos de destoxificación. A) Rendimientos, B) Velocidad de producción.....	32
<b>Figura 6.6</b> Metabolitos generados durante la fermentación oscura en lote de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados distintas concentraciones.....	33
<b>Figura 6.7</b> Operación del reactor UASB a distintas cargas orgánicas de hidrolizados ácidos destoxificados.....	38
<b>Figura 6.8</b> Balance de materia durante la operación del reactor UASB a distintas cargas orgánicas.....	38
<b>Figura 6.9</b> Gránulos durante la operación del reactor UASB: A) 9.5 g carbohidratos/L-d. B) 13 g carbohidratos/L-d. C) 20 g carbohidratos/L-d.....	40
<b>Figura 6.10</b> Comunidad microbiana durante la operación del reactor UASB.....	42

## Resumen

Los materiales lignocelulósicos son ricos en carbohidratos por lo que pueden ser utilizados para producir hidrógeno mediante fermentación oscura. Para ello, se aplican diversos pretratamientos que liberan azúcares para su posterior fermentación. Sin embargo, también se generan compuestos inhibitorios como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), compuestos fenólicos y ácido acético. La destoxificación se define como un procedimiento para reducir la concentración de compuestos inhibidores de la fermentación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados en reactores en lote y continuo.

Primero, se evaluó el efecto de la temperatura (25, 30 y 50 °C) sobre la destoxificación de los hidrolizados. Se encontró que la menor temperatura removi6 más furfural (83%) mientras que la mayor temperatura removi6 más ácido acético (71%). Después se evaluó el efecto de la concentración de carb6n activado (0.5, 1.0, 2.5, y 5.0% p/v) y el tiempo (0.5 y 1.0 h) sobre la destoxificación a 25 °C. El aumento de la concentración de carb6n activado y el tiempo logró una remoci6n del 100% de furfurales. Al comparar el rendimiento de hidrógeno a partir de hidrolizados destoxificados, se encontró que la remoci6n de ácido acético mejor6 el rendimiento en hidrógeno en un 25%, por lo contrario la remoci6n de furfurales redujo los rendimientos en un 17%, comparados con hidrolizados sin destoxificar.

Después, se evaluó la producci6n de hidrógeno a partir de hidrolizados destoxificados un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) alimentado con tres cargas orgánicas (9.5, 13.0 y 20.0 g carbohidratos/L-d). La mayor productividad (71 mL H<sub>2</sub>/L-d) y rendimiento de hidrógeno (0.04 mol H<sub>2</sub>/mol de carbohidrato) se obtuvieron a la carga orgánica media. Estos valores son menores a los reportados con hidrolizados ácidos sin destoxificar.

## Abstract

Lignocellulosic materials are rich in carbohydrates so they can be used to produce hydrogen by dark fermentation. For this, various pretreatments that release sugars are applied for later fermentation. However, inhibitory compounds such as furfural, hydroxymethylfurfural (HMF), phenolic compounds and acetic acid are also generated. Detoxification is defined as a procedure to reduce the concentration of fermentation inhibitor compounds. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production of hydrogen from detoxified agave bagasse acid hydrolysates in batch and continuous reactors.

First, the effect of temperature (25, 30 and 50 ° C) on the detoxification of hydrolysates was evaluated. It was found that the lower temperature removed more furfural (83%) while the higher temperature removed more acetic acid (71%). Then the effect of activated carbon concentration (0.5, 1.0, 2.5, and 5.0% w / v) and time (0.5 and 1.0 h) on detoxification at 25 ° C were evaluated. The increase in the concentration of activated carbon and time achieved a 100% removal of furfurals. When comparing the hydrogen yield from detoxified hydrolysates, it was found that acetic acid removal improved the hydrogen yield by 25%, on the contrary the removal of furfurals reduced yields by 17%, compared to non-detoxified hydrolysates.

Then, the production of hydrogen from detoxified hydrolysates was evaluated by an anaerobic upflow reactor (UASB) fed with three organic fillers (9.5, 13.0 and 20.0 g carbohydrates / L-d). The highest productivity (71 mL H<sub>2</sub> / L-d) and hydrogen yield (0.04 mol H<sub>2</sub> / mol carbohydrate) were obtained at the average organic load. These values are lower than those reported with non-detoxified acid hydrolysates.

## 1. INTRODUCCIÓN

El tequila es la bebida nacional que representa a México en el mundo, en su proceso de producción se generan residuos sólidos después de la extracción de los azúcares de la piña del agave para su fermentación y destilación; este subproducto se denomina bagazo de agave. Debido a sus grandes volúmenes de generación (226 millones de toneladas anuales) y su composición (celulosa, hemicelulosa y lignina) es un material con el potencial de ser considerado una fuente para la producción de biocombustibles (CRT, 2017; Valdez- Vazquez *et al.*, 2010).

Para extraer los azúcares que se encuentran en las fibras es necesario someter al bagazo de agave a un pretratamiento hidrolítico, posteriormente la fase acuosa rica en carbohidratos dirigirla a un proceso de fermentación y así generar hidrógeno ( $H_2$ ). La hidrólisis ácida es uno de los pretratamientos más usados en la industria debido a su bajo costo y alta producción de carbohidratos, sin embargo en este proceso también se generan compuestos tóxicos para los microorganismos productores de  $H_2$ , por lo tanto es necesaria la aplicación de un tratamiento de destoxificación para reducir el contenido de los inhibidores y aprovechar los carbohidratos.

Este trabajo se dividió en tres etapas: la primera fue la producción de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave y la destoxificación con carbón activado, en la segunda etapa se evaluó la producción de hidrógeno en lote a partir de los hidrolizados sin y con un tratamiento de destoxificación a dos condiciones distintas, para seleccionar al tratamiento de destoxificación que permitiera incrementar la producción de hidrógeno para proseguir a operar un reactor UASB a tres cargas orgánicas distintas con hidrolizados ácidos destoxificados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 2.1 Objetivo**

Evaluar la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados en reactores en lote y continuo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la temperatura, concentración de carbón activado, y tiempo sobre la destoxificación de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave.
- Evaluar el potencial de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave con y sin tratamiento de destoxificación con carbón activado.
- Determinar el efecto de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados ácidos de agave destoxificados en un reactor UASB.
- Caracterizar la comunidad microbiana resultado de la evaluación de diferentes cargas orgánicas en el reactor UASB para producción de hidrógeno.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 EL AGAVE Y LA INDUSTRIA TEQUILERA EN MÉXICO

El tequila es una bebida alcohólica mexicana de consumo mundial que se obtiene de la fermentación y destilación del *Agave tequilana Weber*, esta especie también tiene aplicaciones medicinales y endulcolorantes (Ahumada- Santos *et al.*, 2013; Montañez *et al.*, 2011; Santos-Zea *et al.*, 2016). La NOM-006-SCFI-2012, Especificaciones de bebidas alcohólicas-Tequila, clasifica al tequila en “Tequila 100%” al proveniente de *Agave Tequilana Weber Azul* y “Tequila” al elaborado a partir de la mezcla del 51 % *Agave tequilana Weber azul* y el 49% de diferentes fuentes naturales de azúcar.

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en 2017 reportó una producción nacional de agave de 1.4 millones de toneladas de las cuales el 71% fueron cultivadas por el estado de Jalisco, siendo Arandas y Guadalajara los principales productores, seguidos por los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Zacatecas.

La elaboración del tequila consiste en la cocción del tallo junto con una pequeña parte de las pencas que continúan unidas al corazón del agave, estas son sometidas a un tratamiento térmico con temperaturas mayores a 100 °C para transformar los almidones que posee la planta en azúcares más disponibles (fructuosa y pentosa), posteriormente los tallos son macerados para extraer los jugos de las fibras del agave. Después, el mosto dulce es sometido a un proceso de fermentación para convertir los azúcares en alcohol (Flores-Sahagun *et al.*, 2013; Núñez *et al.*, 2011; Villanueva-Rodríguez *et al.*, 2015). El remanente sólido de las fibras es considerado bagazo (Sivagurunathan *et al.*, 2017).

#### 3.2 BAGAZO DE AGAVE, RESIDUO DE LA INDUSTRIA TEQUILERA

El Consejo Regulador del Tequila (CRT) reportó en el año 2017 una producción total de 271.4 millones de litros de tequila y para el 2018, 309.1 millones de litros. Se estima que por cada litro de tequila se generan 0.78 kg de bagazo de agave (Alonso *et al.*, 1997), por lo que la producción de bagazo de agave equivale aproximadamente a 226 mil toneladas anuales. Debido a los grandes volúmenes generados de este subproducto, su disposición final se vuelve problemática, haciendo necesaria su valorización (Alonso *et al.*, 1997).

Las fibras del bagazo de agave aún después de ser trituradas, almacenan grandes cantidades de azúcares (Tabla 3.1) en forma de celulosa (20-50%) y hemicelulosa (19%) (Arreola- Vargas, *et al.*, 2015; Núñez *et al.*, 2010; Sivagurunathan *et al.*, 2017). La disponibilidad del bagazo de agave y el gran volumen de producción le confiere las características necesarias para ser considerado como un material con potencial para producir biocombustibles (Arreola-Vargas *et al.*, 2015; Valdez- Vázquez *et al.*, 2010).

**Tabla 3.1.** Composición química del bagazo de agave

<b>Tipo de Bagazo</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Agave tequilana Weber</i>	43	19	15	Alonso et al. (1997)
<i>Agave tequilana</i> (Cocido)	11	31	11	Arreola-Vargas et al. (2015)
<i>Agave tequilana</i> (Sin cocer)	20	42	15	
<i>Agave tequilana Weber</i>	43	19	15	Hernández-Salas et al. (2009)
<i>Agave tequilana</i>	50	19	15	Núñez et al. (2011)

### 3.3 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

El bagazo de agave, es clasificado como material lignocelulósico debido a que está compuesto de celulosa, hemicelulosa y lignina, y como tal requiere la aplicación de un pretratamiento hidrolítico para desintegrar las macromoléculas y derivarlas en monómeros para que estos sean más fáciles de asimilar por los microorganismos productores de hidrógeno (Arreola-Vargas *et al.*, 2016).

#### 3.3.1 Celulosa

La celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ ) es el material orgánico más abundante en la tierra, se genera por la deshidratación y condensación de la glucosa durante la fotosíntesis. Está compuesta de cadenas lineales de D-glucosa (2,000 a 20,000 unidades de glucosa) unidas por enlaces  $\beta$ - (1,4) glucosídicos (Galbe, *et al.* 2012; Li *et al.*, 2010) y es la encargada de aportar resistencia a la estructura de la pared celular (Yoon *et al.*, 2014). Es un polímero hidrofóbico debido a las uniones de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals entre las cadenas (Chen *et al.*, 2017), además de ser resistente a la hidrólisis enzimática es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos (Galbe, *et al.* 2012). La constitución especializada de este compuesto aporta resistencia al agave de los ataques biológicos y químicos del entorno (Zheng *et al.*, 2014).

#### 3.3.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa ( $C_5H_8O_4$ ) es el segundo biopolímero más abundante en el reino vegetal (Ren *et al.*, 2010), consiste en una cadena corta y ramificada de diferentes polisacáridos, principalmente por pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (manosa, galactosa y glucosa), ácidos (acético, glucorónico, metil glucorónico y galacturónico) (Zheng *et al.*, 2014) también forma enlaces de hidrógeno con la celulosa y enlaces covalentes con la lignina (Galbe *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2014).

#### 3.3.3 Lignina

La lignina es un polímero aromático que contribuye con el soporte estructural de la planta, al vincularse con la celulosa dentro de la pared celular, aporta rigidez a las fibras vegetales y protege a los polisacáridos (Cuervo *et al.*, 2009; Rowell 2012). Con la remoción de la lignina se incrementa la superficie de contacto para la degradación de la celulosa (Taherzadeh *et al.*, 2008). La lignina está compuesta por guaiacil (35-49%), siringilo (40-61%) e hidroxicinamatos (4-15%), enlaces éter mantienen a estos monómeros fenólicos unidos (Grabber *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2009) y además es una barrera protectora que resiste los ataques biológicos y previene la destrucción de la planta (Behera *et al.*, 2014).

### 3.4 PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Existen pretratamientos que tienen como objetivo principal remover la lignina del material lignocelulósico para tener acceso a los compuestos ricos en azúcares, aumentando así el área de contacto del agente hidrolítico con el sustrato e incrementando la disponibilidad de monosacáridos fermentables (Behera *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2009). Para el aprovechamiento de los azúcares retenidos en las fibras es necesaria la aplicación de un pretratamiento hidrolítico, este depende de las características fisicoquímicas del sustrato y cada uno afecta de manera distinta el proceso de recuperación de azúcares y la formación de inhibidores (Badiei *et al.*, 2014).

Este paso podría ser el más importante en el proceso de producción de biohidrógeno a partir de residuos lignocelulósicos, ya que los compuestos que se forman serán utilizados como sustrato para los microorganismos encargados de transformarlos en biogás (Chen *et al.*, 2009; Galbe *et al.*, 2012).

#### 3.4.1 Físicos

Los pretratamientos físicos tienen el objetivo de disminuir el tamaño de partícula al reducirla a polvo (10 a 0.2 mm), disminuir la cristalinidad y los grados de polimerización de la celulosa (Harum *et al.*, 2011), aumentando así la disponibilidad del sustrato para la hidrólisis (Paudel *et al.*, 2017). Un ejemplo de los pretratamientos físicos es la molienda, 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 (Amin *et al.*, 2017; Taherzadeh y Karimi, 2008). Este pretratamiento tiene la ventaja de reducir la formación de subproductos pero aumenta el consumo de energía en el proceso de producción de H<sub>2</sub> (Seidl *et al.*, 2016).

#### 3.4.2 Biológicos

Los pretratamientos biológicos, son aquellos en los cuales se utilizan microorganismos, principalmente hongos, que son capaces de producir enzimas para degradar la lignina y hemicelulosa (Behera *et al.*, 2014; Yee *et al.*, 2018). Este pretratamiento no genera compuestos tóxicos pero requiere un largo tiempo de incubación y condiciones controladas, además, la presencia de los enlaces éter y C-C de la lignina hace más difícil su degradación por este método (Shrestha *et al.*, 2017).

Las enzimas involucradas con la degradación de la celulosa son la Endoglucanasa, Exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, cuya función es romper los enlaces glucosídicos; las encargadas de degradar la hemicelulosa son la Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, Endo-1,4- $\beta$ -D-mananasas y 1,4- $\beta$ -D-xilosidasas que actúan hidrolizando a los oligosacáridos, la Lignina peroxidasa y la Lacasa degradan unidades de lignina no fenólicas y fenólicas, respectivamente (Shrestha *et al.*, 2017).

#### 3.4.3 Químicos

Mediante la hidrólisis química son degradadas la lignina, hemicelulosa y la celulosa. Sin embargo, se generan compuestos inhibidores en forma de ácidos débiles, furanos y fenoles los cuales tienen efectos negativos en el crecimiento de las células (Behera *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2013; Cuervo *et al.*, 2009). No obstante, presentan la ventaja de ser los pretratamientos más atractivos y rentables por los bajos costos para la eliminación de lignina (Seidl *et al.*, 2016).

Los procesos químicos se clasifican en alcalinos y ácidos, estos dependen del tipo de compuesto ácido o básico, la concentración, la temperatura y tiempo de reacción (Arreola-Vargas *et al.*, 2015; Behera *et al.*, 2014). La aplicación de compuestos alcalinos como: hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amoníaco e hidróxido de amonio en las fibras lignocelulósicas causan hinchazón, eliminan el grupo acetilo en el material, incrementan la superficie de contacto, y separan

los enlaces estructurales entre la lignina y hemicelulosa (Behera *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2002). Las ventajas del método alcalino son la eliminación eficiente de la lignina, mayor producción de azúcares reductores y bajo costo. La desventaja de este proceso es la formación de sales que se acumulan o incorporan a la biomasa, estas sales no son digeridas e incrementa el tiempo de retención celular (Behera *et al.*, 2014; Seidl *et al.*, 2016).

La hidrólisis ácida depende de parámetros como el tipo del ácido, la concentración, relación sólido - líquido y temperatura (Behera *et al.*, 2014). Los ácidos más comunes para la hidrolizar son el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y clorhídrico (HCl), que son compuestos capaces de degradar a la celulosa (Ren *et al.*, 2009). Generalmente la glucosa y la xilosa son los monómeros resultantes de la hidrólisis ácida (Gomez-Tovar *et al.*, 2012).

### 3.5 HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL BAGAZO DE *Agave Tequilana Weber Azul*

La hidrólisis ácida es uno de los mejores pretratamientos para la obtención de carbohidratos a partir de material lignocelulósico, la concentración de los azúcares e inhibidores que se generan en este proceso dependen de las condiciones como temperatura, tiempo de reacción y concentración del ácido (Alvarado-Michi *et al.*, 2017; Saucedo-Luna *et al.*, 2011).

Autores como Arreola Vargas *et al.* (2016), Alvarado-Michi *et al.* (2017) y Valdez-Guzmán *et al.* (2019) han probado distintas condiciones para llevar a cabo la hidrólisis ácida de bagazo de agave y así generar la mayor cantidad de azúcares fermentables para la producción de biogás. Arreola Vargas *et al.* (2016) impregnaron el bagazo con ácido clorhídrico (HCl) al 2.7% (p/v) y lo sometió a 124 °C durante 1.3 h, Alvarado-Michi *et al.* (2017) con HCl al 1.4% (p/p) a 125 °C durante 2.1 h y Valdez-Guzmán *et al.* (2019) con HCl 1.9% (p/v) a 130 °C durante 2.2 h.

Arreola Vargas *et al.* (2016), Alvarado-Michi *et al.* (2017) obtuvieron concentraciones similares de carbohidratos, mayores a las de Valdez-Guzmán *et al.* (2019), sin embargo, el contenido de inhibidores es distinto. En la tabla 3.2 se observan las composiciones de los hidrolizados ácidos de estos trabajos.

**Tabla 3.2** Caracterización de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave.

Parámetro	Hidrolizados ácidos (HCl)		
	2.7 (p/v)% <sup>1</sup>	1.4 (p/p)% <sup>2</sup>	1.9 (p/v)% <sup>3</sup>
DQO (g/L)	30.2 ± 3.5	18.9 ± 0.3	23.1 ± 0.0
Azúcares <sub>totales</sub> (g/L)	17.3 ± 2.1	18.7 ± 0.3	13.6 ± 0.0
Azúcares <sub>solubles</sub> (g/L)	ND	ND	ND
Furfural (mg/L)	33.1 ± 9.1	37	ND
Hidroximetilfurfural (mg/L)	95.8 ± 21.9	27	ND
Fenoles (mg/L)	941.6 ± 125.7	10.3 ± 0.2	0.2 ± 0.0
Ácido acético (g/L)	7.7 ± 2.6	6.6	4.4 ± 0.2
Ácido fórmico (g/L)	2.2 ± 0.4	ND	0.4 ± 0.0

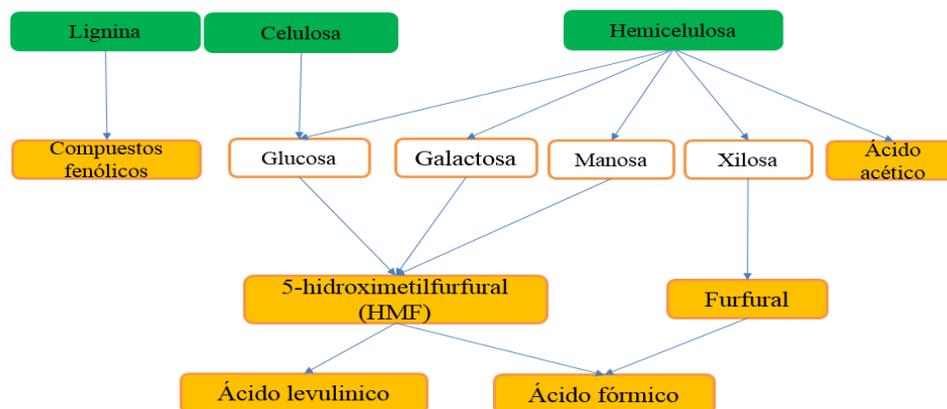
<sup>1</sup>Arreola-Vargas *et al.*, (2016); <sup>2</sup>Alvarado-Michi *et al.*, (2017); <sup>3</sup>Valdez-Guzmán *et al.* (2019)

En la tabla 3.2 se observa que bajo esas condiciones de hidrólisis, los inhibidores de interés como el furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y fenoles son generados en concentraciones menores a las reportadas como inhibitorias (Akobi *et al.*, 2016; Quéméneur *et al.*, 2012), aunque en conjunto podrían tener un efecto sinérgico negativo en los microorganismos encargados de producir hidrógeno (Quéméneur *et al.*, 2012).

Valdez –Guzmán *et al.* (2019) trabajaron con bagazo de agave Tequilana y utilizando una técnica de hidrólisis previamente optimizada para este tipo de bagazo (HCl 1.9%, 132 min y 130°C). No detectaron compuestos furánicos, la concentración de ácido acético y fenoles es menor a la de otros autores. Este puede ser considerado el mejor tratamiento de hidrólisis ya que genera menos inhibidores a lo reportado por la literatura.

### 3.6 INHIBIDORES PROCEDENTES DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA

Los inhibidores generados por la hidrólisis del bagazo de agave se dividen en tres grupos: ácidos débiles, furanos y compuestos fenólicos (Behera *et al.*, 2014) como se muestra en la figura 3.1. La presencia de estos compuestos en altas concentraciones inhibe el proceso de fermentación (Behera *et al.*, 2014; Palmqvist *et al.*, 2000), pero en bajas concentraciones podrían ser benéficas para el crecimiento celular (Palmqvist *et al.*, 2000; Roberto *et al.*, 1991) o para la producción de H<sub>2</sub> (Alvarado- Michi *et al.*, 2017).



**Figura 3.1** Azúcares e inhibidores generados en la hidrólisis ácida (Palmqvist *et al.*, 2000).

#### 3.6.1 Ácidos débiles

Los ácidos débiles son liposolubles y con altos valores de pKa (pH en el que las formas disociadas y no disociadas del ácido son iguales). En su forma disociada traspasan la membrana plasmática, actuando sobre el citosol, disminuyendo su pH.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar los efectos de los ácidos débiles como inhibidores: el desacoplamiento y la acumulación de aniones intracelulares. En el desacoplamiento, una vez que los ácidos traspasan la membrana plasmática, la enzima ATPasa bombea protones fuera de la célula para estabilizar el pH del sistema con lo cual disminuye el nivel del ATP hasta el grado de ser insuficiente (Falhof *et al.*, 2016; Palmqvist *et al.*, 2000). El incremento del bombeo demanda una mayor producción de ATP; cuando la célula no logra satisfacer la necesidad de ATP, el citoplasma se acidifica resultando en la muerte celular (Imai *et al.*, 1995, Larsson *et al.*, 1999).

La acumulación de aniones intracelulares consiste en que la forma aniónica del ácido se captura en la célula, y el ácido no disociado se difunde en el interior hasta alcanzar el equilibrio, esto provoca la disminución del crecimiento de la célula y el incremento de la capacidad buffer del citoplasma debido al aumento de la concentración del ácido (Coote *et al.*, 1991; Palmqvist *et al.*, 2000).

El ácido acético y el ácido fórmico forman parte de los derivados tóxicos de la hidrólisis ácida y son considerados ácidos débiles (Akobi *et al.*, 2016). El ácido acético en concentraciones menores de 1 g/L mejora la fermentación y se refleja en la producción de H<sub>2</sub> (Behera *et al.*, 2014) los efectos negativos del ácido acético comienzan a ser notorios a partir de 2 g/L (Behera *et al.*, 2014; Chandel *et al.*, 2007). En cuanto al ácido fórmico, en concentraciones mayores a 3 g/L reduce la producción de hidrógeno (Kumar *et al.*, 2014).

### 3.6.2 Compuestos fenólicos

Los compuesto fenólicos (fenol y vainilina) son producidos durante la hidrólisis de la lignina, se ha reportado que dañan las membranas de las células, provocando que estas pierdan su capacidad selectiva y la asimilación de azúcares. El fenol al tener bajo peso molecular se considera más tóxico para los microorganismos que los furanos (Behera *et al.*, 2014; Palmqvist *et al.*, 2000). El comportamiento inhibitorio de los compuestos fenólicos depende de su concentración y sus propiedades físicas (solubilidad, hidrofobicidad, peso molecular) (Antonopoulou *et al.*, 2010; Barakat *et al.*, 2012; Belay *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2014). Estudios reportan que los fenoles en concentraciones mayores a 1 g/L provocan una completa inhibición de la actividad celular y por lo tanto, disminuye la producción de hidrógeno (Quéméneur *et al.*, 2012; Moreno-Andrade *et al.*, 2015). Sin embargo, a bajas concentraciones de 0.1 g/L, se observa que no afectan el crecimiento celular (Mussatto *et al.*, 2004).

### 3.6.3 Derivados de furanos

Evaluaciones in vitro han demostrado que los furanos inhiben directamente a la alcohol deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, también causan acumulación de acetaldehído que tiene el efecto de prolongar la fase de retardo de los microorganismos, provocando bajos rendimientos (De Oliveira *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2017). Además, disminuye el rendimiento de masa celular en ATP. Cao *et al.* (2010) realizaron experimentos para identificar las concentraciones de furfural e hidroximetilfurfural que inhibían la producción de hidrógeno usando un inóculo un cultivo puro de *Thermoanaerobium thermosaccharolyticum* W16, y encontraron que con 1.8 g/L de furfural y 1.5 g/L de HMF se puede inhibir completamente la producción de H<sub>2</sub>, mientras que Akobi *et al.* (2016) encontraron mejoras en la producción de biohidrógeno hasta 1 g/L de furfurales usando como inóculo lodo de digestato anaerobio mesófilo.

Entre los inhibidores orgánicos los fenoles y furanos son los más tóxicos para el crecimiento celular, mientras que los ácidos orgánicos (ácido acético, fórmico y levulínico) son los responsables del desequilibrio de la célula, en conjunto estos compuestos modifican las rutas metabólicas de acetato y butirato hacia aquellas que no producen hidrógeno (Sivagurunathan *et al.*, 2017).

### 3.7 DESTOXIFICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS CON CARBÓN ACTIVADO

Los principales problemas con las tecnologías de pretratamientos ácidos es la formación de inhibidores (Sivagurunathan *et al.*, 2017). Una alternativa para contrarrestar este problema es la destoxificación (Jönsson *et al.*, 2016). Los métodos de destoxificación han sido propuestos por su capacidad de inactivar los inhibidores o reducir su concentración. La eficiencia depende del grado de toxicidad y la tolerancia de los microorganismos al inhibidor (Mussatto *et al.*, 2004). Reducir el contenido de los inhibidores en los hidrolizados mediante la destoxificación tiene el potencial de aumentar las tasas de crecimiento microbiano, las tasas de conversión y los rendimientos de biocombustible (Yee *et al.*, 2018).

En los métodos biológicos se utilizan enzimas específicas o microorganismos que actúan sobre compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados ácidos y cambian su composición (Mussatto *et al.*, 2004). Los métodos físicos, como la evaporación al vacío reducen la concentración de ácido acético, furfural y vainilina, pero incrementa la concentración de los compuestos tóxicos no volátiles, además reduce el volumen del hidrolizado en una tercera parte (Parájo *et al.*, 1977).

Uno de los métodos fisicoquímicos es la aplicación de carbón activado ya que presenta características favorables para ser utilizado como agente destoxificador de hidrolizados ácidos debido a su estructura porosa, alta capacidad de adsorción y bajo costo (Canilha *et al.*, 2004; Mussatto *et al.*, 2004). Su efectividad depende de variables como pH, temperatura, tiempo de contacto, temperatura y concentración del carbón activado, como se muestra en la tabla 3.3 (Gupta *et al.*, 2017; Mussatto *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2011).

Ya se han realizado estudios para utilizar el carbón activado como medio adsorbente de inhibidores como se muestra en la Tabla 3.3. Gupta *et al.* (2017) probaron temperaturas de 30, 40, 50 y 60 °C y pH de 1, 7 y 10, de los cuales obtuvo mayores remociones con 30 °C y pH de 1. Reportaron que las bajas temperaturas y bajos pH favorecen la absorción de furanos y compuestos fenólicos. Independientemente del pH de los hidrolizados ácidos, la adsorción del furfural depende de la temperatura, cuando esta es mayor, la capacidad de adsorción disminuye por lo tanto, la adsorción es un proceso que sucede a temperatura ambiente (25°C). La adsorción de los compuestos fenólicos depende de la temperatura y el pH, puesto que adsorción de los compuestos incrementa con la temperatura pues provee de una mayor difusión del adsorbato para ser adsorbido por el carbón activado (Como lo cita Mussatto *et al.*, 2004 de Berdi *et al.*, 1985).

Lee *et al.* (2011) demostraron que la destoxificación por medio del carbón activado remueve compuestos tóxicos como el HMF, furfural y una moderada cantidad de azúcares; en ese estudio se observó que uno de los indicios de la remoción de los ácidos es el incremento en el pH, y mediante su método de destoxificación usando carbón activado con concentraciones de 5 (p/v) se alcanzaron remociones de HMF y furfural mayores al 95%, remociones de ácido fórmico y ácido acético del 72% y 32%, respectivamente, aunado a la disminución del 15% de azúcares. Miyafuji *et al.* (2003) obtuvieron remociones del 70% de furanos y 90% de fenoles con una concentración de 0.07 g de hidrolizado ácido /g de carbón activado realizando la destoxificación a temperatura ambiente.

En el presente estudio se analizaron los efectos de la temperatura, concentración de carbón activado y tiempos de contacto en la remoción de inhibidores y carbohidratos en los hidrolizados ácidos de bagazo de agave. Con la disminución en la concentración de los inhibidores por medio de este tratamiento, se busca que los carbohidratos presentes en el hidrolizado sean aprovechados por microorganismos con la capacidad de consumirlos sin ser afectados negativamente por los inhibidores y producir una mayor cantidad de H<sub>2</sub>.

**Tabla 3.3** Condiciones para la destoxificación de los hidrolizados ácidos con carbón activado y porcentajes de remoción.

Hidrolizados ácidos	Condiciones				Remoción			Referencia
	Temperatura (°C)	Carbón activado %(p/v)	Ph	Tiempo de contacto (h)	Furfural (%)	HMF (%)	Fenoles (%)	
Caña de azúcar	60	3	ND	1	81	100	97	Vallejos et al. (2016)
Madera	50	1	5.8	1	66	64	ND	Lee et al. (2011)
Madera	50	2.5	5.8	1	93	97	ND	Lee et al. (2011)
Madera	50	5	5.8	1	98	100	ND	Lee et al. (2011)
Madera	50	10	5.8	1	100	100	ND	Lee et al. (2011)
Residuo de poda de olivo	30	2	2	0.5	98	ND	81	Mateo et al. (2013)
Eucalipto	30	5	5.5	0.5	100	100	ND	Villareal et al. (2006)
Eucalipto	30	5	1.8	1	100	100	ND	Villareal et al. (2006)
Maíz	30	5	1	0.5	15*		10	Gupta et al. (2017)
Lantana camara	25	1.5	10	0.5	65	29	85	Kuhad et al. (2010)
Picea (pino)	25	2	5	0.08	94*		88	Guo et al. (2013)
Tronco de Sagus	25	2.5	5.5	1	58*		78	Kamal et al. (2011)
Maíz	25	1.25	1	0.5	93	ND	64	Soleimani et al. (2015)
Maíz	25	2.5	1	0.5	95	ND	87	Soleimani et al. (2015)
Maíz	25	5	1	0.5	98	ND	95	Soleimani et al. (2015)
Bagazo de agave	25	1	0.6	0.3	ND		21	Valdez- Guzmán et al. (2019)
Bagazo de agave	25	5	0.6	0.3	ND		21	Valdez- Guzmán et al. (2019)
Bagazo de agave	25	10	0.6	0.3	ND		10	Valdez- Guzmán et al. (2019)

\*Remoción de compuestos furánicos. ND no detectado

### 3.8 FERMENTACIÓN OSCURA

El hidrógeno es considerado el combustible del futuro, actualmente ha tenido muchos avances ya que es una fuente de energía benéfica y versátil (Buitrón *et al.*, 2014; Elbeshbishy, *et al.*, 2017). Además la densidad energética que presenta (143MJ/kg) es mucho mayor a la del metano, el gas natural y la gasolina, otra ventaja sobre los combustibles fósiles es su alto nivel de octanaje, es decir, tiene una mayor capacidad antidetonante en un motor de combustión (Mazloomi *et al.*, 2012). Para su producción se han usado una variedad de sustratos derivados de la industria tequilera.

El hidrógeno puede ser biológicamente producido mediante la fermentación oscura de los azúcares contenidos en el bagazo de agave, ya que a partir de estos se genera una mayor productividad en comparación a sustratos complejos (Contreras- Dávila *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2009). Este metabolismo se desarrolla en condiciones anaerobias con la presencia de algunas bacterias como lo son *Enterobacter* (anaerobias facultativas) y *Clostridium* (anaerobia) (Elbeshbishy *et al.*, 2017; Ghimire *et al.*, 2015).

Existen dos rutas principales para la producción de hidrógeno bajo condiciones de fermentación oscura, la vía del acetato y la vía del butirato, la primera con un rendimiento máximo de 4 mol H<sub>2</sub> por mol glucosa y la segunda con un rendimiento de 2 mol de H<sub>2</sub> por mol de glucosa, como se observa en la ecuación 1 y 2 (Fang *et al.*, 2002b; Hawkes *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2007; Sivagurunathan *et al.*, 2017). También se puede generar hidrógeno a partir de xilosa, siguiendo las mismas rutas metabólicas se pueden generar 3.33 mol de H<sub>2</sub> por mol de xilosa, mediante la ruta acetato (Ec. 3) y 1.66 mol de H<sub>2</sub> por mol de xilosa, con la ruta butirato (Ec. 4) (Kongjan *et al.*, 2009)



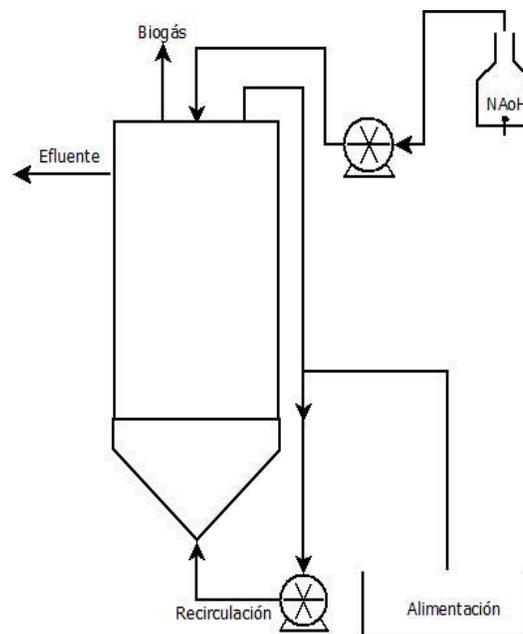
Las ventajas de la fermentación oscura son que su producción no se ve afectada por periodos de luz y oscuridad, pueden usarse múltiples sustratos considerados residuos lo que minimiza los costos. Los metabolitos de este proceso como el ácido butírico, láctico y acético son productos de gran interés, por estas razones la producción de hidrógeno a partir de biomasa es considerada una fuente de energía alternativa del futuro (Kotay *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2015).

### 3.9 TIPOS DE REACTORES

El rendimiento en la producción de hidrógeno y la capacidad de producir biogás a partir de un sustrato dependen del tipo de reactor y las condiciones de operación (Arimi *et al.*, 2015).

El reactor de tanque agitado continuo (CSTR) se utilizó durante mucho tiempo para la producción de hidrógeno; sin embargo, este sistema presenta diversas complicaciones, como propiciar el lavado de la biomasa debido a lo cortos tiempos de retención de sólidos, baja sedimentación y es sensible a cambios pH, TRH y carga orgánica (Arimi *et al.*, 2015).

El problema de lavado de biomasa se evita utilizando reactores en los que se desacoplan los tiempos de retención hidráulica (TRH) de los tiempos de retención de sólidos (TRS), como es el caso de los reactores de flujo ascendente con manto de lodo (UASB). Este tipo de reactor es uno de los más populares entre las tecnologías anaerobias; consta de una columna cilíndrica seccionada en fase sólida, líquida y gaseosa, en la parte inferior se encuentran sedimentados los lodos granulares anaerobios, el biogás producido se encuentra en la parte superior del reactor y tiene su respectiva salida para su medición, la fase líquida o sustrato se mantiene en recirculación para que este en constante movimiento. En este sistema, el sustrato líquido se introduce por el fondo del reactor y este asciende teniendo contacto con la biomasa en forma de gránulos que se encuentra en el fondo del reactor (Figura 3.2). El gas producido causa la circulación interna ayudando así al mantenimiento de los gránulos en suspensión, al ascender, las partículas de gas son liberadas y recolectadas mientras que el lodo regresa a la base del sistema debido a su alta velocidad de sedimentación para continuar con la degradación del sustrato y la generación de hidrógeno a través de compuestos orgánicos. Entre las principales ventajas de este reactor encontramos, que es de simple construcción, es tolerante a altas concentraciones de materia orgánica y promueve la formación de gránulos (Lettinga *et al.*, 1980; Schmidt *et al.*, 1996).



**Figura 3.2** Esquema de un reactor UASB.

### 3.10 FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Ciertos factores como el pH, la temperatura, tiempo de retención hidráulica (TRH) y la carga orgánica, deben ser controlados, puesto que el cambio de algún parámetro dentro del sistema afecta de manera significativa a los microorganismos productores de H<sub>2</sub>.

#### 3.10.1 pH

El pH es un factor a regular en la digestión anaerobia, pues afecta a la estructura de la comunidad microbiana, la actividad de la enzima hidrogenasa y vías metabólicas. Un pH ácido es vital para la generación de H<sub>2</sub> y para la selección de microorganismos en el reactor ya que inhiben la presencia de microorganismos metanogénicos, los cuales son competidores del sustrato y consumidores de H<sub>2</sub> (Hu *et al.*, 2007). A pH menores de 5.5 se inhibe la actividad de las bacterias sulfato-reductoras y como consecuencia se elimina el color negro de los gránulos (Hernández-Mendoza y Buitrón, 2014), un pH menor a 4.5 inhibe la actividad hidrogenasa por la formación de metabolitos ácidos y alcoholes (propionato, etanol) (Hwang *et al.*, 2004), los cuales pueden penetrar la membrana celular e interferir con las actividades metabólicas. En el rango de 4.5- 6.0 se favorece la producción de acetato y butirato (Guo *et al.*, 2010; Sivagurunathan *et al.*, 2017).

#### 3.10.2 Tiempo de retención hidráulica

La producción de H<sub>2</sub> depende de tiempo de retención hidráulica (TRH). Este es el tiempo que el sustrato permanece en un reactor (Ec. 5).

$$TRH = \frac{V_t}{Q}$$

Ecuación 5

V<sub>t</sub> = Volumen total (L).

Q = Caudal (L/h)

El TRH es un parámetro importante para la producción de H<sub>2</sub>, ya que existe una relación entre ellos (Lukajtis *et al.*, 2018), la productividad aumenta a cierto rango de TRH (2- 8h), si se excede este rango la productividad disminuye debido al lavado del reactor o por el efecto de inhibición de los ácidos grasos volátiles sobre el inóculo. Los TRH óptimos, suelen variar entre 2, 4 y en algunos casos hasta 12 h. Para establecer este rango es necesario tomar en cuenta el tipo de sustrato y su degradabilidad (Kim *et al.*, 2013; Lukajtis *et al.*, 2018).

Este parámetro también afecta en la comunidad microbiana, ya que al reducir el TRH se suprime la actividad de los microorganismos metanogénicos (Hu *et al.*, 2007) y se inhibe la homoacetogénesis (Si *et al.*, 2015)

#### 3.10.3 Carga orgánica

Se han realizado diversos estudios para encontrar la carga orgánica en la que se pueda obtener el mayor rendimiento de hidrógeno. La carga orgánica (CO) es la concentración del sustrato introducida al reactor por unidad de tiempo (Mariakakis *et al.*, 2011).

$$CO = \frac{S}{TRH}$$

Ecuación 6

CO = Carga orgánica (g/ L-h).

S = Concentración del sustrato (g/L).

TRH = Tiempo de retención hidráulica (h)

La carga orgánica óptima de un bioreactor depende de varios factores como tipo de reactor, tipo de sustrato, la concentración y el TRH (Mariakakis *et al.*, 2011).

Diversos autores han investigado el efecto de la carga orgánica sobre la producción de H<sub>2</sub> variando la concentración y el TRH.

Si *et al.* (2015) realizaron experimentos con el TRH en un reactor UASB y un UPBR. Observaron que al operar con TRH largos tenían productividades y rendimientos bajos en ambos reactores (1.24 L H<sub>2</sub>/L-d y 1.2 mol H<sub>2</sub>/mol carbohidrato y 1.29 L H<sub>2</sub>/L-d y 1.3 mol H<sub>2</sub>/mol carbohidrato, respectivamente) debido a que con tiempos de residencia largos, los ácidos grasos volátiles (AGVs) se acumularon en el sistema y pueden causar la inhibición, disminuir la productividad y la actividad microbiana (Gorgec *et al.*, 2019). Al operar con TRH de 8 h con cargas orgánicas de 24 g glucosa/L-d en el reactor UASB obtuvieron productividades de 4.4 L H<sub>2</sub>/L-d y rendimientos de 1.46 mol H<sub>2</sub>/mol carbohidrato, en el caso de reactor UPBR con un TRH de 4 h y una carga orgánica de 48 g glucosa/L-d se produjeron 9.6 L H<sub>2</sub>/L-d y 1.62 mol H<sub>2</sub>/mol carbohidratos y al disminuir el TRH (incrementar la carga orgánica a 48 y 96) la productividad y el rendimiento disminuyó. Chang *et al.* (2004) tuvieron productividades de 6 L H<sub>2</sub>/L-d con TRH de 8- 20h y cargas orgánicas de 20-60 g sacarosa/L-d, Sivagurunathan *et al.* (2016) obtuvieron productividades de 57 L H<sub>2</sub>/L-d con TRH de 2 h y cargas orgánicas de 180 g galactosa/L-d en reactores UASB utilizando sustratos modelo.

Kirli *et al.* (2018) operaron un reactor alimentándolo con hidrolizado de paja de trigo con cargas orgánicas de 60- 9.2 g carbohidratos/L-d, TRH de 2- 13 h y, obtuvieron los mejores rendimientos (1.6 mol H<sub>2</sub>/mol carbohidrato) y productividad (1.75 L H<sub>2</sub>/L-d) con un carga orgánica de 60 g/L-d y TRH de 2 h. Gorgec *et al.* (2019) utilizaron como sustrato hidrolizado de trigo residual probando cargas orgánicas de 360 a 45 g carbohidratos/L-d con TRH de 1- 8 h y concluyeron que con una carga orgánica de 120 g carbohidratos/L-d y TRH de 3 h obtenían la mayor productividad de 2.51 y 5 mol H<sub>2</sub>/mol azúcar, Liu *et al.* (2014) produjeron 16.3 L H<sub>2</sub>/L y rendimientos de 1 mol H<sub>2</sub>/mol de carbohidrato a partir de hidrolizados de paja de arroz.

Tanto en los reactores con sustratos reales como con sustratos sintéticos, la productividades y rendimientos óptimos se observan al operar con TRH que oscilan entre 8- 2 h y cargas orgánicas de 20- 120 g carbohidratos/L-d, ya que con TRH menores las productividades y rendimientos disminuyen debido al lavado de los microorganismos (Gorgec *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2014) como lo muestra la tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Productividad y rendimientos a diferentes cargas orgánicas.

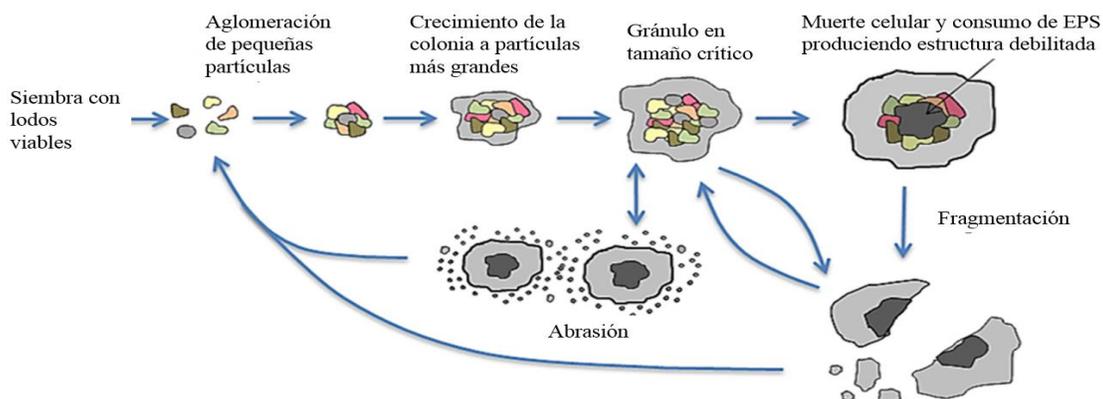
Sustrato	carga orgánica (g carbohidrato/L-d)	TRH	Productividad (L H <sub>2</sub> /L-d)	Rendimiento. (mol H <sub>2</sub> /mol carbohidratos)	Referencia
Glucosa	8	24	1.24	1.25	Si et al. (2015)
	16	12	2.9	1.46	
	24	8	4.38	1.47	
	48	4	4.22	0.71	
	8	24	1.29	1.30	
	24	8	4.63	1.55	
	48	4	9.68	1.62	
	96	2	10.66	0.89	
Sacarosa	60	8	6.07	0.015	Chang et al. (2004)
	80	6	3.64	0.09	
	120	4	3.04	0.04	
Galactosa	240	1.5	48	1.44	Sivagurunathan et al. (2016)
	180	2	57	2.25	
	120	3	24.7	1.47	
	60	6	12	1.5	
Hidrolizado de paja de trigo	60	2	1.75	1.6	Kirli et al. (2018)
	30	4	1.46	1.5	
	20	6	1.26	1.5	
	12	10	1.28	1.4	
	9.2	13	0.77	0.6	
Hidrolizado de trigo residual	360	1	0.65	0.93	Gorgec et al. (2019)
	180	2	1.4	1.61	
	120	3	2.51	5.19	
	80	4.5	1.63	3.70	
	60	6	0.67	0.76	
	45	8	0.71	0.16	
Hidrolizado de paja de arroz	60	8	5.52	0.72	Liu et al. (2014)
	120	4	16.32	1.02	
	240	2	0	0	

### 3.10.4 Lodos granulares anaerobios

Las características físicas de los lodos granulares como la densidad, la estabilidad y su capacidad de sedimentación se deben al contenido de los exopolímeros (EPS) los cuales son una mezcla compleja de polisacáridos, proteínas y lípidos que actúan como un biopegamento para la agrupación y formación de gránulos (Banu *et al.*, 2018). Un alto contenido de EPS provee mayor estabilidad en estructura de los gránulos (capacidad de los gránulos a resistir la hidrodinámica y al corte mecánico), pero también disminuye la transferencia de sustrato en el gránulo ya que obstruye los poros del gránulo (Como lo cita Banu *et al.*, 2018 de McSwain *et al.*, 2005)

Verawaty *et al.* (2013) y Ning *et al.* (2013) observaron el ciclo de formación de lodos granulares. Ning *et al.* (2013) dividieron este proceso en 3 etapas: la proliferación que consta de la formación de pequeños gránulos debido a la interacción entre células y a los EPS (exopolisacáridos), seguido por el incremento del diámetro, en esta etapa la velocidad de crecimiento es más lenta e indica que los gránulos están llegando a su madurez y se consideran estables. Hu *et al.* (2007) y Ning *et al.*, (2013) reportaron que los gránulos fueron estables cuando alcanzaron el diámetro de  $1.6 \pm 0.2$  mm y  $1.2$  mm.

Cuando los gránulos llegan a su crecimiento máximo, llegan a una etapa crítica, en la que son susceptibles a impactos, colisiones y, desgastes, provocando la fractura y/o abrasión de los gránulos, que se ve reflejado en la disminución del diámetro (Verawaty *et al.*, 2013) como lo muestra la figura 3.3. Este comportamiento ha sido observado por Hernández-Mendoza *et al.* (2014) quienes reportaron una disminución de  $2.0 \pm 0.2$  a  $1.4 \pm 0.5$  mm en el diámetro después de 50 días de operación de un reactor productor de  $H_2$  usando como sustrato glucosa.



**Figura 3.3** Ciclo de partículas en la formación de gránulos (Verawaty *et al.*, 2013).

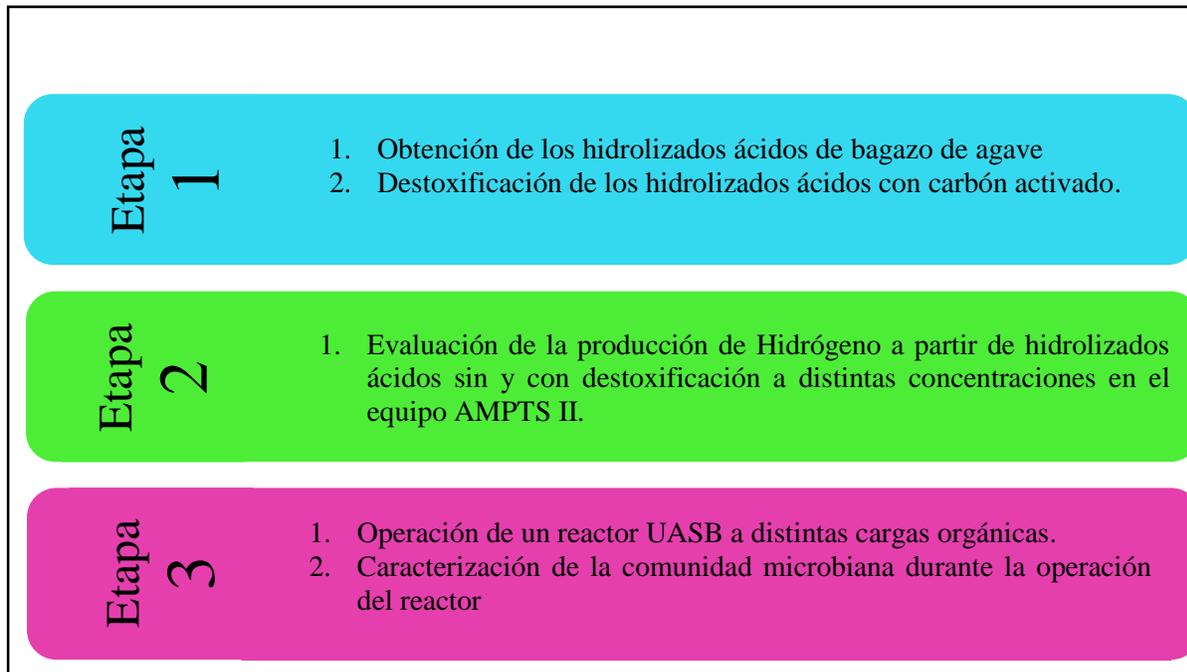
Las principales dificultades de los lodos granulares para mantener la biomasa granular estable a largo plazo son: el crecimiento de microorganismos filamentosos y la presencia de compuestos tóxicos, los cuales conllevan a la pérdida de la funcionalidad de los microorganismos y cambios en composición de sustancias EPS (Moura *et al.*, 2018).

Los microorganismos filamentosos aparecen debido a largos tiempos de retención celular, deficiencia de nutrientes, altas cargas orgánicas y descontrol de tiempos de retención celulares (Figuroa *et al.*, 2015; Moura *et al.*, 2018), cuando estos microorganismos filamentosos proliferan, la estructura compacta de los gránulos se modifica a gránulos sustancialmente esponjosos y grandes (Moura *et al.*, 2018) y las propiedades de sedimentación de los gránulos se ven deterioradas (Wilén y Balmér, 1999)

La presencia de los compuestos tóxicos puede provocar la disminución de las bacterias asociadas con la producción de los EPS, afectando a la morfología mediante la disminución del tamaño del gránulo a una estructura más compacta, la cual se considera como una estrategia defensiva contra los efectos inhibidores de los compuestos tóxicos (Franca *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2014; Tay *et al.*, 2005).

#### 4. METODOLOGÍA

La estrategia experimental para este proyecto se dividió en 3 etapas (Figura 4.1). La primera consistió en generar hidrolizados ácidos de bagazo de agave, caracterizarlo y destoxificar con carbón activado, a continuación se evaluó la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave sin y con tratamiento de destoxificación. Se utilizó glucosa como control por ser el compuesto que se encontró en mayor proporción. En la tercera etapa se operó un reactor UASB en continuo a distintas cargas orgánicas de hidrolizados de bagazo de agave destoxificado y finalmente se caracterizó la comunidad microbiana del reactor durante cada uno de los incrementos en las cargas.



**Figura 4.1** Metodología experimental

## 4.1 ETAPA 1

### 4.1.1 Obtención y caracterización del hidrolizado ácido

Para la obtención de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave, el bagazo se sometió a 1.9% de HCl a una temperatura 130 °C durante 3.2 h (técnica PNT-10). El hidrolizado ácido de bagazo de agave fue caracterizado con los métodos mostrados en la tabla 4.1 para conocer las concentraciones a las que se encuentran los inhibidores (furfural, hidroximetilfurfural, fenoles y ácidos orgánicos). Lo anterior con la finalidad de determinar: A) Si las concentraciones superan a las reportadas como inhibitorias, B) los azúcares disponibles en el hidrolizado para conocer las cargas con las que se trabajará, C) la demanda química de oxígeno (DQO) y D) la concentración de los minerales para determinar si es necesaria la adición de solución de nutrientes

**Tabla 4.1.** Métodos para caracterizar el bagazo de agave.

Parámetro	Método	Referencia
pH	Potenciómetro.	APHA <i>et al.</i> , 1992
DQO	HACH	
Azúcares totales	Fenol- ácido sulfúrico	Dubois <i>et al.</i> , 1956
Fenoles	Método 4 amino antipirina	American Public Health Association <i>et al.</i> , 1992; Buitrón <i>et al.</i> , 2005
Furfural	Cromatografía de líquidos	NREL/TP-510-42623. 2008.
Hidroximetilfurfural	Cromatografía de líquidos	NREL/TP-510-42623. 2008.
Ácidos orgánicos	Cromatografía de líquidos	NREL/TP-510-42623. 2008.

### 4.1.2 Destoxificación de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave

Para llevar a cabo la destoxificación se realizaron pruebas tomando como referencias las metodologías de Gupta *et al.* (2017), Lee *et al.* (2011) y Miyafuji *et al.* (2003) en donde se determinan las mejores condiciones de temperatura, tiempo de contacto y la cantidad de carbón activado con respecto al volumen de hidrolizados, para eliminar la mayor parte de los inhibidores que se encuentran en el hidrolizado. Por lo tanto se procedió a probar con las condiciones que reportaban los autores anteriormente mencionados con porcentajes de adsorción de furfurales de 100%.

Primero se probaron distintas temperaturas (Tabla 4.2) ya que en la literatura se encontró que la aplicación de calor incrementaba la capacidad de adsorción del carbón activado. Sin embargo se busca invertir la menor cantidad de energía en el proceso, por lo tanto se realizaron más experimentos de destoxificación de los hidrolizados ácidos a 25 °C.

**Tabla 4.2** Estrategia experimental para la evaluación del efecto de la temperatura en la destoxificación de hidrolizados ácidos.

Muestra (mL)	Temperatura (°C)	Carbón activado (g)	Tiempo de contacto (h)
100	50	0.5	0.5
100	30	0.5	0.5
100	25	0.5	0.5

Después de analizar las remociones de cada una de las muestras, se procedió a realizar más ensayos de la destoxificación a 25 °C, el siguiente paso fue probar con diferentes concentraciones de carbón activado y ampliar el tiempo de contacto a 1 h (Tabla 4.3).

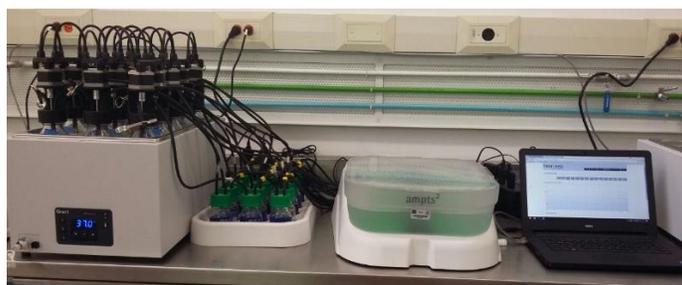
**Tabla 4.3** Variaciones en el tiempo de contacto y en la cantidad de carbón activado para la destoxificación de los hidrolizados ácidos.

Muestra (mL)	Temperatura (°C)	Carbón activado (g)	Tiempo de contacto (h)
100	25	0.5	0.5
100	25	1.0	0.5
100	25	2.5	0.5
100	25	5	0.5
100	25	0.5	1.0
100	25	1.0	1.0
100	25	2.5	1.0
100	25	5	1.0

## 4.2 ETAPA 2

### 4.2.1 Evaluación de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos sin y con destoxificación a distintas concentraciones

En esta etapa se evaluó la producción en lote de hidrógeno a partir de los hidrolizados ácidos con y sin tratamiento de destoxificación a diferentes concentraciones de carbohidratos solubles utilizando equipo AMPTS II (Automatic Methane Potential Test System) para cuantificar la producción de H<sub>2</sub> en línea (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Equipo AMPTS II

En el experimento se evaluaron concentraciones de 4.2, 6 y 9 g/L de azúcares solubles, cada una por duplicado (tabla 4.4). Como inóculo se utilizó lodo granular anaerobio con un pretratamiento térmico (105 °C, 24 h) y un contenido de 0.6 g SV/g. Se estableció una relación sustrato- inóculo de 1.12 g/g SV y se operó 37 °C, 150 rpm y pH 6.9. La composición del medio mineral por litro fue la siguiente: 41.6 g NH<sub>4</sub>Cl, 4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.6 g FeSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O, 40 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 40 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 40 mg KI, 8 mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8 mg ZnCl<sub>2</sub>.

Como control se utilizó glucosa ya que este carbohidrato es uno de los azúcares que se encuentran en mayor proporción en los hidrolizados ácidos.

**Tabla 4.4** Experimento con distintas concentraciones de hidrolizado ácido de bagazo de agave.

Tratamiento	Concentración (g/L)
Hidrolizado 35%	4.2
Hidrolizado 50%	6.0
Hidrolizado 75%	9.0
Control (Glucosa)	5.0

En el efluente se determinó la concentración de inhibidores (fenoles, hidroximetilfurfural y furfural), los carbohidratos y la producción de hidrógeno mediante las técnicas analíticas que se mencionan en la sección 5.2.

Las productividades de cada una de las concentraciones que se obtuvieron en el equipo AMPTS II se ajustaron a la curva de Gompertz para analizar la cinética de la producción de H<sub>2</sub>.

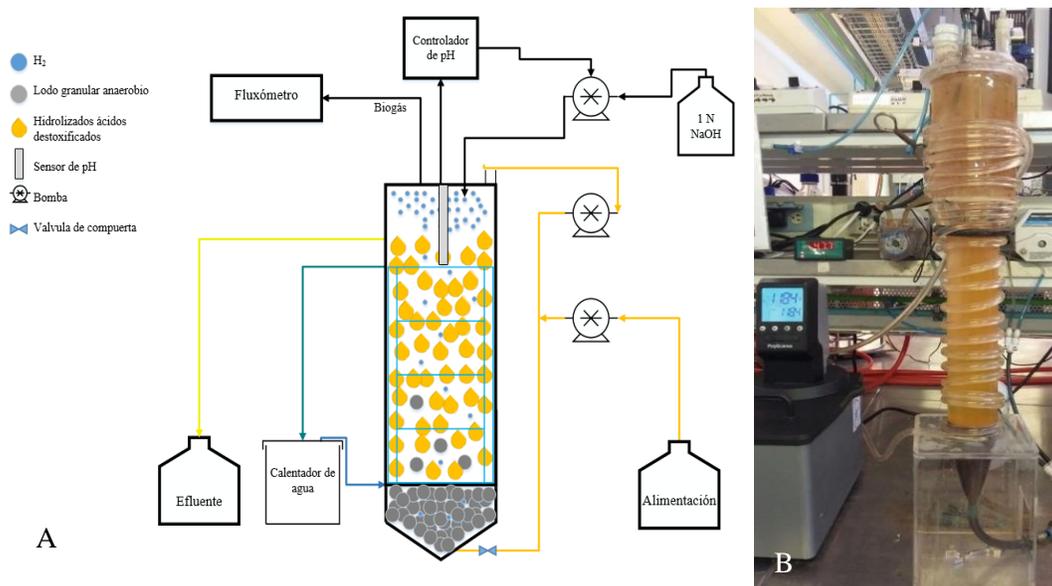
### 4.3 ETAPA 3

#### 4.3.1 Operación de un reactor UASB en continuo con incrementos en las cargas orgánicas de hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados

Una vez establecidas las concentraciones en las que se genera una mayor cantidad de hidrógeno a partir del hidrolizado destoxificado, se procedió con la operación del reactor UASB. Este reactor contó con un volumen de trabajo de 2.2 L. El reactor se operó a una velocidad ascensional de 5 m/h lo que asegura la agitación homogénea. El pH (BCN de marca Sensorex) fue controlado a 4.5 con un controlador de pH (140 series marca EUTECH Instruments), conectado a una bomba Master Flex que provee de NaOH 1 N al reactor. Además contó con puertos de entrada y salida del efluente, y salida de biogás. Las bombas de alimentación y salida del efluente pertenecen a la marca Master Flex (Figura 4.3).

El reactor UASB se inoculó con lodo granular anaerobio conservando la relación-sustrato inóculo de 1.12 g/g SV, con un TRH de 11 h y 35 °C, como sustrato se utilizaron hidrolizados ácidos destoxificados (50 °C, 5 % (p/v), 0.5 h), los cuales contenían 12 g/L de carbohidratos, 1.1 g/L de ácido acético, 153 mg/L de furfural, 74 mg/L de furfural.

Se operó con una carga orgánica inicial de 9.5 g de carbohidratos/L-d, después se incrementó a 13 g de carbohidratos/L-d y finalmente a 20 g de carbohidratos/L-d.



**Figura 4.3** Reactor UASB. A) Esquema del funcionamiento del reactor. B) Fotografía.

## 5. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 5.1 HIDROLISIS ÁCIDA DEL BAGAZO DE AGAVE

Se hidrolizaron lotes de 25 g de bagazo de agave molido. El bagazo se colocó en botellas Corning de 1 L y se introdujeron 500 ml de la solución de HCl (1.9 %, v/v). Se incubaron a 130 °C durante 192 min. Una vez fría, la solución se filtró con una malla de tela. La solución ácida se conservó a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad (Universidad de Guadalajara, 2017).

### 5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS DEL BAGAZO DE AGAVE

Los carbohidratos totales y solubles se determinaron siguiendo el método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) quienes utilizaron glucosa como estándar.

La Demanda química de oxígeno (DQO) Se midió empleando un método colorimétrico a reflujo cerrado utilizando tubos Hach con una solución estándar (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, sulfato de mercurio y sulfato de plata) para determinar la DQO en un rango de 20- 1500 mg DQO/L, la determinación del valor de la DQO se realizó en un espectrofotómetro portátil (Hach DR/2010) de acuerdo a lo indicado en los métodos estándar (APHA et al., 1999)

Los Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se determinaron por gravimetría de acuerdo al procedimiento descrito en los métodos estándar (APHA *et al.*, 1992)

Los compuestos fenólicos reaccionan con 4-aminoantipirina a pH 8 en presencia de ferrocianuro de potasio para formar una solución de antipirina de color, que se detectó a 500 nm en el espectrofotómetro (APHA *et al.*, 2012).

La presencia del fosfato en forma orgánica e inorgánica condensada (meta-, piro- u otros polifosfatos) debe convertirse a ortofosfato reactivo antes del análisis. El pretratamiento de la muestra con ácido y calor proporcionan las condiciones de hidrólisis de las formas inorgánicas condensadas. Los fosfatos orgánicos se convierten en ortofosfatos calentándolos con ácido y persulfato. El ortofosfato reacciona con molibdato en un medio ácido para producir un compuesto fosfomolibdato. El ácido ascórbico luego reduce el compuesto, produciendo un color azul intenso de molibdeno (Hach, 2002).

Nitrógeno se midió en forma de amonio por el método salicilato. Los compuestos de amoniaco se combinan con el cloro para formar monocloramina. La monocloramina reacciona con el salicilato para formar 5- aminosalicilato. El 5-aminosalicilato se oxida en presencia de un catalizador de nitroprusiato de sodio para formar un compuesto de color azul.

#### 5.2.1 Concentración de azúcares, furfurales y ácidos orgánicos

Los azúcares contenidos en el hidrolizado (glucosa, xilosa, galactosa), los furfurales (hidroximetilfurfural y furfural) y ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético) fueron determinados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) modelo AGILENT 1260 (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) equipado con un detector de matriz de diodos (DAD), con un detector de índice de refracción (RID), y Aminex HPX-87H. Como eluyente se utilizó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM en una columna acoplada con un caudal de 0.6 mL/min a una temperatura de 50 °C. Los furfurales se detectaron mediante el detector DAD: a los 32 min para el HMF, 40.9 min para el furfural.

### 5.3 DESTOXIFICACIÓN DEL HIDROLIZADO

Para la destoxificación del hidrolizado se utilizó como referencia el método propuesto por Lee et al. (2011) el cual consiste en realizar pruebas colocando desde 0.5 a 5 g de carbón activado (Carbón activado granular Sigma-Aldrich) en un matraz de 250 mL y agregar 100 mL con una agitación de 180 rpm a 50, 30 y 25 °C durante 30 min y 1 hora, después los sólidos fueron removidos por filtración.

Para calcular la adsorción del carbón activado se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_e = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m}$$

Ecuación 5

Donde  $C_e$  es la cantidad de materia adsorbida por el carbón activado (mg/g),  $C_i$  es la concentración inicial de soluto (g/L) y  $C_f$  es la concentración final del soluto (g/L),  $V$  es el volumen tratado y  $m$  es la carga de carbón activado (g).

### 5.4 PRETRATAMIENTO TÉRMICO AL LODO

Los lodos granulares que se emplearon para las pruebas en el equipo AMPTS II se trataron a  $105 \pm 1$  °C durante 24 h para inhibir la actividad de los consumidores hidrógeno y para seleccionar a los microorganismos anaerobios capaces de esporular y producir hidrógeno (Ginkel *et al.*, 2001). Después del tratamiento térmico, se disminuyó el tamaño de partícula en un mortero y se procedió a tamizarlo con una malla (850µm) (Buitrón y Carbajal., 2010).

### 5.5 MEDICIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BIOGÁS

Para el análisis de la composición del biogás (metano, hidrógeno y CO<sub>2</sub>) se utilizó un cromatógrafo de gases (8610C, SRI Instruments, Torrance, CA, USA) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas de acero (una columna empacada con sílice gel de 6'x 1/8'' y otra columna empacada con tamiz molecular 13x). Las temperaturas del inyector y detector son 90 y 150 °C, respectivamente. La temperatura inicial en la columna es de 40°C, la cual se mantiene por 4 min y después incrementa gradualmente hasta 110 °C a razón de 20°C min<sup>-1</sup>. La temperatura final en la columna se mantiene por 3 min. Gas nitrógeno es empleado como gas acarreador a un flujo de 20 mL min<sup>-1</sup>. El equipo fue calibrado con gas estándar con una composición de hidrógeno (50%), dióxido de carbono (30%) y metano (20%) (Cardeña *et al.*, 2017).

### 5.6 SECUENCIACIÓN DEL ADN TOTAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Al finalizar la operación de cada carga orgánica se tomó una muestra del inóculo para caracterizar la comunidad microbiana, esta se centrifugó a 13 000 rpm para obtener la biomasa y la extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo establecido en el PowerSoil DNA extraction kit. La concentración del ADN se determinó con NanoDrop (Thermo Scientific).

El ADN total que se obtuvo de las comunidades se secuenció con base en el gen 16S rDNA mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq (Shu *et al.*, 2016) utilizando los cebadores 28F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG-3' y 388R (5'-TGCT GCCTCCCGTAGGAGT-3'. La secuenciación se llevó a cabo en los servicios genómicos de RTL genomics (Lubbock, TX, EUA) por duplicado.

También se midió el tamaño de los gránulos mediante el equipo Esteroscopio Stemi 305 de Carl Zeiss.

## 5.7 MODELO DE GOMPERTZ

Los parámetros cinéticos como la tasa de producción de hidrógeno (H) y la fase de retardo ( $\lambda$ ) se obtuvieron mediante diversas condiciones de pruebas utilizando la ecuación de Gompertz, a partir de la cual se puede modelar la producción de biogás y ha sido usada por autores como Davila- Vazquez *et al.* (2008) y Butrón y Carbajal *et al.* (2010) (Ec. 6).

$$H(t) = H_{max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left( \frac{R_m}{H_{max}} - (\lambda - t) + 1 \right) \right\} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

H (t) = Volumen acumulado de H<sub>2</sub> en las pruebas (mL).

H<sub>max</sub> = Potencial máximo de producción de H<sub>2</sub> (mL).

R<sub>m</sub> = Velocidad máxima de producción de H<sub>2</sub> (mL/h).

$\lambda$  = es el tiempo en el que se comienza a producir H<sub>2</sub> (h).

t = Duración de las pruebas (h).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS DE BAGAZO DE AGAVE

La concentración de DQO y carbohidratos totales en los hidrolizados ácidos de bagazo de agave de este estudio se encuentran dentro del promedio reportado por otros autores. En cuanto a la concentración de monosacáridos, la xilosa es el que se encuentra en mayor proporción y la glucosa en menor proporción como también lo reportan Valdez- Guzmán et al. (2019). Esto se debe a que la hemicelulosa de la cual se produce la xilosa es más fácil de degradar que la celulosa (precursora de la glucosa), ya que necesita temperaturas y presiones más altas (<160 °C, 10 atm) para lograr su hidrólisis (Como lo cita Kumar *et al.*, 2009 de Broder *et al.*, 1995; Iranmahboob *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1997). La concentración de ácido acético producido es menor a lo reportado por otros autores, pero aún se encuentra por encima de lo reportado como inhibitorio (2 g/L) (Chandel *et al.*, 2007).

**Tabla 6.1** Comparación de la composición de hidrolizados ácidos de bagazo de agave obtenidos a distintas condiciones.

Compuesto	Concentración			
	1.4% HCl <sup>1</sup>	1.9% HCl <sup>2</sup>	2.7% HCl <sup>3</sup>	1.9% HCl <sup>4</sup>
DQO <sub>Total</sub> (g/L)	18.9 ± 0.3	23.1	30.2 ± 3.5	22.4 ± 1.2
DQO <sub>soluble</sub> (g/L)	ND.	ND.	ND.	18.7 ± 0.2
Carbohidratos <sub>Totales</sub> (g/L)	18.7 ± 0.3	13.7 ± 0.01	17.3 ± 2.1	13.3 ± 0.2
Carbohidratos <sub>solubles</sub> (g/L)	ND.	ND.	ND.	12.4 ± 2.2
Xilosa (g/L)	11.9 ± 0.2	4	ND.	6.9 ± 1.2
Glucosa (g/L)		0.46 ± 0.01	ND.	0.15 ± 0.05
Celobiosa (g/L)	ND.	ND.	ND.	0.61 ± 0.31
Ácido acético (g/L)	6.6	4.4 ± 0.2	7.7 ± 2.6	3.9 ± 3.2
Furfural (mg/L)	37	ND.	33.1 ± 9.1	232 ± 2.4
Hidroximetilfurfural (mg/L)	27	ND.	95.8 ± 21.9	97.4 ± 0.2
Fenoles totales (mg/L)	10.3 ± 0.2	190 ± 2	941.6 ± 157.7	3.5 ± 0.1
Nitrógeno (mg/L)	ND.	ND.	ND.	3.3 ± 0.3
Fósforo (mg/L)	ND.	ND.	ND.	453.5 ± 7.7

<sup>1</sup>Alvarado-Michi *et al.*, 2017 (2.1 h, 125 °C); <sup>2</sup>Valdez- Guzmán *et al.*, 2019 (2.2 h, 130 °C); <sup>3</sup>Arreola-Vargas *et al.*, 2016 (1.3h, 124 °C); <sup>4</sup>Este estudio (3.2 h, 130 °C). ND. No disponible.

La concentración de los fenoles es el resultado de la hidrólisis de la lignina, la cual es altamente resistente a la degradación química (Fengel y Wegener, 2011), autores como Matsushita y Yasuda, (2005) reportaron que la hidrólisis de la lignina se logró con ácido sulfúrico al 72%, a una temperatura de 60- 80 °C, por lo tanto utilizar ácido clorhídrico diluido hidroliza una pequeña fracción de lignina. Al utilizar la técnica optimizada PNT-10 con una concentración de HCl al 1.9% en este trabajo, se generó un 70% y 99.2% menos de fenoles comparado con los generados por Alvarado-Michi et al. (2017) y Valdez-Guzmán et al. (2019), esto se debe a que se utilizaron diferentes lotes de bagazo de agave y los procedimientos de la hidrólisis se llevaron a cabo a distintas condiciones. En el caso de

Arreola- Vargas et al. (2016) pudieron generar una mayor cantidad fenoles debido a que realizó la hidrólisis con una concentración mayor de HCl.

Los furfurales generados por Alvarado- Michi et al. (2017) fueron menores a los reportados por otros autores y por este trabajo, sin embargo Valdez- Guzmán et al. (2019) no detectaron la presencia de furfurales debido que utilizaron una técnica de hidrolisis mejorada específicamente para el bagazo de agave que utilizaron.

Al analizar el contenido de nutrientes en los hidrolizados ácidos de este estudio se observó que la relación de N: P es de 5: 0.035, mucho menor a lo reportado como necesario para que se lleve a cabo la fermentación oscura (5:1) (Jung *et al.*, 2013), por lo tanto es necesario agregar nutrientes al sistema para su correcto funcionamiento.

## 6.2 DESTOXIFICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS ÁCIDOS CON CARBÓN ACTIVADO

Para los ensayos de destoxificación, primero se realizaron experimentos variando el parámetro de temperatura a una concentración carbón activado/hidrolizado (p/v) de 0.5% y un tiempo de contacto de 0.5 h (Tabla 6.2).

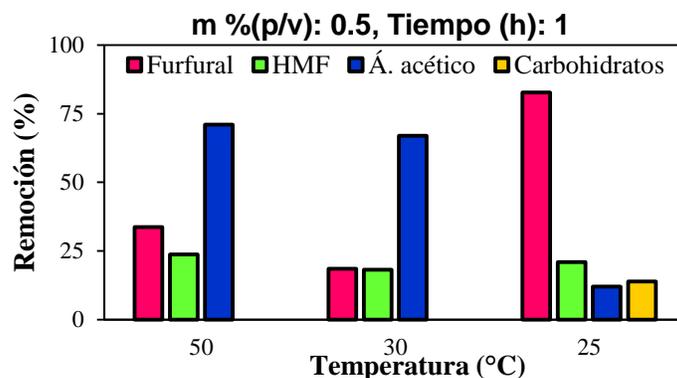
La menor temperatura de destoxificación logró la mayor remoción de furfural, mientras que no se observaron diferencias en la remoción de HMF a las diferentes temperaturas. Contrario a esto, la mayor temperatura de 50 °C logró la mayor remoción de ácido acético. Muy importante resaltar, la menor temperatura también redujo la concentración de carbohidratos, lo cual es un resultado no deseable.

La temperatura fue uno de los primeros parámetros en analizar, ya que al realizar la destoxificación a temperaturas de mayores de 25 °C hay un incremento en el consumo de energía. La adsorción con carbón activado es un proceso que no requiere calor (Guo *et al.*, 2013; Kamal *et al.*, 2011; Kuhad *et al.*, 2010; Soleimani *et al.*, 2015), sin embargo, se contrapone a la teoría de que la temperatura incrementa la difusión del adsorbato hacia el adsorbente. Este estudio comprobó que la adsorción es un proceso que no requiere el incremento de la temperatura de 25 °C (Cuevas *et al.*, 2014, Gupta *et al.*, 2017). En la figura 6.1 se reportan remociones del 83% de furfural y 21% de HMF a 25 °C, en cambio a 50 °C hubo un mayor rendimiento en cuanto a la adsorción de inhibidores (5.4 mg/g de furfural y 15.6 mg/g de HMF) (Tabla 6.2). Pero sólo removió el 33% y 23% de furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, esto sugiere que la superficie de adsorción se vio saturada y no fue posible adsorber más (Mussatto *et al.*, 2004) (Figura 6.1).

**Tabla 6.2** Remoción de inhibidores a diferentes temperaturas de destoxificación con una concentración de 0.5 % (p/v) y un tiempo de contacto de 0.5 h.

Condiciones	Furfural	HMF
T. (°C)	Ce (mg/g)	Ce (mg/g)
50	5.4	15.6
30	4.2	8.7
25	4.1	37.9

Ce: mg de inhibidor adsorbido por gramo de carbón activado.



**Figura 6.1** Remoción de compuestos durante la destoxificación a distintas condiciones de la tabla 6.2.

m: Concentración g de carbón activado por L de hidrolizado %(p/v).

En cuanto al ácido acético, algunos autores relacionan su adsorción con la temperatura (Soleimani *et al.*, 2015, Mateo *et al.*, 2013). En este experimento la temperatura fue un parámetro determinante, ya que al incrementar la temperatura a 50 °C se removió el 71% del ácido acético lo cual pudo deberse a su volatilización (Villareal *et al.*, 2006).

La pérdida de carbohidratos durante la destoxificación ya ha sido reportada por otros autores, desde un 27 a un 30% (Miyafuji *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2013; Valdez- Guzmán *et al.*, 2019). Los autores relacionan la disminución de los carbohidratos con el incremento de la concentración de carbón activado que incrementa en los sitios activos atrápanolos físicamente.

Gupta *et al.* (2017) y Soleimani *et al.* (2015) realizaron experimentos de destoxificación en los cuales concluyeron que la adsorción óptima de los compuestos furánicos puede lograrse a bajas temperaturas y bajos pH. Concordando con los resultados de este ensayo en el que se obtuvieron porcentajes de remoción de los compuestos furánicos a 25 °C. Por lo tanto, se optó por continuar con los experimentos a diferentes concentraciones de carbón activado y tiempos de contacto a esta temperatura, de las cuales se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 6.3.

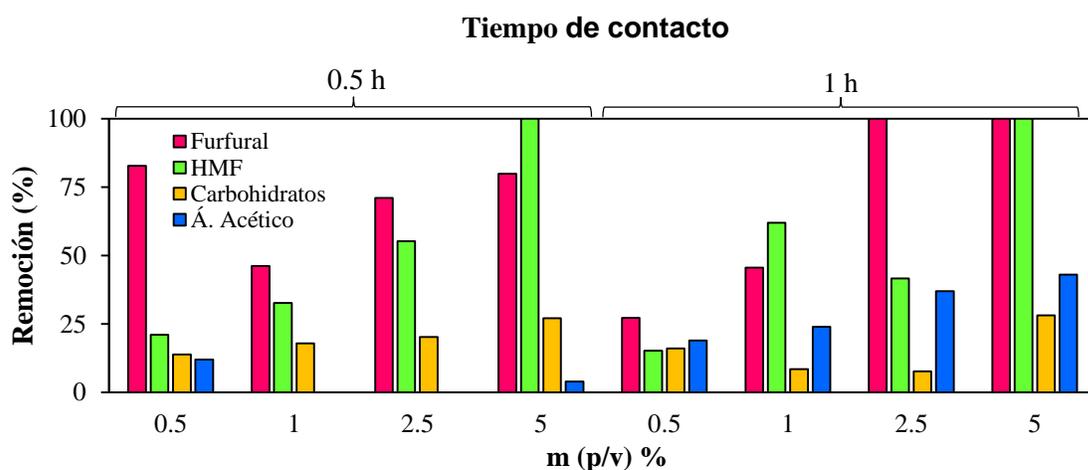
**Tabla 6.35.** Remociones de furfural e HMF con distintas concentraciones de carbón activado y tiempos de contacto a 25 °C.

Condiciones		Furfural	HMF
m %(p/v)	Tiempo (h)	Ce (mg/g)	Ce (mg/g)
0.5	0.5	4.1	37.9
1	0.5	3.2	10.6
2.5	0.5	2.1	6.5
5	0.5	1.9	3.7
0.5	1	3	12.5
1	1	3.9	12.6
2.5	1	9.3	2.4
5	1	1.9	4.6

Ce: mg de inhibidor adsorbido por gramo de carbón activado, m: g de carbón activado por volumen de hidrolizado.

El incremento de la concentración de carbón activado de 1 a 2.5% (p/v) disminuyó el rendimiento de adsorción del hidroximetilfurfural por gramo de carbón activado de 12.6 a 2.4 mg/g (Tabla 6.3). En el caso del furfural, al incrementar la concentración de carbón activado de 2.5 a 5% (p/v) los rendimientos disminuyeron de 9.3 a 1.9 mg/g. Lee et al. (2011) y Soleimani et al. (2015) también aplicaron carbón activado para la remoción de inhibidores y observaron que hubo una mayor remoción de inhibidores con la concentración mayor de carbón activado.

Con la concentración de 5% (p/v) de carbón activado, un tiempo de contacto de 1 h a 25 °C se removió el 100% de los furfurales (Figura 6.2).



**Figura 6.2** Remoción de los inhibidores y carbohidratos durante la destoxificación a 25 °C bajo las condiciones de la tabla 6.3.

En la tabla 6.4 se observa que al realizar la destoxificación con carbón activado a temperaturas menores a las reportadas por otros autores fue posible remover el 100% de los furfurales. Esto se debe a que el carbón activado tiene la capacidad de adsorber los inhibidores sin la necesidad de incrementar la temperatura y además el bajo pH de los hidrolizados de bagazo de agave ayudo en el proceso.

**Tabla 6.4** Comparación entre remociones de los inhibidores con carbón activado.

Hidrolizados ácidos	Concentración		Condiciones			Remoción		Referencia	
	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	T. (°C)	CA. %(p/v)	pH	TC. (h)	Furfural (%)		HMF (%)
Madera	0.78	0.13	50	5	5.8	1	98	100	Lee et al. (2011)
Madera	0.78	0.13	50	10	5.8	1	100	100	Lee et al. (2011)
Eucalipto	0.03	0.27	30	5	5.5	0.5	100	100	Villareal et al. (2006)
Eucalipto	0.03	0.27	30	5	1.8	1	100	100	Villareal et al. (2006)
B. De agave	0.2	0.09	25	5	0.7	1	100	100	Este estudio

T. Temperatura, CA. Carbón activado, TR. Tiempo de contacto.

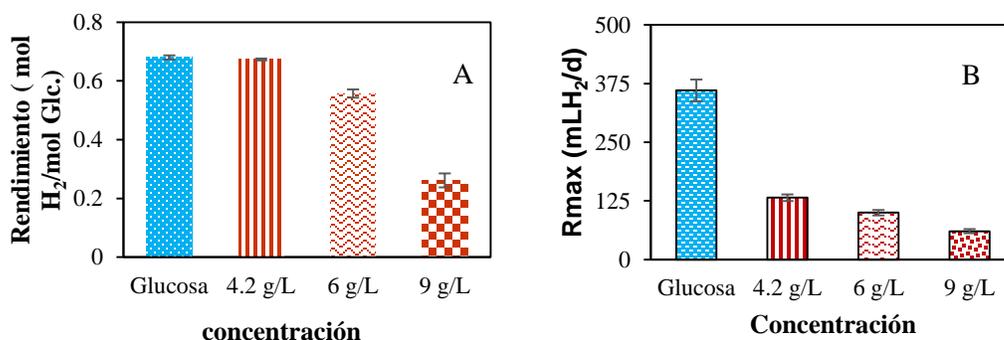
### 6.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN LOTE A PARTIR DE HIDROLIZADOS ÁCIDOS SIN Y CON DESTOXIFICACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES

En este experimento se evaluó la producción de hidrógeno con diferentes concentraciones de los hidrolizados ácidos. Las gráficas de la cinética de producción de H<sub>2</sub> fueron ajustadas a la ecuación de Gompertz donde obtuvieron valores de R<sup>2</sup> mayores al 0.92. A partir de este ajuste se obtuvieron datos como el tiempo de retardo, la velocidad de producción máxima, el volumen acumulado y los rendimientos de cada concentración.

El rendimiento de hidrógeno a partir del sustrato modelo fue de 0.68 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa con una velocidad de 360 mL/d (Figura 6.3). Este rendimiento se encuentra por debajo de los valores teóricos (4 o 2 dependiendo si ruta metabólica se genera acetato o butirato) (Kongjian *et al.*, 2009). Autores como Alvarado-Michi *et al.* (2017) han reportado rendimientos de 1.8 mol de H<sub>2</sub>/mol de xilosa. La diferencia de rendimientos puede deberse a la afinidad del inóculo a degradar hexosas o pentosas (Arriaga *et al.*, 2013)

Al realizar el análisis de la producción de H<sub>2</sub> a distintas concentraciones de hidrolizados ácidos sin tratamiento, se observó que la remoción del sustrato incrementó del 68 al 90%. Estos valores de remoción no se ven reflejados en la producción de hidrógeno ya que los rendimientos disminuyeron de 0.7 a 0.2 mol de H<sub>2</sub>/mol de glucosa. Esto pudo deberse a que los azúcares fueron utilizados para la formación de metabolitos que no contribuyen a la generación de H<sub>2</sub> como propionato, etanol y lactato (Zhang *et al.*, 2006) (Figura 6.3).

Los rendimientos de este estudio fueron menores a los reportados por Arreola- Vargas *et al.* (2016) y Valdez- Guzmán *et al.* (2019) quienes también trabajaron con hidrolizados ácidos de bagazo de agave y reportan valores de 1.7 y 1.2 mol H<sub>2</sub>/mol carbohidrato, respectivamente. En cuanto a la velocidad de producción de H<sub>2</sub> de este estudio se fueron de 5.5- 2.5 mL H<sub>2</sub>/h, 3.6 y 7.2 veces menor a lo reportado por Arreola-Vargas *et al.* (2016) y Valdez- Guzmán *et al.* (2019) quienes produjeron 40 mL de H<sub>2</sub>/h y 20 mL H<sub>2</sub>/h. Los altos rendimientos y velocidades que reportan estos autores se deben a las relaciones sustrato-inóculo (S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>) que tienen estos trabajos, ya que van desde 0.34- 1.7 y 0.05 -0.5 g sustrato/g inóculo, respectivamente.



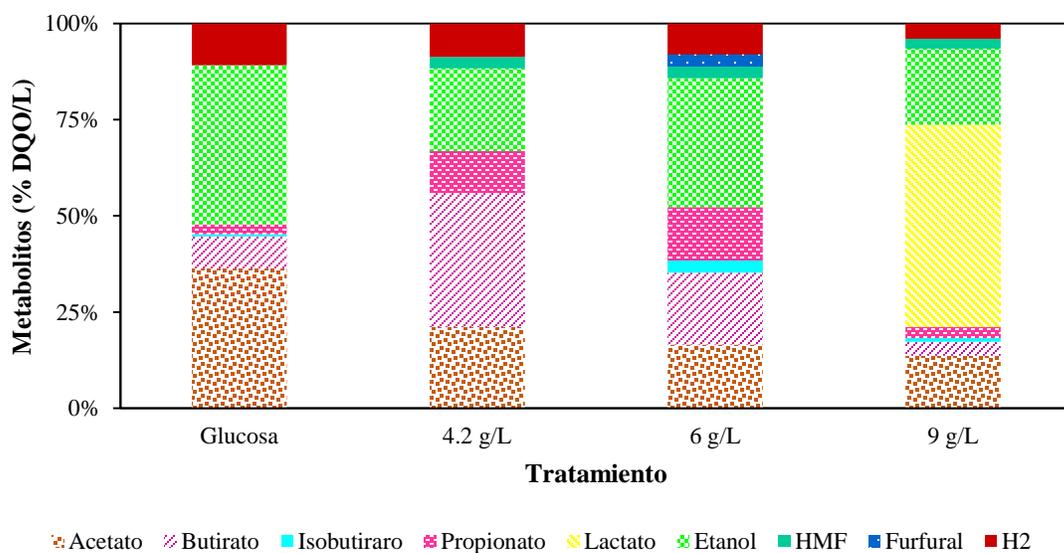
**Figura 6.3** Resultados de la producción de hidrógeno con diferentes concentraciones hidrolizados ácidos de bagazo de agave. A) Rendimientos, B) Velocidad de producción de H<sub>2</sub>.

La producción de H<sub>2</sub> puede verse reflejada en los metabolitos generados en el proceso. En la figura 6.4 se muestran los metabolitos que se generaron a partir de la glucosa, en su mayoría fueron acetato y etanol, en menor proporción se produjo propionato y butirato y no se detectó lactato.

En las concentraciones de 4.2, 6 g/L de hidrolizados ácidos se puede observar principalmente la producción de acetato, butirato y etanol y en la concentración de 9 g/L predominó la generación de lactato (Figura 6.4).

Conforme se incrementa la concentración del hidrolizado ácido de bagazo de agave de 4.2- 9 g/L, la concentración del acetato se mantiene entre el 21 y 13%, la concentración del butirato disminuye de 35 a 3% y el propionato de 10- 3%, en el caso del etanol la concentración incrementa de 21 a 33% y finalmente decae a 19%. No se detectó lactato en las concentraciones de 4.2 y 6 g/L, pero al incrementar la concentración del hidrolizado ácido a 9 g/L, este metabolito representó el 52% de la DQO.

En este estudio a pesar de haber realizado un tratamiento térmico para seleccionar a los microorganismos productores de H<sub>2</sub>, los inhibidores que se encuentran en el hidrolizado pudieron intervenir en las rutas metabólicas generadoras de H<sub>2</sub> y desviarlas hacia otras en las que se genera etanol, acetona, lactato y propionato a partir de los carbohidratos disponibles (Ec. 7), justificando así los bajos rendimientos (Antonopoulou *et al.*, 2010; Contreras-Dávila *et al.*, 2017; Ezeji *et al.*, 2007; Lukajtis *et al.*, 2018)



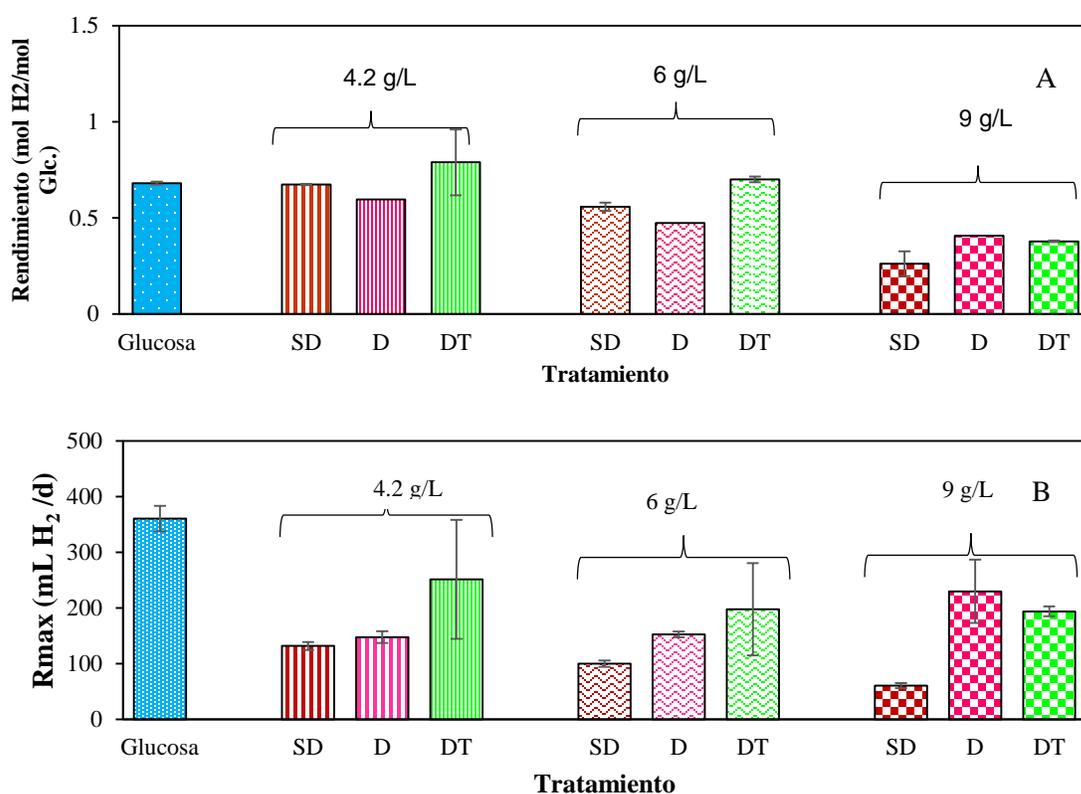
**Figura 6.4** Metabolitos generados por el control (glucosa) y el hidrolizado ácido a distintas concentraciones.

Después de observar la tendencia de la disminución los rendimientos y la velocidad de producción al incrementar las concentraciones de los hidrolizados ácidos sin tratamiento, se procedió a evaluar la producción de H<sub>2</sub> de los hidrolizados ácidos con el tratamiento de destoxificación.

Las condiciones para la destoxificación se seleccionaron de acuerdo a los resultados de la etapa experimental 6.2. Eligiendo 25 °C, 5% (p/v), 1h (D) en la que se eliminaron los furfurales y en la condición de destoxificación a 50 °C, 0.5% (p/v), 0.5 h (DT) en la que se removió un mayor porcentaje de ácido acético.

El análisis de los resultados se realizó mediante una prueba de ANOVA y Tukey (Anexo 1) mostró que la destoxificación DT y la dilución a 4.2 y 6 g/L mejoran significativamente (3 y 2.6 veces más) los rendimientos con respecto al hidrolizado sin tratamiento ( $p>0.05$ ). En cuanto la  $R_{max}$  (Velocidad de producción) los hidrolizados sin tratamiento a una concentración de 4.2 g/L tuvieron diferencia significativa (2.8 veces más) con respecto a los hidrolizados con tratamientos ( $p>0.05$ ).

Los rendimientos obtenidos del hidrolizado sin destoxificar (SD) tiene rendimientos de 0.7-0.2 mol  $H_2$ /mol glucosa, con la destoxificación a 25 °C (D) va de 0.6 a 0.4 mol  $H_2$ /mol glucosa y con la destoxificación a 50 °C tiene rendimientos de 0.8 a 0.4 mol  $H_2$ /mol de glucosa. Esto pudo deberse a que en los hidrolizados destoxificados DT se removió un mayor porcentaje de ácido acético, y la baja concentración de este inhibidor tuvo un mayor efecto en la producción de  $H_2$  que la ausencia de los furfurales (Figura 6.5). Al encontrarse en estas concentraciones específicas los compuestos bioestimularon a los microorganismos productores de  $H_2$  y así incrementaron los rendimientos (Durán *et al.*, 2018).



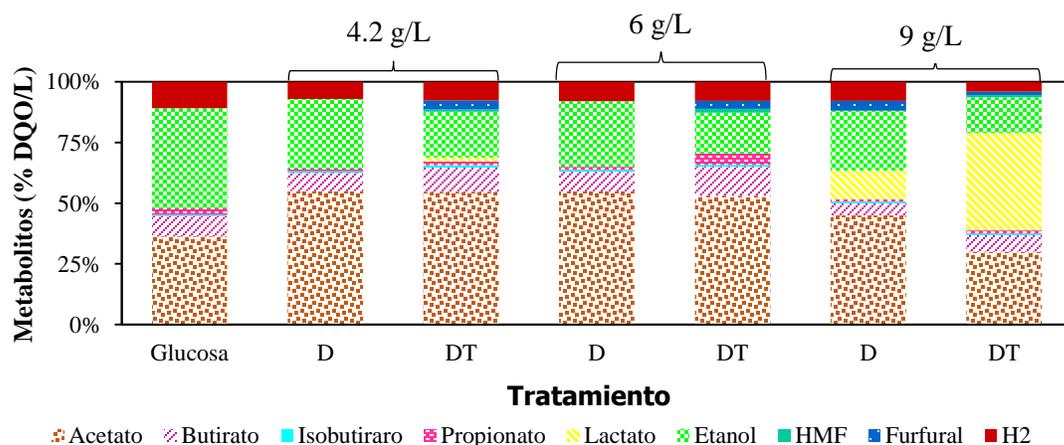
**Figura 6.5** Comparación entre los tratamientos de destoxificación. A) Rendimientos, B) Velocidad de producción.

Para analizar los resultados de la producción de  $H_2$  en lote con los hidrolizados sin y con tratamiento se realizaron pruebas estadísticas como ANOVA y Tuckey ( Anexo 1.2) en la cuales se observa que entre los hidrolizados sin y con tratamiento a una concentración de 4.2 g/L durante la producción de  $H_2$ , en cuanto al rendimiento, velocidad de producción y producción máxima no hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ), en cambio con una concentración de 6 g/L se observaron diferencias significativas en cuanto al rendimiento y producción máxima, el tratamiento con destoxificación a

50°C (DT) fue el que tuvo 1.34 veces más producción que el hidrolizado sin tratamiento y con tratamiento D. En el caso de la concentración a 9 g/L hubo diferencia significativa en la velocidad de producción, el hidrolizado con tratamiento D fue 2.4 veces mayor al hidrolizado sin tratamiento (SD) y DT fue 1.5 veces mayor al hidrolizado SD y no hay diferencia significativa en cuanto a los rendimientos y producción máxima entre los hidrolizados sin tratamiento y con tratamiento D y DT.

En la figura 6.6 se muestran la disminución o eliminación de la concentración de los inhibidores que se encontraban en el efluente. Alvarado-Michi et al. (2018) y Parajó et al. (1997) le atribuyen la disminución en la concentración del furfural e hidroximetilfurfural a una destoxificación biológica realizada por especies como *Clostridium*, bacterias entéricas, lácticas y enzimas como la alcohol deshidrogenasa que transforman el furfural e hidroximetilfurfural en compuestos menos tóxicos (Akobi et al., 2016; Chandel et al., 2011) que pueden ser utilizados como fuente de carbono como el furfural alcohol e hidroximetilfurfural alcohol (Sambusiti et al., 2016; Zhang et al., 2013).

Al igual que en los metabolitos generados por los hidrolizados ácidos sin tratamiento, el acetato y el etanol fueron los que más se generaron en las concentraciones de 4.2 y 6 g/L de los hidrolizados destoxificados. El lactato que se encontró en la concentración de 9 g/L con la destoxificación D y DT pudo ser generado por dos distintas rutas, la homofermentativa (Ec. 8) o heterofermentativa (Ec. 9). El lactato es generado por bacterias productoras del ácido láctico, las cuales inhiben la actividad de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> (Elbeshbishy et al., 2017). Noike et al. (2002) explicaron que las bacterias lácticas tienen dos tipos de relaciones: relación de competición en la que consumen carbohidratos para generar ácido láctico (Ec. 9) (Antonopoulou et al., 2010) y de inhibición sobre las bacterias productoras de H<sub>2</sub>, ya que estos microorganismos son conocidos por sus actividades antimicrobianas ya que excretan bacteriocinas.



**Figura 6.6** Metabolitos generados durante la fermentación oscura en lote de los hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados a distintas concentraciones.

En cuanto a los rendimientos de la producción de biohidrógeno, en la tabla 6.5 se puede observar que los hidrolizados ácidos sin destoxificación y destoxificados a 50 y 25 °C son menores a los reportados por otros autores, esto se debe a que los otros autores inocularon con base en la concentración de g SSV/L (10, 5.24, 4.5) o con cepas puras en el caso de Patra et al. (2008).

Por lo tanto estos autores trabajaron con relaciones sustrato- inóculo menores (0.05-1.7), es decir, con un contenido mayor de microorganismos y con biomasa lignocelulósica diferente.

**Tabla 6.5** Comparación entre los rendimientos de hidrógeno a partir de materiales lignocelulósicos.

<b>Material</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>mL H<sub>2</sub>/g bagazo</b>	<b>Referencia</b>
Caña de azúcar	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5%	156	Pattra et al. (2008)
Agave	HCl 2.7%	137	Arreola-Vargas et al. (2016)
Agave	HCl 2.7%	34	Arreola-Vargas et al. (2016)
Agave	HCl 1.9% D1	92	Valdez- Guzmán et al. (2019)
Agave	HCl 1.9%	68	Valdez- Guzmán et al. (2019)
Paja de avena	HCl 2%	42	Arreola-Vargas et al. (2015)
Trigo	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	35	Fangkum et al. (2011)
Agave	HCl 1.9%(4.2 g/L)	40	Este estudio
Agave	HCl 1.9%(6 g/L)	32	Este estudio
Agave	HCl 1.9%(9 g/L)	15	Este estudio
Agave	HCl 1.9% D(4.2 g/L)	35	Este estudio
Agave	HCl 1.9% D(6 g/L)	27	Este estudio
Agave	HCl 1.9% D(9 g/L)	24	Este estudio
Agave	HCl 1.9% DT(4.2 g/L)	31	Este estudio
Agave	HCl 1.9% DT(6 g/L)	41	Este estudio
Agave	HCl 1.9% DT(9 g/L)	22	Este estudio

\*D. Destoxificación a 25 °C, 5% (p/v), 1 h

\*D1. Destoxificación a 25°C, 1% (p/v).

\*DT. Destoxificación a 50 °C, 0.5% (p/v), 0.5 h

## 6.4 REACTOR UASB A DISTINTAS CARGAS ORGÁNICAS

Después de determinar el procedimiento de destoxificación que genera más H<sub>2</sub>, se prosiguió a operar el reactor UASB utilizando hidrolizado ácido destoxificado DT.

El reactor UASB se operó a 35 °C, pH de 4.5, TRH de 11 h y velocidad ascensional de 5 m/h durante 3 semanas. La figura 6.7 muestra la productividad, remoción de carbohidratos y los porcentajes de H<sub>2</sub> durante la operación con cargas orgánicas de 9.5, 13 y 20 g carbohidratos/L-d.

Con una carga orgánica de 9.5 g carbohidratos/L-d (día 1-8) se produjeron 277 ± 185 mL Biogás/L-d y con porcentajes de hidrógeno del 14.6 ± 6%. En esta etapa se produjo un promedio de 0.04 L H<sub>2</sub>/L-d y rendimientos de 0.03 mol H<sub>2</sub>/mol de carbohidrato. Al incrementar la carga orgánica a 13 g carbohidratos/L-d (día 9- 14), la producción de biogás incrementó a 612 ± 15 mL Biogás/L-d, con un porcentaje de 11.5% de H<sub>2</sub> y después disminuyó a 395 ± 40.5 mL Biogás/L-d con una composición de 11.7% de H<sub>2</sub>, obteniendo productividades de 0.071 L H<sub>2</sub>/L-d y rendimientos de 0.04 mol H<sub>2</sub>/mol de carbohidratos y con una carga orgánica de 20 g carbohidratos/L-d (día 14.5-18.5) se observó una disminución sustancial en la producción de biogás, ya que solo se produjeron 10 mL Biogás/L-d y no se detectó la producción de H<sub>2</sub> (Figura 6.7).

En la tabla 6.6 se puede observar que las productividades de este trabajo son menores a las reportadas por Arriaga et al. (2011) (1.9 L H<sub>2</sub>/ L-d) quienes trabajaron con hidrolizados ácidos de paja de avena en reactores de lecho empacado y con TRH menor. Kirli et al. (2018) y Gorgec et al. (2019) usaron hidrolizados ácidos de trigo para la producción de H<sub>2</sub>, en ese estudio atribuyen las bajas productividades a los largos TRH, al producir 0.77 L H<sub>2</sub>/L-d a un TRH de 13 h y este incrementaba a 1.75 L H<sub>2</sub>/L-d al reducir el TRH a 2 h, esto se asoció principalmente a una mejor transferencia de masa al existir un mayor contacto de los microorganismos con el sustrato al operar reactores de biopelícula, con la ventaja del volumen vacío ya que proporciona mejor liberación de la fase líquida al espacio de cabeza (Como lo cita Gorgec *et al.*, 2019 de Lee *et al.*, 2003). Aunado a esto, los bajos TRH (2-8 h) pueden mejorar la liberación de hidrógeno y evitar la conversión adicional de H<sub>2</sub> a metano o hacia rutas homoactogénicas (Kirli *et al.*, 2018), ya que limita el tiempo de los microorganismos para usar el sustrato de manera más eficiente. (Gorgec *et al.*, 2019).

Por lo tanto el TRH tiene un efecto en la producción de H<sub>2</sub> dependiendo del tipo de biomasa inmovilizada (Como lo cita Gorgec *et al.*, 2019 de Lee *et al.*, 2003).

Durante la operación del reactor también se midieron el consumo de los carbohidratos y los metabolitos que se generaron.

Con la carga orgánica de 9.5 g carbohidratos/L-d, el consumo de carbohidratos osciló entre el 78 y 100%, con una carga orgánica de 13 g carbohidratos/L-d la remoción de los carbohidratos se mantuvo entre el 82 y 89% y con 20 g carbohidratos/L-d el consumo de carbohidratos disminuyó drásticamente al 29% por 2 días y después incremento paulatinamente al 69% (Figura 6.7).

Las bajas productividades de H<sub>2</sub> y los altos porcentajes de remoción sugieren que la mayoría de los azúcares consumidos se utilizaron para producción de biomasa y en la generación de metabolitos que no están relacionados con la producción de H<sub>2</sub> (Arriaga *et al.*, 2011).

Los metabolitos que se produjeron con una carga 9.5 g carbohidratos/L-d fueron en su mayoría acetato (1.5 g DQO/L) y butirato (1.1 g DQO/L), también se encontraron pequeñas trazas de etanol (0.07 g DQO /L), furfural (0.05 g/L) e hidroximetilfurfural (0.05 g/L). Al incrementa la carga orgánica a 13 g carbohidratos/L-d predominó el butirato (4 g DQO/L) y el acetato (1.7 g DQO/L). Con la carga orgánica de 20 g carbohidratos/L-d, la producción de metabolitos disminuyó de entre 1- 3 g DQO/L durante 2 días. El lactato fue metabolito que se encontraba en mayor proporción en este periodo (0.77

g DQO/L) y la producción de acetato y butirato disminuyó a 0.5 y 0.2 g DQO/L, respectivamente. Dos días y medio después la producción de AGVs incrementó (5 g DQO/L), sin embargo el lactato formaba la mayor parte de los metabolitos (77%) (Figura 6.8).

La producción de acetato pudo no estar ligada a la producción de H<sub>2</sub> debido a las bajas productividades (Saady *et al.*, 2013), sin embargo, la producción de butirato puede estar directamente relacionada a la producción de H<sub>2</sub> (Reginatto *et al.*, 2015).

El lactato, propionato y etanol son metabolitos que no están directamente relacionados con la producción de hidrógeno. Gorgec *et al.* (2019) y Si *et al.* (2015) atribuye su generación a los largos TRH (6-8 h), ya que la exposición de los microorganismos durante largos periodos de tiempo a los AGVs puede redirigir las rutas metabólicas hacia otras que no generan H<sub>2</sub> o lo consumen (Como lo cita Kirli *et al.*, 2018 de Basile *et al.*, 2010, Junior *et al.*, 2014, Jo *et al.*, 2008 y Alvarado-Michi *et al.*, 2017) y Saady *et al.* (2013) adjudica la presencia de lactato y alcoholes a que los microorganismos que los producen son más resistentes a los inhibidores que se encuentran en el hidrolizado ácido.

El tipo de inmovilización de la materia orgánica, sustrato y el tiempo de retención hidráulica tienen un efecto sobre la productividad de H<sub>2</sub> (Kirli *et al.*, 2018).

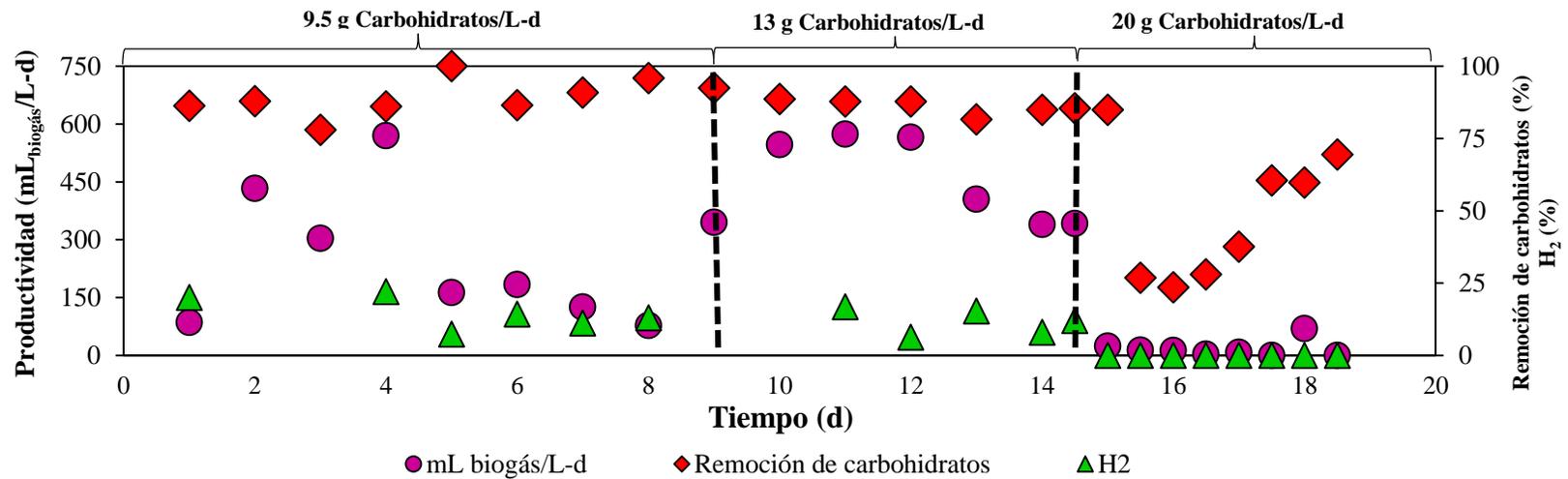


Figura 6.7. Operación del reactor UASB a distintas cargas orgánicas de hidrolizados ácidos destoxificados.

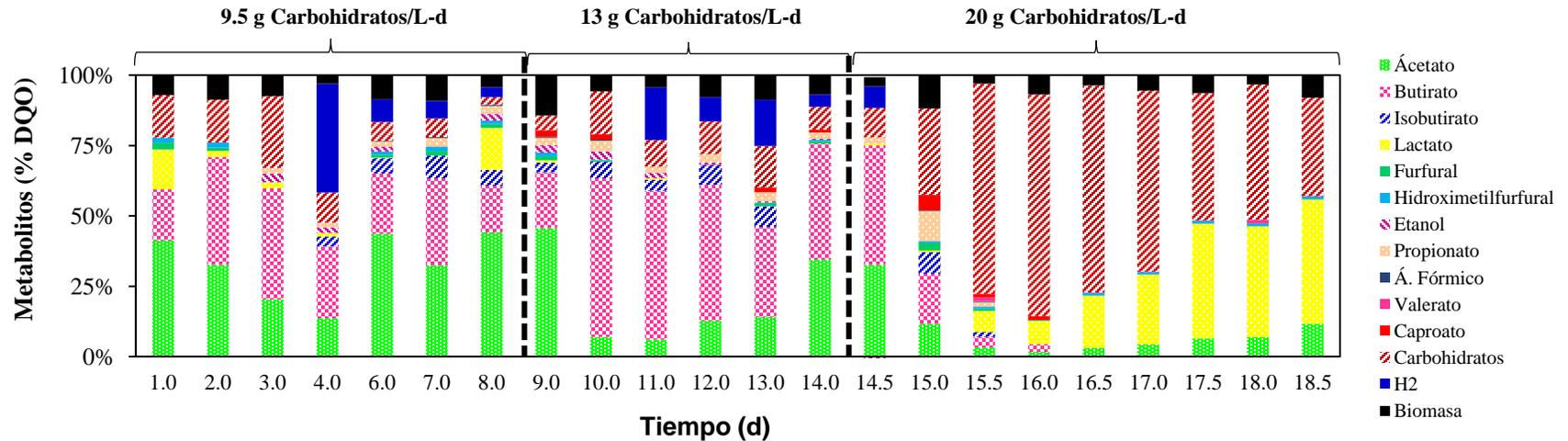


Figura 6.8 Balance de materia durante la operación del reactor UASB a distintas cargas orgánicas.

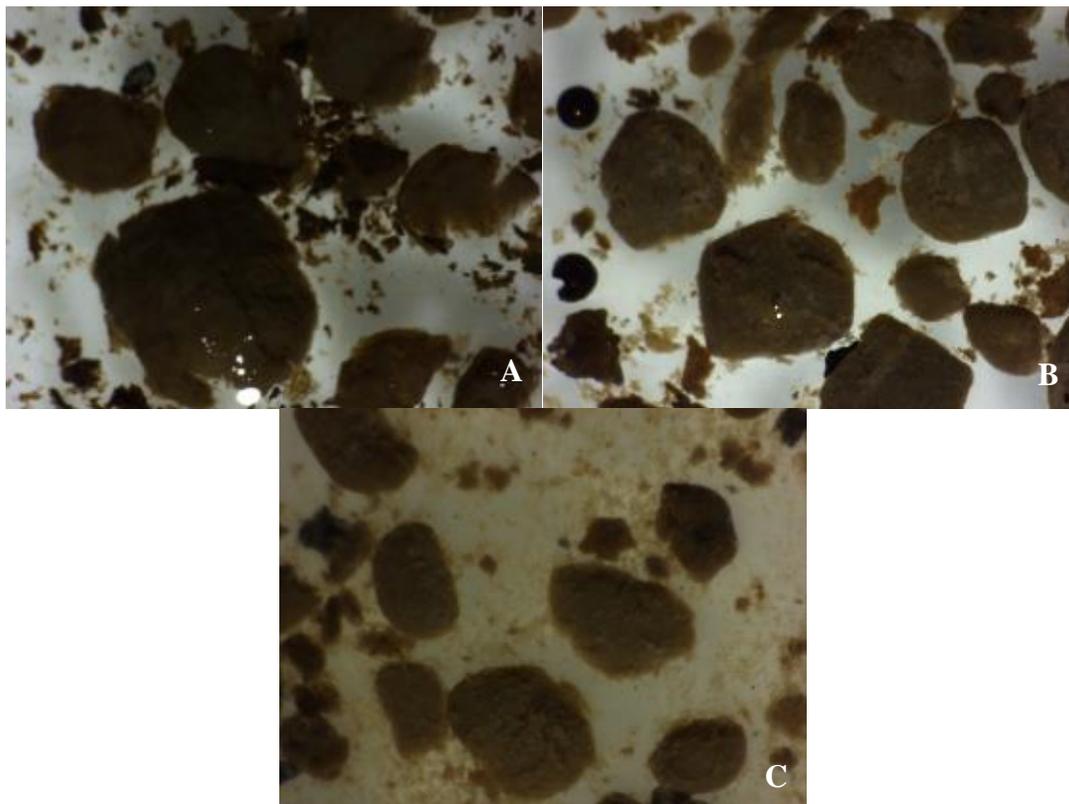
**Tabla 6.6** Operación de reactores en continuo usando como sustrato hidrolizados de material lignocelulósico.

Sustrato	Reactor	carga orgánica (g carbohidrato/L-d)	Productividad (L H <sub>2</sub> /L-d)	Rendimiento. (mol H <sub>2</sub> /mol carbohidratos)	Referencia
Hidrolizado de paja de trigo	Reactor de lecho empacado	60	1.75	1.6	Kirli et al. (2018)
		30	1.46	1.5	
		20	1.26	1.5	
		12	1.28	1.4	
		9.2	0.77	0.6	
Hidrolizado de trigo residual	UPBR	360	0.65	0.93	Gorgec et al. (2019)
		180	1.4	1.61	
		120	2.51	5.19	
		80	1.63	3.70	
		60	0.67	0.76	
Hidrolizado de paja de arroz	CECBR	45	0.71	0.16	Liu et al. (2014)
		60	5.52	0.72	
		120	16.32	1.02	
Paja de avena	BF	240	0	0	Arriaga et al. (2011)
		48	1.95	0.2	
		24	1.95	0.2	
Hidrolizado de bagazo de agave	ASBR	0.41	0.6	2.9	Alvarado- Michi et al. (2017)
		5.7	0.05	0.03	
		4.5	0.2	0.17	
Hidrolizados ácidos destoxificados de bagazo de agave	UASB	3.15	0.2	0.24	Este estudio
		20	0	0	
		13	0.07	0.04	
		9.5	0.04	0.03	

#### 6.4.1 Integridad de los gránulos

El lodo granular que se utilizó para la operación del reactor UASB con hidrolizados ácidos destoxificados fue previamente utilizado para la producción de H<sub>2</sub> a partir de hidrolizados ácidos.

Autores como Fang et al. (2002a), Hernández-Mendoza et al. (2014) y Hu et al. (2007) han reportado un cambio en la coloración de negro a café durante la operación de reactores productores de H<sub>2</sub> dado que se opera a pH bajos (>6) como se muestra en la Figura 6.9.



**Figura 6.9** Gránulos durante la operación del reactor UASB: A) 9.5 g carbohidratos/L-d. B) 13 g carbohidratos/L-d. C) 20 g carbohidratos/L-d.

Además del cambio de color, los gránulos experimentan modificaciones en su estructura al adaptarse para producir H<sub>2</sub> (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014).

En este estudio se observaron variaciones en el tamaño de los gránulos conforme se incrementaban las cargas orgánicas. Cabe mencionar que las muestras se almacenaron y congelaron para ser medidas al final de la operación del reactor. Con las cargas de 6.5, 13 y 20 g carbohidratos/L-d se obtuvieron diámetros de  $0.7 \pm 0.4$  mm,  $2.1 \pm 0.7$  mm y  $1.52 \pm 0.8$  mm, respectivamente.

El aumento y disminución del tamaño de los gránulos puede deberse al ciclo de formación de los gránulos, ya que al llegar a una etapa crítica de crecimiento (donde se tiene el mayor diámetro) estos tienden a fragmentarse y por consiguiente disminuir su tamaño (Ning *et al.*, 2013, Verawaty *et al.*, 2013). Sin embargo, este incremento del diámetro también puede estar relacionado a los altos porcentajes de remoción y la baja productividad de H<sub>2</sub>, asumiendo que los azúcares contenidos en el hidrolizado ácido se dirigieron en su mayoría para el crecimiento de la biomasa.

Con la última carga orgánica (20 g carbohidratos/L-d) se observan gránulos de gran tamaño, sin embargo su apariencia no es compacta como en las fotos de los gránulos anteriores, estos se ven esponjosos y amorfos. Esto puede deberse a la aparición y proliferación de microorganismos filamentosos ya que al operar el reactor por largos periodos de tiempo se llega a descontrolar el tiempo de retención celular. Este descontrol es ocasionado por la biomasa que muere, ya que se desprende del gránulo y sale en el efluente (Moura *et al.*, 2018).

Schmidt *et al.* (1995) indicaron que el diámetro de los gránulos varía dependiendo del sustrato, las condiciones de operación y el método analítico.

Jung *et al.* (2013) produjeron H<sub>2</sub> a partir de glucosa y el diámetro de los gránulos oscilaban entre 0.1-3.9 mm con un promedio de 1.86 mm, Fang *et al.* (2001) utilizaron sacarosa como sustrato y el tamaño de los gránulos productores de H<sub>2</sub> varió de 0.9 – 2.5 mm con un 80% en el rango de 1.3-1.9 mm y reportaron que un típico gránulo maduro tenía un diámetro de 1.6 mm. Ning *et al.* (2013) también usaron sacarosa como sustrato e indicó que un gránulo es maduro y estable con un diámetro promedio de 1.2 mm.

Autores como Fang *et al.* (2002a), Hernández-Mendoza y Buitrón (2014), Ning *et al.* (2013) y Chang *et al.* (2004) realizaron mediciones de sus gránulos, y sus diámetros son menores de un 71-84% a los registrados en este trabajo, esto puede deberse a que ellos trabajaron utilizando sustratos modelo como glucosa y sacarosa los cuales fueron más fáciles de asimilar por los microorganismos y al no contener inhibidores tuvieron mayores productividades y rendimientos y por lo tanto una menor cantidad de sustrato se dirigió al crecimiento de los gránulos.

Cabe mencionar que Ning *et al.* (2013) y Fang *et al.* (2002<sup>a</sup>) trabajaron con diferentes cargas orgánicas, Chang *et al.* (2004) y Hernández- Mendoza y Buitrón, (2014) operaron a una carga orgánica fija y también observaron cambios en el diámetro de los gránulos (Tabla 6.7).

**Tabla 6.7** Comparación del tamaño de gránulos productores de H<sub>2</sub>.

Color	Tamaño (mm)			Autor
	Etapas 1	Etapas 2	Etapas 3	
Café	0.7 ±0.4	2.1 ±0.7	1.52 ± 0.8	Este estudio
Café		1.2		Ning <i>et al.</i> (2013)
Café		1.6 ±0.2		Fang <i>et al.</i> (2002 <sup>a</sup> )
Café		2.0 ±0.2	1.4±0.5	Hernández- Mendoza y Buitrón (2014)
	0.2	0.6	0.23	Chang <i>et al.</i> (2004)

\*Etapas 1: Proliferación, Etapas 2: Tamaño crítico, Etapas 3: Fractura y/o abrasión.

#### 6.4.2 Comunidad microbiana

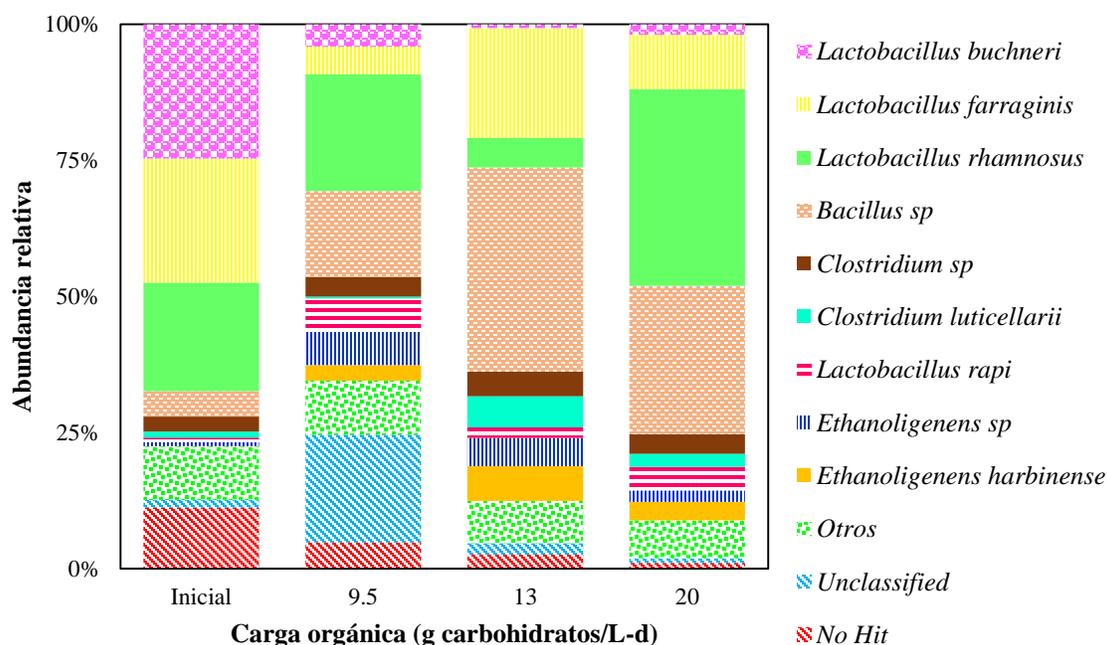
Los microorganismos que abundaron en el lodo granular anaerobio antes de comenzar la operación con el hidrolizado ácido destoxificado fueron *Lactobacillus* 75.5% (*Lactobacillus buchneri* (25%), *Lactobacillus rhamnosus* (20%), *Lactobacillus farragins* (23%) entre otros), *Bacillus* 4.6% y *Clostridium* 3.8% (Figura 6.10).

Al operar el reactor con una carga orgánica de 9.5 g carbohidratos/L-d, *Lactobacillus* se encontraba en un 39%, *Bacillus sp.* incrementó a 15.8% y *Clostridium* en 4.5%. Cuando el reactor se operó a 13 g carbohidrato/L-d, *Lactobacillus* incremento al 68%, *Bacillus sp.* al 37% y *Clostridium* a 1.2%. Esto se debe a que las concentraciones de los inhibidores pudieron estimular el crecimiento de estos

microorganismos (Durán *et al.*, 2018). Con una carga orgánica de 20 g carbohidratos/L-d, *Lactobacillus* disminuyó al 57%, *Bacillus sp.* al 27% y *Clostridium* al 6%.

*Lactobacillus buchneri* es una bacteria del ácido láctico con forma de varilla, es organismo heterofermentativo obligado y tiene la capacidad de convertir ácido láctico a ácido acético tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Anzengruber *et al.*, 2004; Elferink *et al.*, 2001; Heintl *et al.*, 2011), esta especie es utilizada en los ensilajes ya que el ácido acético que produce a partir de ácido láctico funciona como antifúngica (Danner *et al.*, 2003), además produce propionato (Driehuis *et al.*, 1999). *Lactobacillus rhamnosus* es productora de lactato (Reungsang *et al.*, 2013) y está parcialmente ligada con la generación de exopolisacáridos (adhesivos para fijarse en superficies o entre ellos) (Drews *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2000).

*Bacillus sp.* se ha encontrado que este microorganismo puede ser productor de hidrógeno (Nandi *et al.*, 1998, Patel *et al.*, 2014) o contribuir para mejorar los rendimientos de H<sub>2</sub>, al estar en contacto con bacterias como *E. cloacae* (Nandi *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2014) y *Clostridium* es una bacteria por excelencia productora de H<sub>2</sub>.



**Figura 6.10** Comunidad microbiana durante la operación del reactor UASB.

Se observa que cuando hubo una mayor producción de H<sub>2</sub> (71 mL H<sub>2</sub>/L-d), hubo un incremento en la abundancia de los microorganismos productores de H<sub>2</sub>, el incremento se debe a la evolución selectiva del inóculo, ya que favorecen sus condiciones de crecimiento (Alvarado- Michi *et al.*, 2017). Sin embargo el largo tiempo TRH fue un elemento importante para la proliferación de microorganismos productores de lactato (Si *et al.*, 2015)

Liu *et al.* (2014) trabajaron con hidrolizados de paja de arroz sin inhibidores incrementando progresivamente la carga orgánica y alcanzaron productividades de 16 L H<sub>2</sub>/L-d y rendimientos de 1.02 mol H<sub>2</sub>/mol de carbohidrato. Alvarado- Michi *et al.* (2017) utilizaron como sustrato hidrolizados ácidos de bagazo de agave con una carga orgánica de 5.7 g carbohidratos/L-d, obtuvieron productividades y rendimientos similares a los de este estudio, además observaron que especies como *Lactobacillus* formaron una parte importante de la comunidad microbiana y la escasez de especies

productoras de H<sub>2</sub> (*Clostridium* en un 5%). Ambos lodos que se utilizaron para la inoculación y para la formación de la biopelícula en el caso de Liu et al. (2013) tuvieron un pretratamiento térmico para asegurar la eliminación de los microorganismos que no esporulan, y preservar a los que producen H<sub>2</sub>. Sin embargo la presencia de los inhibidores pudo afectar drásticamente a la comunidad microbiana y disminuir la abundancia de las especies *Clostridium* (Tabla 6.8).

**Tabla 66.8** Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de materiales lignocelulósicos.

Sustrato	Carga orgánica (g carbohidrato/L-d)	Comunidad microbiana	Referencia
Glucosa	48	<i>Clostridia</i> e 95.2%	Si et al. (2015)
	96	<i>Clostridia</i> e 76%	
Hidrolizado de paja de arroz	60	<i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i> .	Liu et al. (2014)
	120	<i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i> .	
	240	<i>Clostridium</i> .	
Hidrolizados ácidos de bagazo de agave	3.15	<i>Clostridium</i> 14%	Alvarado- Michi et al. (2017)
	4.5	<i>Clostridium</i> 14%	
	5.7	<i>Clostridium</i> 5%	
Hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados	9.5	<i>Lactobacillus</i> 39%, <i>Bacillus</i> 15.8%, <i>Clostridium</i> 4.5%	Este estudio
	13	<i>Lactobacillus</i> 68%, <i>Bacillus</i> 37.5%, <i>Clostridium</i> 10.2%	
	20	<i>Lactobacillus</i> 57%, <i>Bacillus</i> 27%, <i>Clostridium</i> 6%	

## 7. Conclusiones

En este estudio se evaluó la producción de H<sub>2</sub> en lote y en continuo a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados con carbón activado.

En la destoxificación de los hidrolizados ácidos, la temperatura tuvo un efecto sobre la selectividad en la remoción del furfural y el ácido acético pero no sobre el HMF. La menor temperatura de 25 °C removió más furfural y con la mayor temperatura de 50 °C se removió más ácido acético.

La remoción de los furfurales tuvo una correlación lineal con la concentración de carbón activado y el tiempo de contacto. Por lo tanto, la mayor concentración de carbón activado 5% (p/v) y tiempo de contacto de 1 h logró remover el 100%.

A continuación, se evaluó la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos con diferente contenido de inhibidores (ácido acético, furfural), se encontró que el ácido acético tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre la producción de hidrógeno que los furfurales.

Finalmente se evaluó la producción de H<sub>2</sub> en un reactor UASB usando como sustrato hidrolizados ácidos destoxificados a tres cargas orgánicas (9.5, 13.0 y 20.0 g carbohidratos/L-d). Se obtuvo una producción de H<sub>2</sub> en forma de campana, siendo la carga orgánica media con la que se generó una mayor productividad (71 mL H<sub>2</sub>/L-d) y en la carga orgánica alta la producción de H<sub>2</sub> se disipo. Este comportamiento estuvo relacionado con la comunidad microbiana, la mayor producción de hidrógeno estuvo relacionada con la presencia de *Bacillus* y *Clostridium*, mientras que a la carga orgánica más alta hubo una mayor abundancia de *Lactobacillus*.

### **Productos del proyecto:**

- Cobos-Valdez S., Muños- Paéz KM, Buitrón G., (2018) Biohydrogen production by detoxified hydrolysates of agave bagasse. 1<sup>st</sup> Latin American & Caribbean Young Water Professionals Conference. Presentación oral. 5- 8 Noviembre del 2018.
- Cobos-Valdez S., Muños- Paéz KM, Buitrón G., (2018) Producción de biohidrógeno en un reactor UASB a partir de hidrolizados ácidos destoxificados. Reunión de Redes de Energía 2018. Presentación de póster. 24-28 de Septiembre del 2018. Cuernavaca, Morelos
- Cobos-Valdez S., Muños-Paéz KM, Buitrón G., (2019) Caracterización de la comunidad microbiana durante la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave destoxificados. XVIII Congreso Nacional de Bioenergía y Bioingeniería. Presentación de poster. 23-28 de Junio 2019. León, Guanajuato.

## 7.1 ANEXO 1. Análisis estadísticos

**Tabla 7.1** Pruebas estadística ANOVA para evaluar el efecto de la dilución y destoxificación sobre los rendimientos ( $p > 0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GLD	SC	MC	Prueba- F	Prueba-P
Concentración	8	0.4615	0.057688	12.39	0.001
Error	9	0.0419	0.004656		
Total	17	0.5034			

**Tabla 7.2** Prueba estadística de Tukey para evaluar el efecto de la dilución y destoxificación sobre los rendimientos ( $p > 0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación				
4.2	DT	2	0.785	A				
6	DT	2	0.695	A	B			
4.2	SD	2	0.665	A	B	C		
4.2	D	2	0.59	A	B	C	D	
6	SD	2	0.555	A	B	C	D	
6	D	2	0.47		B	C	D	E
9	D	2	0.405			C	D	E
9	DT	2	0.375				D	E
9	SD	2	0.26					E

**Tabla 7.3** Prueba estadística ANOVA para evaluar los efectos de dilución y destoxificación sobre la producción máxima ( $p > 0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MS	Prueba -F	Prueba- P
Concentración	8	82335	10292	8.92	0.002
Error	9	10389			
Total	17	92724			

**Tabla 77.4** Prueba estadística de Tukey para evaluar el efecto de la dilución y destoxificación sobre la producción máxima ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación		
9	DT	2	507.5	A		
6	DT	2	474	A	B	
9	D	2	458	A	B	
6	SD	2	425.5	A	B	C
4.2	SD	2	359.5		B	C
6	D	2	353.5		B	C
4.2	DT	2	347.5		B	C
9	SD	2	322			C
4.2	D	2	312.5			C

**Tabla 78.5** Prueba estadística ANOVA para evaluar los efectos de dilución y destoxificación sobre la velocidad de producción ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MC	Prueba- F	Prueba- P
Concentración	8	325294	40662	2.84	0.07
Error	9	128782	14309		
Total	17	454076			

**Tabla 7.6** Prueba estadística Tukey para evaluar los efectos de dilución y destoxificación sobre la velocidad de producción ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación	
4.2	SD	2	739.5	A	
9	D	2	645	A	B
4.2	DT	2	642	A	B
6	SD	2	594	A	B
6	D	2	586	A	B
6	DT	2	532	A	B
4.2	D	2	464.5	A	B
9	DT	2	417.5	A	B
9	SD	2	265		B

## 7.2 ANEXO 1.2

**Tabla 7.7** Prueba ANOVA para evaluar los rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MC	Prueba F	Prueba-P
Concentración	2	0.03870	0.01935	1.83	0.302
Error	3	0.03170	0.01057		
Total	5	0.07040			

**Tabla 7.8** Prueba TUCKEY para evaluar los rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación
4.2	DT	2	0.785	A
4.2	SD	2	0.6650	A
4.2	DT	2	0.5900	A

**Tabla 7.9** Prueba ANOVA para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MC	Prueba- F	Prueba- P
Concentración	2	77758	38879	1.51	0.352
Error	3	77227	25742		
Total	5	154985			

**Tabla 7.10** Prueba TUCKEY para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 4.2 g/L ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación
4.2	SD	2	739.5	A
4.2	DT	2	642.0	A
4.2	DT	2	464.5	A

**Tabla 7.11** Prueba ANOVA para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MC	Prueba- F	Prueba- F
Concentración	2	0.051633	0.025817	18.01	0.021
Error	3	0.004300	0.001433		
Total	5	0.055933			

**Tabla 7.12** Prueba TUCKEY para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación	
6	DT	2	0.6950	A	
6	SD	2	0.55500	A	B
6	DT	2	0.4700		B

**Tabla 7.13** Prueba ANOVA para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	DF	SC	MC	Prueba- F	Prueba- P
Concentración	2	4674	2337	0.14	0.877
Error	3	51109	17036		
Total	5	55783			

**Tabla 7.14** Prueba TUCKEY para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 6 g/L ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación
6	SD	2	594.5	A
6	D	2	586	A
6	DT	2	532	A

**Tabla 7.15** Prueba ANOVA para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MC	Prueba -F	Prueba- P
Concentración	2	0.023433	0.011717	5.96	0.09
Error	3	0.0059	0.001967		
Total	5	0.029333			

**Tabla 7.16** Prueba TUCKEY para evaluar el efecto del rendimiento entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación
9	D	2	0.405	A
9	DT	2	0.375	A
9	SD	2	0.26	A

**Tabla 7.17** Prueba ANOVA para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L ( $p>0.05$ ).

Análisis de varianza					
Fuente	GDL	SC	MC	Prueba- F	Prueba- P
Concentración	2	146275	73137.5	491.41	0.000
Error	3	446	148.8		
Total	5	146721			

**Tabla 7.18** Prueba TUCKEY para evaluar el efecto de la velocidad entre los hidrolizados sin tratamiento, con tratamiento de destoxificación a 25 °C y con el tratamiento de destoxificación a 50 °C a una concentración de 9 g/L ( $p>0.05$ ).

Concentración	Tratamiento	N	Medias	Agrupación		
9	D	2	645	A		
9	DT	2	417		B	
9	SD	2	265			C

## 8. Bibliografía

- Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Avila, J., de Jesús Uribe-Beltrán, M., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., y Delgado-Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Industrial crops and products*, 49, 143-149.
- Akobi, C., Hafez, H., y Nakhla, G. (2016). The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. *Bioresource technology*, 221, 598-606.
- Alonso, M. S., y Rigal, L. (1997). Caracterización y valorización del bagazo de Agave tequilana Weber de la industria del tequila. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 3(2), 31-39.
- Alvarado-Michi, E.L. (2017) Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave utilizando cultivos mixtos. Instituto de Ingeniería. Juriquilla, Querétaro, México.
- Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., u Rahman, S., Zhang, R., Liu, G., y Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Amb Express*, 7(1), 72.
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Angelopoulos, K., & Lyberatos, G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource technology*, 99(1), 110-119.
- Antonopoulou, G., Stamatelatu, K., y Lyberatos, G. (2010). Exploitation of rapeseed and sunflower residues for methane generation through anaerobic digestion: the effect of pretreatment. In *Proceedings of the 2nd International Conference of Industrial Biotechnology*.
- Anzengruber, J., Pabst, M., Neumann, L., Sekot, G., Heintl, S., Grabherr, R., y Schäffer, C. (2014). Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. *Glycoconjugate journal*, 31(2), 117-131.
- APHA American Public Health Association, AWWA and WPCF, (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In: Greenberg, A.E., Clesceri, A.E., Eaton, A.D. (Eds.), 18th Ed. American Public Health Association, Washington D.C.
- APHA American Public Health Association, AWWA and WPCF, (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D. (Eds.), 23<sup>th</sup> Ed. American Public Health Association, Washington D.C.
- Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., y Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: a review. *Biomass and bioenergy*, 75, 101-118.
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R. I., Alatraste-Mondragón, F., y Méndez-Acosta, H. O. (2015). Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresource technology*, 181, 191-199.
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., y Méndez-Acosta, H. O. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. *International journal of hydrogen energy*, 41(2), 897-904..

- Arriaga, S., Rosas, I., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(5), 3442-3449.
- Badieí, M., Asim, N., Jahim, J. M., y Sopian, K. (2014). Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *APCBEE procedia*, 9, 170-174.
- Banu, J. R., Kannah, R. Y., Kumar, M. D., Gunasekaran, M., Sivagurunathan, P., Park, J. H., y Kumar, G. (2018). Recent advances on biogranules formation in dark hydrogen fermentation system: Mechanism of formation and microbial characteristics. *Bioresource technology*.
- Barakat, A., Monlau, F., Steyer, J. P., y Carrere, H. (2012). Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresource technology*, 104, 90-99.
- Basile, M. A., Dipasquale, L., Gambacorta, A., Vella, M. F., Calarco, A., Cerruti, P., & d' Ayala, G. G. (2010). The effect of the surface charge of hydrogel supports on thermophilic biohydrogen production. *Bioresource technology*, 101(12), 4386-4394.
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., y Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and sustainable energy reviews*, 36, 91-106.
- Belay, N., Boopathy, R., y Voskuilen, G. (1997). Anaerobic Transformation of Furfural by *Methanococcus deltae* (Delta) LH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(5), 2092-2094.
- Broder, J. D.; Barrier, J. W.; Lee, K. P.; Bulls, M. M. Biofuels system economics. *World Resour. ReV.* 1995, 7 (4), 560-569.
- Buitrón, G., Schoeb, M. E., Moreno-Andrade, I., y Moreno, J. A. (2005). Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water research*, 39(6), 1015-1024.
- Buitrón, G., y Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071-9077.
- Buitrón, G., Kumar, G., Martínez-Arce, A., y Moreno, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H<sub>2</sub>-SBR+ CH<sub>4</sub>-UASB) using tequila vinasses. *international journal of hydrogen energy*, 39(33), 19249-19255.
- Cao, GL, Ren, NQ, Wang, AJ, Guo, WQ, Xu, JF y Liu, BF (2010). Efecto de los inhibidores derivados de la lignocelulosa sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno por *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Revista Internacional de Energía de Hidrógeno*, 35 (24), 13475-13480.
- Carvalho, G. B., Mussatto, S. I., Cândido, E. J., y Almeida e Silva, J. B. (2006). Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology: International Research in Process, Environmental y Clean Technology*, 81(2), 152-157.
- Cardeña, R., Moreno, G., Bakonyi, P., y Buitrón, G. (2017). Mejora de la producción de metano a partir de diversos cultivos de microalgas a través de un nuevo tratamiento previo de ozonización. *Revista de ingeniería química*, 307, 948-954.

- Canilha, L., e Silva, J. B. D. A., y Solenzal, A. I. N. (2004). Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process biochemistry*, 39(12), 1909-1912.
- Chandel, A. K., Kapoor, R. K., Singh, A., y Kuhad, R. C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, 98(10), 1947-1950.
- Chandel, A. K., da Silva, S. S., y Singh, O. V. (2011). Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. In *Biofuel production-recent developments and prospects*. IntechOpen.
- Chang, F. Y., y Lin, C. Y. (2004). Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 33-39.
- Chen, W. H., Sung, S., y Chen, S. Y. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International journal of hydrogen energy*, 34(1), 227-234.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, Y., Ji, X., Zhang, L., Mi, X., y Huang, H. (2013). Removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation. *Bioresource technology*, 144, 680-683.
- Chen, J. Y., Sun, L., Negulescu, I. I., y Xu, B. (2017). Fabrication and evaluation of regenerated cellulose/nanoparticle fibers from lignocellulosic biomass. *Biomass and bioenergy*, 101, 1-8.
- Coote, P. J., Cole, M. B., y Jones, M. V. (1991). Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *Microbiology*, 137(7), 1701-1708.
- Consejo Regulador de Tequila (2016) consulted online: <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb>
- Contreras-Dávila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatríste-Mondragón, F., y Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671-679.
- Cuervo, L., Folch, J. L., y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.
- Cuevas, M., Quero, S. M., Hodaifa, G., López, A. J. M., y Sánchez, S. (2014). Furfural removal from liquid effluents by adsorption onto commercial activated carbon in a batch heterogeneous reactor. *Ecological engineering*, 68, 241-250.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., y Braun, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 562-567.
- Davila-Vazquez, G., Alatríste-Mondragon, F., de León-Rodríguez, A., y Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989-4997.
- De Oliveira, R. A., Rossell, C. E. V., Venus, J., Rabelo, S. C., y Maciel Filho, R. (2018). Detoxification of sugarcane-derived hemicellulosic hydrolysate using a lactic acid producing strain. *Journal of biotechnology*, 278, 56-63.

- Driehuis, F., Elferink, S. O., y Spoelstra, S. F. (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), 583-594.
- Drews, A., Mante, J., Iversen, V., Vocks, M., Lesjean, B., y Kraume, M. (2007). Impact of ambient conditions on SMP elimination and rejection in MBRs. *Water research*, 41(17), 3850-3858.
- 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.
- Durán, U., Coronado-Apodaca, K. G., Meza-Escalante, E. R., Ulloa-Mercado, G., y Serrano, D. (2018). Two combined mechanisms responsible to hexavalent chromium removal on active anaerobic granular consortium. *Chemosphere*, 198, 191-197.
- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., y Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 656-668.
- Elferink, S. J. O., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., y Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(1), 125-132.
- Ezeji, T., Qureshi, N., y Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6), 1460-1469.
- Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., y Palmgren, M. (2016). Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 9(3), 323-337.
- Fang, H. H., Liu, H., y Zhang, T. (2002a). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and bioengineering*, 78(1), 44-52.
- Fang, H. H., y Liu, H. (2002b). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource technology*, 82(1), 87-93.
- Fengel, D. y Wegener, G. (Eds.). (2011) *Madera: química, ultraestructura, reacciones*. Walter de Gruyter.
- Figueroa, M., Del Río, A. V., Campos, J. L., Méndez, R., & Mosquera-Corral, A. (2015). Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(5), 841-851.
- Flores-Sahagun, T. H., Dos Santos, L. P., Dos Santos, J., Mazzaro, I., y Mikowski, A. (2013). Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 45, 153-161.
- Franca, R. D., Pinheiro, H. M., van Loosdrecht, M. C., & Lourenço, N. D. (2018). Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. *Biotechnology advances*, 36(1), 228-246.
- Galbe, M., y Zacchi, G. (2012). Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and bioenergy*, 46, 70-78.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., y Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.
- Ginkel, S. V., Sung, S., y Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental science y technology*, 35(24), 4726-4730.

- Grabber, J. H., Ralph, J., y Hatfield, R. D. (2002). Model studies of ferulate– coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: implications for lignification in grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6008-6016.
- Gomez-Tovar, F., Celis, L. B., Razo-Flores, E., y Alatríste-Mondragón, F. (2012). Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresource technology*, 116, 372-378.
- Gorgec, F. K., y Karapinar, I. (2019). Biohydrogen production from hydrolyzed waste wheat by dark fermentation in a continuously operated packed bed reactor: The effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(1), 136-143.
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., y Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *international journal of hydrogen energy*, 35(19), 10660-10673.
- Guo, X., Cavka, A., Jönsson, L. J., y Hong, F. (2013). Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microbial cell factories*, 12(1), 93.
- Gupta, R., Gautam, S., Shukla, R., y Kuhad, R. C. (2017). Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(5), 4573-4582.
- Harun, M. Y., Radiah, A. D., Abidin, Z. Z., y Yunus, R. (2011). Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource technology*, 102(8), 5193-5199.
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., y Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International journal of hydrogen energy*, 27(11-12), 1339-1347.
- Heinl, S., Spath, K., Egger, E., y Grabherr, R. (2011). Sequence analysis and characterization of two cryptic plasmids derived from *Lactobacillus buchneri* CD034. *Plasmid*, 66(3), 159-168.
- Hernández-Mendoza, C. E., y Buitrón, G. (2014). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*, 89(1), 143-149.
- Hernández-Salas, J. M., Villa-Ramírez, M. S., Veloz-Rendón, J. S., Rivera-Hernández, K. N., González-César, R. A., Plascencia-Espinosa, M. A., y Trejo-Estrada, S. R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, 100(3), 1238-1245.
- Hu, B., y Chen, S. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15), 3266-3273.
- Huang, W., Wang, W., Shi, W., Lei, Z., Zhang, Z., Chen, R., y Zhou, B. (2014). Use low direct current electric field to augment nitrification and structural stability of aerobic granular sludge when treating low COD/NH<sub>4</sub>-N wastewater. *Bioresource technology*, 171, 139-144.
- Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., & Kim, I. S. (2004). Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 297-309.
- Imai, T., y Ohno, T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol*, 61(10), 3604-3608.

- Iranmahboob, J., Nadim, F., & Monemi, S. (2002). Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass and Bioenergy*, 22(5), 401-404.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, 99(14), 6666-6672.
- Jönsson, L. J., y Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103-112.
- Jung, K. W., Cho, S. K., Yun, Y. M., Shin, H. S., y Kim, D. H. (2013). Rapid formation of hydrogen-producing granules in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor coupled with high-rate recirculation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(22), 9097-9103.
- Júnior, A. D. N. F., Wenzel, J., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2014). Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International journal of hydrogen energy*, 39(30), 16852-16862.
- Kamal, S. M. M., Mohamad, N. L., Abdullah, A. G. L., y Abdullah, N. (2011). Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production. *Procedia Food Science*, 1, 908-913.
- Kim, M. S., Cha, J., y Kim, D. H. (2013). Fermentative biohydrogen production from solid wastes. In *Biohydrogen* (pp. 259-283). Elsevier.
- Kirli, B., y Karapinar, I. (2018). The effect of HRT on biohydrogen production from acid hydrolyzed waste wheat in a continuously operated packed bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(23), 10678-10685.
- Kongjan, P., Min, B., y Angelidaki, I. (2009). Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 °C) by mixed culture fermentation. *Water research*, 43(5), 1414-1424.
- Kotay, S. M., y Das, D. (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource—prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 258-263.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P., y Singh, A. (2010). Bioethanol production from lantanacamará (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, 101(21), 8348-8354.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., y Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial y engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729.
- Kumar, G., Cheon, H. C., y Kim, S. H. (2014). Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H<sub>2</sub> production from glucose and galactose. *international journal of hydrogen energy*, 39(30), 16885-16890.
- Kumar, G., Bakonyi, P., Periyasamy, S., Kim, S. H., Nemestóthy, N., y Bélafi-Bakó, K. (2015). Lignocellulose biohydrogen: practical challenges and recent progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 728-737.

- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., y Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 151-159.
- Lee, K. P., Bulls, M., Holmes, J., & Barrier, J. W. (1997). Hybrid process for the conversion of lignocellulosic materials. *Applied biochemistry and biotechnology*, 66(1), 1-23.
- Lee, K. S., Lo, Y. S., Lo, Y. C., Lin, P. J., y Chang, J. S. (2003). H<sub>2</sub> production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology letters*, 25(2), 133-138.
- Lee, J. M., Venditti, R. A., Jameel, H., y Kenealy, W. R. (2011). Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biomass and bioenergy*, 35(1), 626-636.
- Lettinga, G. A. F. M., Van Velsen, A. F. M., Hobma, S. D., De Zeeuw, W., y Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and bioengineering*, 22(4), 699-734.
- Li, M. F., Fan, Y. M., Xu, F., Sun, R. C., y Zhang, X. L. (2010). Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 551-559.
- Liu, C. M., Wu, S. Y., Chu, C. Y., y Chou, Y. P. (2014). Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19317-19322.
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., y Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665-694.
- Mateo, S., Roberto, I. C., Sánchez, S., y Moya, A. J. (2013). Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Industrial crops and products*, 49, 196-203.
- Matsushita, Y., & Yasuda, S. (2005). Preparation and evaluation of lignosulfonates as a dispersant for gypsum paste from acid hydrolysis lignin. *Bioresource Technology*, 96(4), 465-470.
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., y Steinmetz, H. (2011). Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17), 10690-10700.
- Mazloomi, K., y Gomes, C. (2012). Hydrogen as an energy carrier: Prospects and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3024-3033.
- McSwain, B. S., Irvine, R. L., Hausner, M., y Wilderer, P. A. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2), 1051-1057.
- Miyafuji, H., Danner, H., Neureiter, M., Thomasser, C., Bvochora, J., Szolar, O., y Braun, R. (2003). Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(3-4), 396-400.

- Montañez, J. L., Victoria, J. C., Flores, R., y Vivar, M. Á. (2011). Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. *Información tecnológica*, 22(6), 3-14.
- Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G., y Buitrón, G. (2015). Biohydrogen production from industrial wastewaters. *Water Science and Technology*, 71(1), 105-110.
- Moura, L. L., Duarte, K. L. S., Santiago, E. P., Mahler, C. F., y Bassin, J. P. (2018). Strategies to re-establish stable granulation after filamentous outgrowth: Insights from lab-scale experiments. *Process Safety and Environmental Protection*, 117, 606-615.
- Mussatto, S. I. (2002). Influência do tratamento do hidrolizado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. *São Paulo*.
- Mussatto, S. I., y Roberto, I. C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource technology*, 93(1), 1-10.
- Nandi, R., y Sengupta, S. (1998). Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical reviews in microbiology*, 24(1), 61-84.
- Ning, Y. Y., Wang, S. F., Jin, D. W., Harada, H., y Shi, X. Y. (2013). Formation of hydrogen-producing granules and microbial community analysis in a UASB reactor. *Renewable energy*, 53, 12-17.
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., y Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International journal of hydrogen energy*, 27(11-12), 1367-1371.
- NREL/TP-510-42623. 2008. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples.
- Núñez, H. M., Rodríguez, L. F., y Khanna, M. (2011). Agave for tequila and biofuels: an economic assessment and potential opportunities. *Gcb Bioenergy*, 3(1), 43-57.
- Palmqvist, E., y Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, 74(1), 25-33.
- Parajó, J. C., Dominguez, H., y Domínguez, J. M. (1997). Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(1), 18-24.
- Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., y Reungsang, A. (2008). Producción de biohidrógeno a partir de la fermentación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar por *Clostridium butyricum*. *Revista Internacional de Energía de Hidrógeno*, 33 (19), 5256-5265.
- Patel, S. K., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H. J., Lee, J. K., y Kalia, V. C. (2014). Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(27), 14663-14668.
- Paudel, S. R., Banjara, S. P., Choi, O. K., Park, K. Y., Kim, Y. M., y Lee, J. W. (2017). Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges. *Bioresource Technology*, 245, 1194-1205.

- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., y Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6), 2302-2310.
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J. P., Carrère, H., y Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *international journal of hydrogen energy*, 37(4), 3150-3159.
- Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J., y Gao, L. (2009). Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: potential and challenges. *Biotechnology advances*, 27(6), 1051-1060.
- Ren, JL, y Sun, RC (2010). Hemicelulosas. *La paja de cereales como recurso para biomateriales sostenibles y biocombustibles*. Amsterdam: Elsevier , 73-130.
- Reginato, V., y Antônio, R. V. (2015). Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 323-335.
- Reungsang, A., Sreela-or, C., y Plangklang, P. (2013). Non-sterile bio-hydrogen fermentation from food waste in a continuous stirred tank reactor (CSTR): Performance and population analysis. *international journal of hydrogen energy*, 38(35), 15630-15637.
- Roberto, I. C., Laxis, L. S., Barbosa, M. F. S., y De Mancilha, I. M. (1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochemistry*, 26(1), 15-21.
- Rowell, R. M. (2012). *Handbook of wood chemistry and wood composites*. CRC press.
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172-13191.
- Sambusiti, C., Monlau, F., Antoniou, N., Zabaniotou, A., y Barakat, A. (2016). Simultaneous detoxification and bioethanol fermentation of furans-rich synthetic hydrolysate by digestate-based pyrochar. *Journal of environmental management*, 183, 1026-1031.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A. M., Jacobo-Velázquez, D. A., Rodríguez-Rodríguez, J., García-Lara, S., y Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016). Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 113-120.
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Martínez-Pacheco, M. M., Sosa-Aguirre, C. R., y Campos-García, J. (2011). Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of industrial microbiology y biotechnology*, 38(6), 725-732.
- Schmidt, J. E., y Ahring, B. K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and bioengineering*, 49(3), 229-246.
- Seidl, P. R., y Goulart, A. K. (2016). Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2, 48-53.
- Shrestha, S., Fonoll, X., Khanal, S. K., y Raskin, L. (2017). Biological strategies for enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass during anaerobic digestion: current status and future perspectives. *Bioresource technology*, 245, 1245-1257.
- Si, B., Li, J., Li, B., Zhu, Z., Shen, R., Zhang, Y., y Liu, Z. (2015). The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using

upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(35), 11414-11421.

SIAP-SAGARPA (2016) Sistema de Información Agroalimentaria y pesquera. Atlas agroalimentario 2016. [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016).

Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., y Kim, S. H. (2016). Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *international journal of hydrogen energy*, 41(46), 21670-21677.

Sivagurunathan, P., Kumar, G., Mudhoo, A., Rene, E. R., Saratale, G. D., Kobayashi, T., ... y Kim, D. H. (2017). Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: an overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 28-42.

Soleimani, M., Tabil, L., y Niu, C. (2015). Adsorptive isotherms and removal of microbial inhibitors in a bio-based hydrolysate for xylitol production. *Chemical Engineering Communications*, 202(6), 787-798.

Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.

Taherzadeh, M., y Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9(9), 1621-1651.

Tay, S. T. L., Moy, B. Y. P., Jiang, H. L., y Tay, J. H. (2005). Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed. *Journal of Biotechnology*, 115(4), 387-395.

Valdez-Guzmán, B. E., Rios-Del Toro, E. E., Cardenas-López, R. L., Méndez-Acosta, H. O., González-Álvarez, V., y Arreola-Vargas, J. (2019). Enhancing biohydrogen production from Agave tequilana bagasse: Detoxified vs. Undetoxified acid hydrolysates. *Bioresource technology*. 276, 74-80.

Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., y Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147-2153.

Vallejos, M. E., Chade, M., Mereles, E. B., Bengoechea, D. I., Brizuela, J. G., Felissia, F. E., y Area, M. C. (2016). Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial crops and products*, 91, 161-169.

Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z., y Bond, P. L. (2013). Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water research*, 47(14), 5338-5349.

Villanueva-Rodríguez, S. J., Rodríguez-Garay, B., Prado-Ramírez, R., y Gschaedler, A. C. (2015). Tequila: Raw Material, Classification, Process, and Quality Parameters. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 283-289). Elsevier Inc..

Villarreal, M. L. M., Prata, A. M. R., Felipe, M. G. A., y Silva, J. A. E. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 17-24.

- Wang, J., y Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*, 34(2), 799-811.
- Wilén, B. M., & Balmér, P. (1999). The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*, 33(2), 391-400.
- Yee, K. L., Jansen, L. E., Lajoie, C. A., Penner, M. H., Morse, L., y Kelly, C. J. (2018). Furfural and 5-hydroxymethyl-furfural degradation using recombinant manganese peroxidase. *Enzyme and microbial technology*, 108, 59-65.
- Yoon, S. Y., Han, S. H., y Shin, S. J. (2014). The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy*, 77, 19-24.
- Zhao, J., Ou, S., Ding, S., Wang, Y., y Wang, Y. (2011). Effect of activated charcoal treatment of alkaline hydrolysates from sugarcane bagasse on purification of p-coumaric acid. *Chemical engineering research and design*, 89(10), 2176-2181.
- Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., y Jiang, W. J. (2006). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, 41(10), 2118-2123.
- Zhang, D., Ong, Y. L., Li, Z., y Wu, J. C. (2013). Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8. *Biochemical engineering journal*, 72, 77-82.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., y Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in energy and combustion science*, 42, 35-53.