



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

**PRODUCCIÓN TERMOFÍLICA DE METANO A PARTIR DE UN EFLUENTE DE
BIORREFINERÍA LIGNOCELULÓSICA**

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

PRESENTA:
JAIRO MAURICIO CARRILLO OSORIO

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Germán Buitrón Méndez- Instituto de
Ingeniería UNAM

COMITÉ TUTOR
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo-
Instituto de Ingeniería UNAM
Dr. Arturo Sánchez Carmon- CINVESTAV

CD. MX. Noviembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Secretario: Dr. Francisco J. Cervantes Carrillo

1 er. Vocal: Dra. Georgina Fernández Villagómez

2 do. Vocal: Dr. Arturo Sánchez Carmona

3 er. Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis:

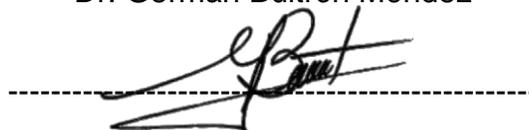
Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas,
Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería.

Se agradece el apoyo de la DGAPA-UNAM (proyecto PAPIIT IT102522) y del Fondo
de Sustentabilidad Energética - CONACYT (proyecto 249564).

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE

Dr. Germán Buitrón Méndez



FIRMA

“La ciencia es fundamental, pero lo que realmente importa es qué hacemos con ella”

Agradecimientos.

A lo maravillosa que es la vida, a todos los seres que me rodean y a esa fuerza de la naturaleza, Dios le llaman algunos.

A mi comité tutorial por sus consejos y guía. Al Dr. Germán, por enseñarme a su manera a siempre buscar ser mejor

A mi familia y amigos porque su energía siempre me impulsó a seguir adelante.

Al CONACyT y la UNAM, la tía Conny que está ahí para poner lo segundo más importante.

Contenido

1. Introducción	12
2. Marco teórico	13
2.1. Los biocombustibles	13
2.1.1. <i>Biocombustibles líquidos avanzados</i>	14
2.1.2. <i>Biorrefinerías lignocelulósicas</i>	15
2.1.3. <i>Aguas residuales de biorrefinerías lignocelulósicas</i>	16
2.2. Procesos anaerobios termofílicos para la producción de metano a partir de aguas residuales	19
2.2.1. <i>Procesos anaerobios termofílicos</i>	21
2.2.2. <i>Microbiología de los procesos anaerobios termofílicos</i>	23
2.3. Operación de reactores anaerobios termofílicos	27
2.3.1. <i>Tiempo de retención hidráulica</i>	29
2.3.2. <i>Carga orgánica</i>	29
2.3.3. <i>Ácidos grasos volátiles</i>	30
2.3.4. <i>Alcalinidad</i>	31
2.4. Producción termofílica de metano a partir de vinazas y efluentes de biorrefinerías	33
3. Hipótesis	35
4. Objetivos	35
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos particulares	35
5. Metodología	36
5.1. Caracterización del efluente	37
5.2. Métodos analíticos	38
5.3. Arranque del reactor anaerobio termofílico	40
5.4. Producción de metano a partir del efluente de biorrefinería	44

5.5. Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica (AME)	45
5.6. Evaluación de la comunidad microbiana	45
5.7. Análisis estadístico.....	46
6. . Resultados y discusión.....	47
6.1. Caracterización del efluente de biorrefinería.....	47
6.2. Arranque del reactor anaerobio termofílico	49
6.3. pH, alcalinidad y ácidos grasos volátiles	51
6.4. Desempeño del proceso de digestión anaerobia	54
6.5. Actividad metanogénica específica (AME)	58
6.6. Cambios en la estructura de la comunidad microbiana.....	59
7. Conclusiones	66
8. Referencias	67

Lista de Figuras

Figura 2-1. Procesos en una biorrefinería para la producción de biocombustibles líquidos de segunda generación (Valdez-Vazquez y Sanchez, 2018).....	15
Figura 2-2. Diagrama simplificado de los procesos de biorrefinería (Azapagic, 2014).	16
Figura 2-3. Diagrama de bloques de las salidas de residuos y aguas residuales dentro del concepto de biorrefinería lignocelulósica (Ruiz et al., 2020).	17
Figura 2-4. Ruta general de las reacciones de Maillard (Peterson et al., 2010).19	
Figura 2-5 Etapas de la digestión anaerobia (Uçkun Kiran et al., 2016)	20
Figura 2-6. Rangos de temperatura para los procesos de tratamiento anaerobio (Vandevivere et al., 2003).	21
Figura 2-7. Relación de las constantes cinéticas de crecimiento bacteriano con la temperatura (Lin et al., 1987).	22
Figura 2-8. Esquema de las interacciones tróficas de las comunidades microbianas anaerobias para la degradación de materia orgánica (Kotsyurbenko, 2010). ..	24
Figura 2-9. Descripción de la ruta metabólica de la metanogénesis, los rayos azules representan bacterias, los soles verdes representan arqueas. (Jia et al., 2017).25	
Figura 2-10. Objetivos de un biorreactor eficiente y los factores que influyen en esta eficiencia (Herrmann y otros., 2018).	27
Figura 2-11. Tipos de biorreactores para la digestión anaerobia basados en sus características de biomasa(Herrmann et al., 2018).....	28
Figura 2-12. Ruta metabólica acidogénica de conversión de moléculas a ácidos grasos volátiles (Zhou et al., 2018).	31

Figura 5-1. Etapas experimentales.....	36
Figura 6-1. Evolución del reactor UASB durante la fase de aclimatación a las condiciones de operación.....	49
Figura 6-2. pH e índice alfa en el reactor.	51
Figura 6-3. Perfil de Ácidos Grasos Volátiles durante la experimentación.	53
Figura 6-4. A) Productividad de metano en el reactor UASB B) Concentración de DQO en el Influyente y Efluente del reactor y C) Concentración de carbohidratos en el Influyente y Efluente del reactor.	56
Figura 6-5. Evolución de la diversidad alfa durante la operación del reactor anaerobio A) índice de diversidad Simpson, B) índice de abundancia Chao-1 para arqueas; C) índice de diversidad Simpson y D) índice de abundancia Chao-1 de bacterias, a distintas etapas de operación.	60
Figura 6-6. Cambios en la estructura de la comunidad microbiana en A) Orden y B) Género, de las muestras tomadas durante diferentes periodos de tiempo.	62
Figura 6-7. Abundancia de bacterias termofílicas a nivel A) Orden y B) Género, en distintas etapas del proceso.	64

Lista de tablas

Tabla 2-1. Características fisicoquímicas de diferentes tipos de vinazas residuales.	18
Tabla 2-2. Efecto de la temperatura en la energía libre de Gibbs de las diferentes reacciones involucradas en la metanogénesis (van Lier, s/f).	23
Tabla 2-3. Géneros y especies encontrados en condiciones termofílicas (Adaptado de Y. Liu, 2010).	26
Tabla 2-4. Estudios realizados con vinazas en condiciones termofílicas	34
Tabla 5-1. Análisis de laboratorio realizados para la caracterización del efluente	37
Tabla 5-2. Resumen de las condiciones de operación del reactor UASB durante la etapa de aclimatación.	42
Tabla 5-3. Resumen de las condiciones de operación en la etapa experimental.	44
Tabla 6-1. Caracterización del efluente de biorrefinería.	47
Tabla 6-2. Resultados obtenidos durante la evaluación del desempeño del reactor UASB.	55
Tabla 6-3. Operación de reactores UASB para el tratamiento de efluentes de biorrefinerías en condiciones termofílicas.	57
Tabla 6-4. Resultados de los parámetros cinéticos de la producción de metano después del tratamiento de un efluente de biorrefinería lignocelulósica.	59
Tabla 6-5. Índices de diversidad alfa obtenidos a distintas etapas de operación.	61

Resumen

El presente estudio evaluó la digestión anaerobia en condiciones termofílicas de un efluente de biorrefinería lignocelulósica (EBL). Se estudió la aclimatación y la actividad del inóculo, el efecto de la carga orgánica y el tiempo de residencia en el desempeño del reactor, así como los cambios en la comunidad microbiana. Se obtuvo un lodo termofílico aclimatado al efluente a los 60 días. Se obtuvieron una producción máxima de metano de 0.4 NL CH₄ / L día y un rendimiento de 167.1 NL CH₄/ kg DQO _{removida} a una C.O. de 8.5 kg DQO/ m³ d. Los resultados obtenidos demostraron una baja actividad metanogénica con respecto a otros lodos anaerobios termofílicos, esto se debe posiblemente a la presencia de compuestos fenólicos en el efluente que presentaron un efecto inhibitorio. Los resultados de secuenciación del gen 16s indicaron un cambio en la comunidad microbiana derivado de la presencia del EBL. Los órdenes de arqueas predominantes fueron Methanobacteriales y Methanosarcinales. Se obtuvo evidencia sobre el rol clave del orden MSBL9 para la digestión anaerobia termofílica del EBL.

Abstract

The present study evaluates thermophilic anaerobic digestion (TAD) of Lignocellulosic Biorefinery Wastewater (LBWW). The acclimation and activity of the inoculum, the effect of the organic loading rates and residence time on the reactor performance and changes on the microbial community were studied. An acclimated thermophilic inoculum adapted to the effluent was obtained at 60 days. Maximum methane production rate of 0.4 NL CH₄/ L day, and a yield of 167.1 NL CH₄/ kg COD removed were obtained at OLR of 8.5 kg COD/ m³ d. Results obtained demonstrated a low methanogenic activity respect other thermophilic sludges, this suggest an inhibitory effect due to the presence of phenolic compounds on LBWW. 16s RNA sequencing indicated a shift in the microbial community due the presence of the LBWW. The predominant archaea orders were Methanobacteriales and Methanosarcinales. Results obtained support a key role of MSBL9 order on TAD of LBWW.

1. Introducción

Mientras la demanda de energía global aumenta, se espera que la cantidad de combustibles consumidos mundialmente se incremente junto con el uso de energía de fuentes fósiles, la cual ocasiona un impacto dañino en el ambiente (Rodionova et al., 2017). Debido a esto, se han buscado diversas alternativas para generar combustibles, siendo la biomasa la única fuente rica en carbono disponible además de las fósiles (Ghatak, 2011).

La biomasa lignocelulósica es el recurso más abundante de la tierra, teniendo el potencial de una fuente de energía renovable, sin embargo, su conversión en biocombustibles y productos de valor agregado representa un gran reto debido a su complejidad estructural (Patel y Shah, 2021). Además, su transformación a través de una biorrefinería genera aguas residuales que representan un potencial riesgo ambiental.

El diseño de sistemas de tratamiento de aguas residuales, específicamente para las biorrefinerías lignocelulósicas es un área de estudio emergente. El tratamiento de este tipo de aguas juega un papel fundamental en el desarrollo comercial de las biorrefinerías lignocelulósicas. Más importante, se ha demostrado que su tratamiento y la recuperación de recursos, representa una forma integral ya que puede reducir el consumo de materias primas, como el gas y el agua (Tobin et al., 2020).

El presente trabajo tiene como objetivo principal el evaluar la producción de metano en condiciones termofílicas (55°C), a partir del efluente generado en las diferentes plataformas de producción de bioetanol bajo el concepto de biorrefinería lignocelulósica. En la primera parte del trabajo, se realiza un análisis del arranque de un reactor anaerobio y su aclimatación al efluente. En la siguiente etapa del proyecto, se estudia la producción de metano durante la operación en continuo del reactor. Finalmente, se hace un análisis de la comunidad microbiana durante toda la operación del reactor anaerobio termofílico.

2. Marco teórico

2.1. Los biocombustibles

Los biocombustibles se obtienen a partir de la biomasa (que es la materia constitutiva de los seres vivos, sus excretas y sus restos no vivos) con mayor o menor grado de procesamiento (Alberto et al., 2016). Los biocombustibles se dividen en dos grupos: biocombustibles de primera generación, los cuales son producidos a partir de biomasa que es alimenticia (por ejemplo, el maíz). Por otro lado, se encuentran los biocombustibles avanzados (también conocidos como de segunda y tercera generación) que utilizan como materia prima biomasa no alimenticia (Figura. 2-1), tales como materiales lignocelulósicos (como el bagazo de caña, el rastrojo, y residuos agroindustriales) y biomasa de cultivos dedicados (como pastos vegetales o algas) (Fiorese et al., 2013).

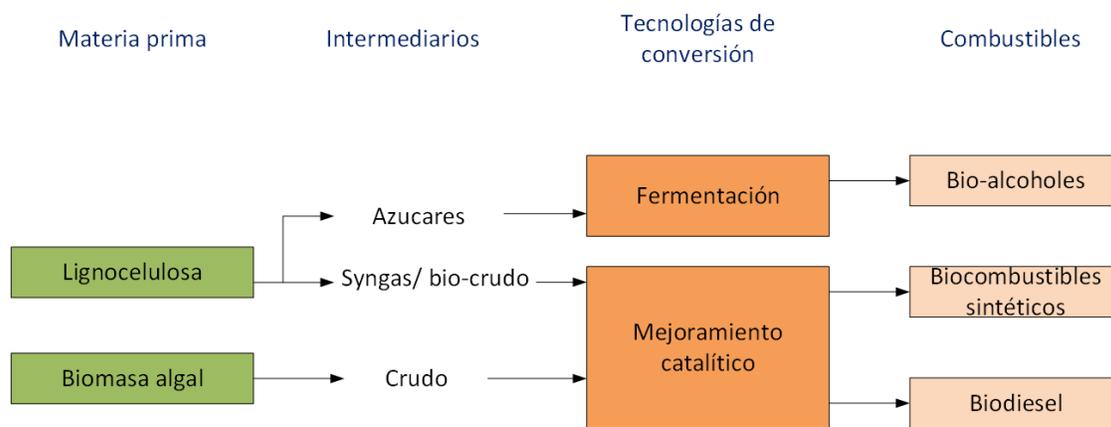


Figura. 2-1. Rutas de conversión de la lignocelulosa (Oh et al., 2018).

Los biocombustibles tradicionales cuentan con una gran cantidad de desventajas que están relacionadas con el tipo de materia prima. Esto se ve reflejado a nivel económico, donde los costos de producción de biodiesel y etanol a partir de cereales o raíces son más altos que el costo de la gasolina o el Diesel (Hamelinck y Faaij, 2006). El precio del etanol de primera generación hasta 2020 ha

estado entre 47-54 EUR/MWh, mientras el precio del crudo ha sido de 19-30 EUR/MWh. Sin embargo, los procesos basados en residuos tienen el potencial de ser competitivos en costos con los precios de los combustibles fósiles, principalmente por la reducción de costos de la materia prima (Saddler et al., 2020). Por esta razón, los biocombustibles avanzados son considerados como una solución prometedora al problema del incremento de la demanda de los biocombustibles a nivel global (Oh et al., 2018).

2.1.1. Biocombustibles líquidos avanzados

Los biocombustibles avanzados son aquellos obtenidos a partir de materiales lignocelulósicos y otros residuos agroindustriales. Estos materiales están compuestos principalmente de celulosa y hemicelulosas, unidas a un polímero aromático (lignina) lo que hace a la estructura robusta y compleja. Otros componentes que se encuentran en menor cantidad pueden ser proteínas, lípidos y cenizas (Ballesteros et al., 2018). De los residuos lignocelulósicos se pueden obtener un amplio rango de productos, tales como azúcares, compuestos fenólicos, entre otros (Bilal et al., 2017).

La tecnología para la producción de biocombustibles avanzados está basada en procesos enzimáticos y de microorganismos que producen azúcares a partir de biomasa y que pueden ser convertidos a alcohol y otros compuestos químicos de interés (Figura 2-1). Valdez-Vazquez y Sanchez (2018) propusieron una línea de producción de biocombustibles líquidos y gaseosos a partir de biomasa lignocelulósica como se muestra en el siguiente esquema:

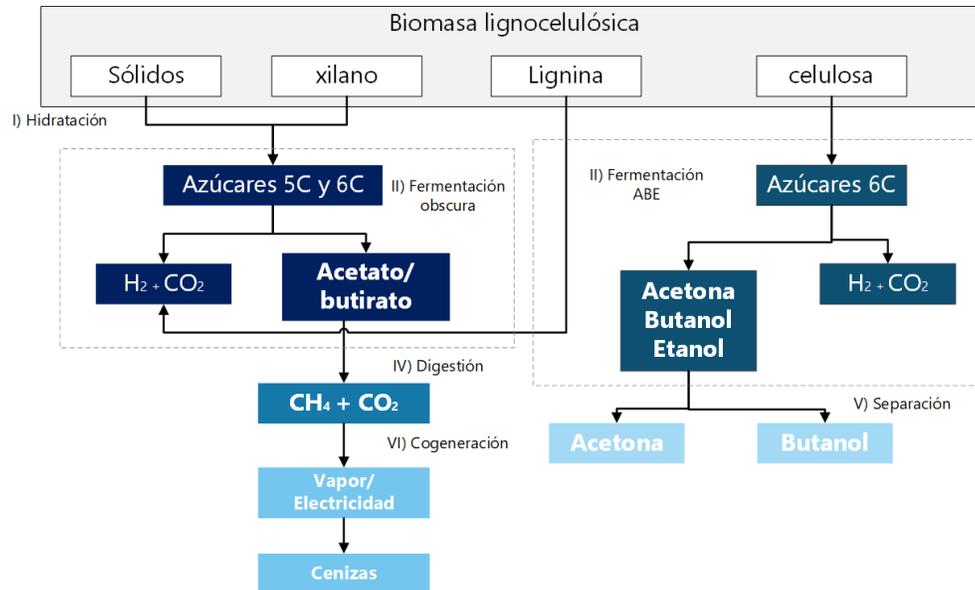


Figura 2-1. Procesos en una biorrefinería para la producción de biocombustibles líquidos de segunda generación (Valdez-Vazquez y Sanchez, 2018).

2.1.2. Biorrefinerías lignocelulósicas

Las biorrefinerías se pueden describir como una ruta de conversión, a través de procesos o “plataformas”, de materias primas de biomasa a productos. El concepto de biorrefinería se ha ido popularizando para la elaboración de un amplio espectro de bioproductos con menores repercusiones socioeconómicas y ambientales en comparación con las refinerías basadas en petróleo (Parajuli et al., 2015).

Bajo este concepto de biorrefinería, es posible obtener diversos productos químicos y energía, a través del refinamiento de materiales lignocelulósicos (Liguori y Faraco, 2016). Las biorrefinerías lignocelulósicas utilizan la biomasa lignocelulósica como base. En una biorrefinería lignocelulósica, los carbohidratos de la biomasa son convertidos a azúcares, llamadas azúcares celulósicas, además de la valorización de la lignina. (Chandel et al., 2018). Existen dos principales tecnologías de conversión que son utilizadas para la valorización de lignocelulosa y que pueden ser clasificadas como bioquímica y termoquímica (Figura 2-2). La primera involucra la hidrólisis de carbohidratos a azúcares solubles, seguida de una fermentación microbiana, mientras que la ruta termoquímica involucra combustión, pirólisis, gasificación o torrefacción (Hassan et al., 2019).

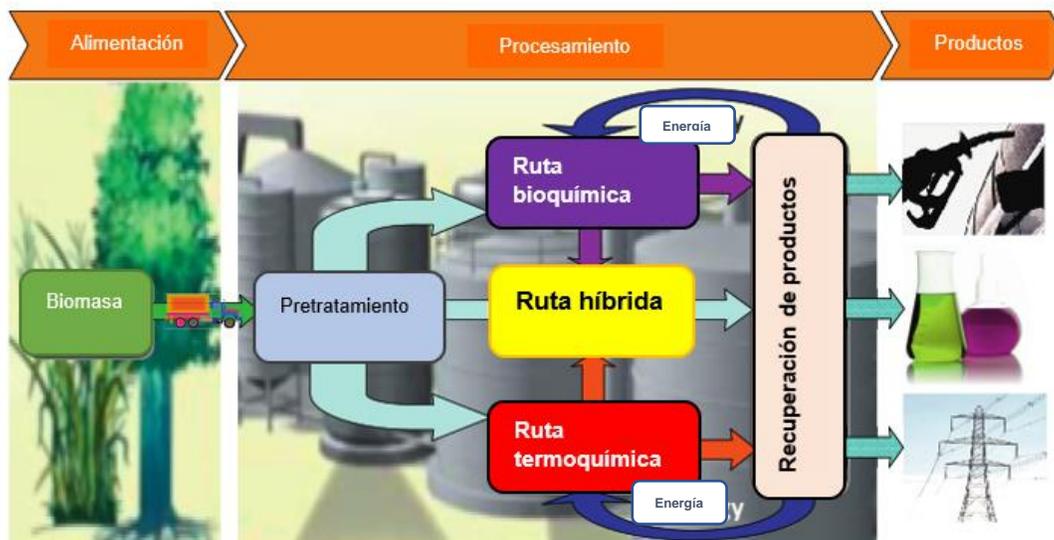


Figura 2-2. Diagrama simplificado de los procesos de biorrefinería (Azapagic, 2014).

Las biorrefinerías lignocelulósicas tienen el potencial de convertirse en fuentes sustentables de productos, sin embargo, la naturaleza recalcitrante inherente de la lignocelulosa agrega cierta complejidad y costos para lograr una escala comercial completa (Usmani et al., 2021). Entre estos desafíos, se encuentra el adecuado tratamiento de las aguas residuales generadas durante la conversión de la biomasa lignocelulósica.

2.1.3. Aguas residuales de biorrefinerías lignocelulósicas

Como cualquier proceso industrial, la producción de biocombustibles genera aguas residuales que pueden ser difíciles de degradar (Clark y Deswarte, 2015). Las aguas residuales de biorrefinerías pueden contener carbohidratos residuales y otros tipos de materia orgánica que ofrecen una potencial fuente de energía (Ragauskas et al., 2006). Entre los residuos de una biorrefinería lignocelulósica, se encuentran: residuos del proceso de pretratamiento; residuos del proceso de fermentación; ricos en ácidos grasos volátiles (acetato y butirato) así como un decantado (Figura 2-3), al cual se le conoce como agua residual de destilación, mosto o vinaza (Buitrón, Hernández-Juárez, et al., 2019; Sanchez et al., 2017; Wilkie et al., 2000).

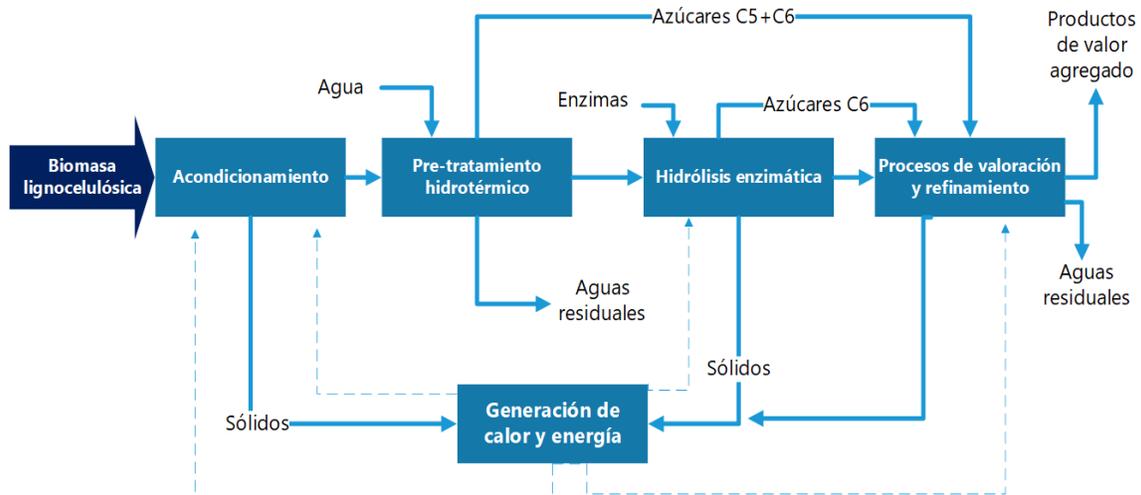


Figura 2-3. Diagrama de bloques de las salidas de residuos y aguas residuales dentro del concepto de biorrefinería lignocelulósica (Ruiz et al., 2020).

Estos residuos se caracterizan por tener altos niveles de materia orgánica en forma de ácidos orgánicos, sin embargo, su contenido de nitrógeno y fósforo es bajo (Tabla 2-1) (Christofoletti et al., 2013). Los residuos de biorrefinerías pueden contener compuestos fitotóxicos, antibacteriales y recalcitrantes. Estos compuestos pueden ser compuestos fenólicos y furfural, los cuales pueden afectar negativamente el crecimiento de microorganismos (Parsaee et al., 2019).

Se ha reportado en la literatura, que la etapa de pretratamiento juega un papel fundamental para un adecuado aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica, sin embargo, una de las principales desventajas relacionadas a esta es la generación de compuestos, derivados de la degradación de azúcares o de la lignina, que puede inhibir la actividad enzimática de otros procesos de la biorrefinería (Liguori y Faraco, 2016). Entre los compuestos inhibitorios generados en esta etapa se encuentran: Compuestos fenólicos como la vainillina, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, coniferil aldehído, alcohol dihidroconifenilico, así como diversos ácidos fenólicos (Patel y Shah, 2021).

Tabla 2-1. Características fisicoquímicas de diferentes tipos de vinazas residuales.

Residuo	DQO total (mg/L)	Sólidos suspendidos totales (SST) (mg/L)	N total (mg/L)	P total (mg/L)	pH	Referencia
Vinaza de producción de bioetanol	421 600	606 100	300	100.5	5.6	Moraes et al., 2015
Vinaza cruda de bioetanol de caña	45 000	41 300	470	170	4.5	Barros et al., 2016
Vinaza de caña de azúcar	163 375	54 250	2000	75	4.11	Parsaee et al., 2019
Vinaza de residuos lignocelulósicos	61 300	ND	2787	28	5.35	Wilkie et al., 2000
Vinaza de melazas de caña	27 800	30 800	244	9.2	4.2	Cabrera-Díaz et al., 2017

Existe también evidencia de la ocurrencia de un tipo de reacción de Maillard en procesos de pretratamiento hidrotérmico de biomasa. Esta reacción ocurre a temperaturas superiores a los 120°C y presiones mayores a 2 atm y es causada por la reacción de grupos amino presentes en las proteínas, las cuales reaccionan con el grupo carbonilo presente en carbohidratos Figura 2-4. Los productos de esta reacción son los responsables del característico color marrón en diversos productos (Peterson et al., 2010).

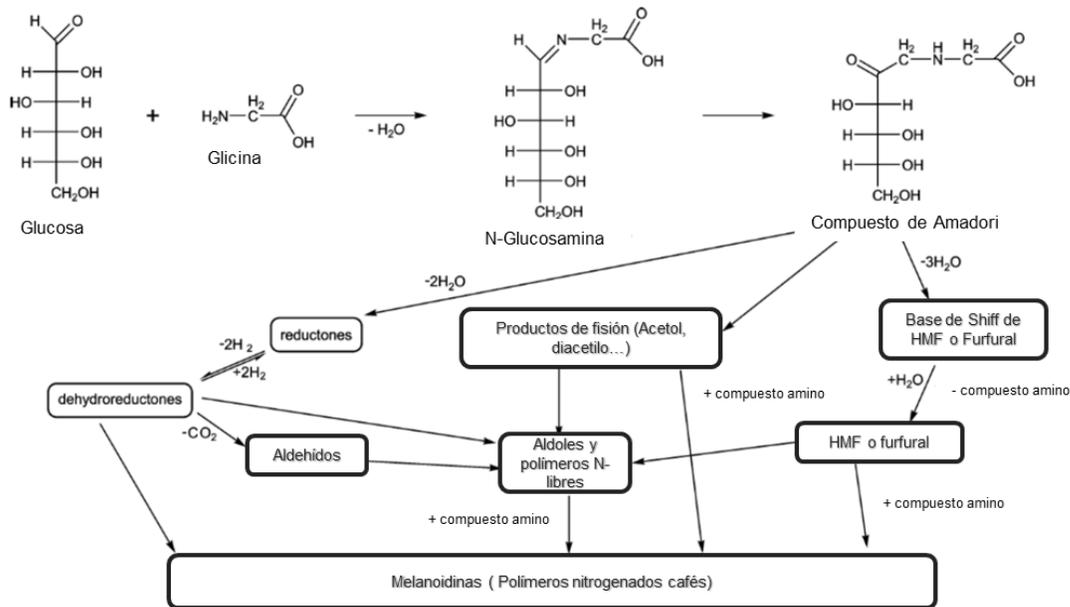


Figura 2-4. Ruta general de las reacciones de Maillard (Peterson et al., 2010).

2.2. Procesos anaerobios termófilicos para la producción de metano a partir de aguas residuales

El tratamiento anaerobio de aguas residuales es una de las tecnologías más robustas en el mundo, siendo una opción sustentable debido a su bajo consumo energético, la posibilidad de producir energía, así como disminuir las emisiones de efecto invernadero. Estos elementos van de la mano con el concepto de una producción integral en el marco de las biorrefinerías (Moraes et al., 2015).

El propósito general de los procesos anaerobios es transformar material orgánico complejo en metano (CH_4) a través de la conversión biológica en un ambiente libre de oxígeno (Parkin y Owen, 1986). En los procesos anaerobios los aceptores de electrones son dióxido de carbono, compuestos orgánicos y sulfatos y sus principales productos son dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y gases traza tales como sulfuro de hidrogeno (H_2S), hidrogeno (H_2) y otro subproducto líquido o semi líquido conocido como digestato (Akunna, 2018).

Compuestos orgánicos + nutrientes → Ácidos volátiles + alcoholes + H_2 + CO_2 + H_2S + NH_3 + células

Ácidos volátiles + alcoholes + H_2 + CO_2 + nutrientes → CH_4 + CO_2 + células

Conceptualmente, el proceso anaerobio de degradación de la materia orgánica, también conocido como digestión anaerobia (DA) puede ser descrita en cuatro pasos: Hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 2-5). La hidrólisis involucra la ruptura de compuestos poliméricos orgánicos complejos tales como carbohidratos, proteínas y lípidos en compuestos monoméricos tales como aminoácidos, azúcares simples y ácidos grasos. En la acidogénesis, diferentes tipos de microorganismos son capaces de degradar estos monómeros en ácidos dicarboxílicos, ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono, hidrógeno y otros compuestos orgánicos. En la acetogénesis los ácidos grasos y otras moléculas son metabolizadas a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno por microorganismos acetogénicos durante el proceso de acidogénesis. Finalmente, la metanogénesis da paso a la formación de metano. (Akunna, 2018; Uçkun Kiran et al., 2016).

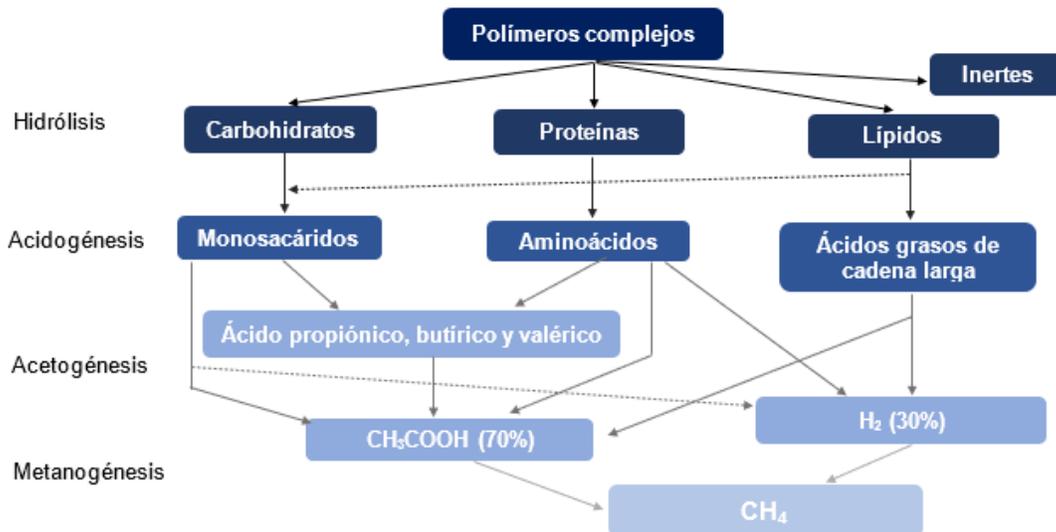
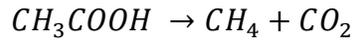
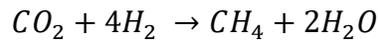


Figura 2-5 Etapas de la digestión anaerobia (Uçkun Kiran et al., 2016) .

En la metanogénesis, el 70% del metano producido proviene del ácido acético o acetato para producir dióxido de carbono y metano en el proceso conocido como metanogénesis acetoclástica:



El restante 30% proviene de la reducción enzimática del dióxido de carbono a metano conocida como metanogénesis hidrogenotrófica:



2.2.1. Procesos anaerobios termofílicos

La temperatura es uno de los parámetros clave que afectan los procesos anaerobios ya que influye en el crecimiento microbiano, la actividad enzimática, las características del sustrato y, consecuentemente la producción de metano (Uçkun Kiran et al., 2016). Los sistemas anaerobios para el tratamiento de aguas pueden ser operados en condiciones psicrófilas (<20°C), mesofílicas (25°C- 40°C) o termofílicas (45°C-60°C). Lettinga (1980) y van Lier et al. (1996), comenzaron a explorar el tratamiento de residuos y aguas residuales en condiciones termofílicas. De estas y posteriores investigaciones se han observado dos rangos óptimos de temperatura, con una máxima actividad biológica a los 35°C y a los 55°C como se observa en la Figura 2-6.

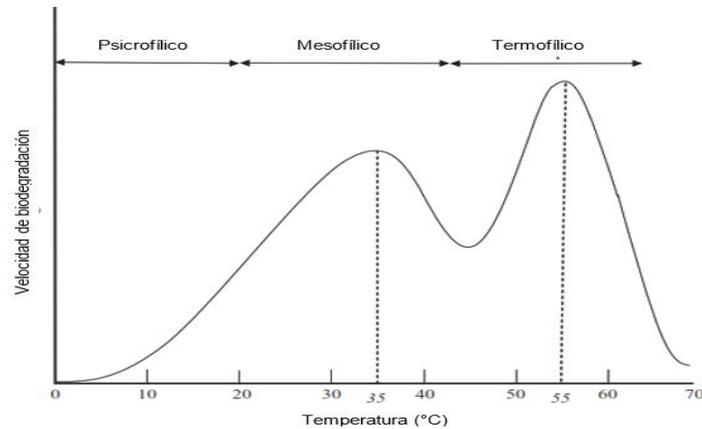


Figura 2-6. Rangos de temperatura para los procesos de tratamiento anaerobio
(Vandevivere et al., 2003).

La temperatura tiene mucha influencia en las reacciones anaerobias, desde el punto de vista cinético y termodinámico (Vandevivere et al., 2003). Lin et al. (1987), realizaron una investigación en la que determinaron que, en condiciones termofílicas, la cinética de la reacción de la metanogénesis se ve favorecida, esto debido al incremento en la tasa de crecimiento específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x.}$), así como una disminución en la constante media de velocidad de degradación (K_s) (Figura 2-7). Figueroa-González et al. (2018) obtuvieron un incremento en la tasa de producción de metano, así como un mayor volumen de metano producido, al estudiar el efecto de la temperatura sobre la producción de metano. Las condiciones termofílicas también incrementan la actividad enzimática en los procesos anaerobios. R. Liu et al. (2021) observaron un incremento en la concentración de coenzimas, así como una mayor actividad enzimática relacionadas con la formación de acetato y metano en condiciones termofílicas.

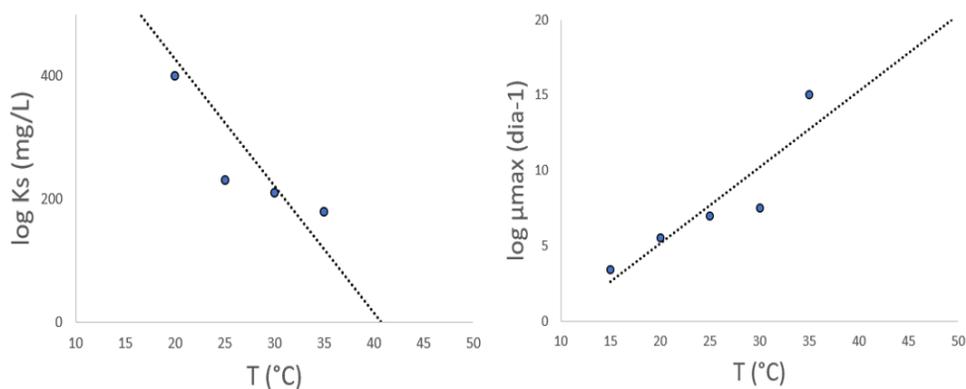


Figura 2-7. Relación de las constantes cinéticas de crecimiento bacteriano con la temperatura (Lin et al., 1987).

Termodinámicamente, las reacciones químicas y bioquímicas en digestión anaerobia se llevan a cabo a velocidades mayores a temperaturas altas **Tabla 2-2. Efecto de la temperatura en la energía libre de Gibbs de las diferentes reacciones involucradas en la metanogénesis** En la Tabla 2-2 se puede observar cómo la temperatura afecta la energía necesaria para llevar a cabo las reacciones en la metanogénesis:

Tabla 2-2. Efecto de la temperatura en la energía libre de Gibbs de las diferentes reacciones involucradas en la metanogénesis (van Lier, 1995)

Reacción	ΔG , 25°C (KJ/ mol)	ΔG , 55°C (KJ/ mol)
Acetato + H ₂ O \longrightarrow HCO ₃ ⁻ + CH ₄	-31.0	-34.7
Butirato + 2H ₂ O \longrightarrow 2 Acetato + H ⁺ + 2H ₂	+48.1	+37.9
Propionato + 3H ₂ O \longrightarrow Acetato + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3H ₂	+76.1	+62.3
Glucosa + 3H ₂ O \longrightarrow 2 HCO ₃ ⁻ + 2 Acetato + 2 Propionato + 6H ⁺ + 2H ₂	-610.5	-641.2
4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ \longrightarrow CH ₄ + 3 H ₂ O	-135.6	-122.5

La mayoría de las reacciones de degradación de materia orgánica en termofilia requieren menor energía para llevarse a cabo, lo que resulta en una

digestión anaerobia más rápida (van Lier, 1995). De igual manera, el incremento en la temperatura aumenta los coeficientes de difusión de hidrogeno, lo cual es un paso importante durante la transferencia de electrones entre especies formadoras y consumidoras de estos compuestos, y que determinan la tasa de conversión de estos a metano (Stams, 1994).

2.2.2. Microbiología de los procesos anaerobios termofílicos

La digestión anaerobia es un proceso bioquímico complejo que consiste en una serie de reacciones consecutivas e interactivas llevadas a cabo por una gran cantidad de microorganismos, los cuales tienen distintas tasas de crecimiento y que son sensibles a las distintas condiciones ambientales a las que se encuentran (Uçkun Kiran et al., 2016). Este proceso es el resultado de la interacción de microorganismos altamente especializados, entre organismos degradadores de macromoléculas y organismos productores de metano como se observa en la Figura 2-8.

En la digestión anaerobia para la producción de metano los organismos hidrolíticos producen enzimas extracelulares que convierten los biopolímeros en monómeros para degradarlos a hidrógeno, CO₂ y ácidos grasos volátiles (AGV). Estos AGV son utilizados por bacterias reductoras, las cuales forman acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente, los metanógenos ocupan la posición terminal de la cadena, cuyo sustrato de este último grupo está limitado a tres: H₂, compuestos metilados (metanol, mono metilaminas y otros compuestos de un solo carbono) y acetato. Cada organismo en la cadena tiene requerimientos específicos de sustrato y no pueden crecer sin las bacterias de las fases previas. (Kotsyurbenko, 2010).

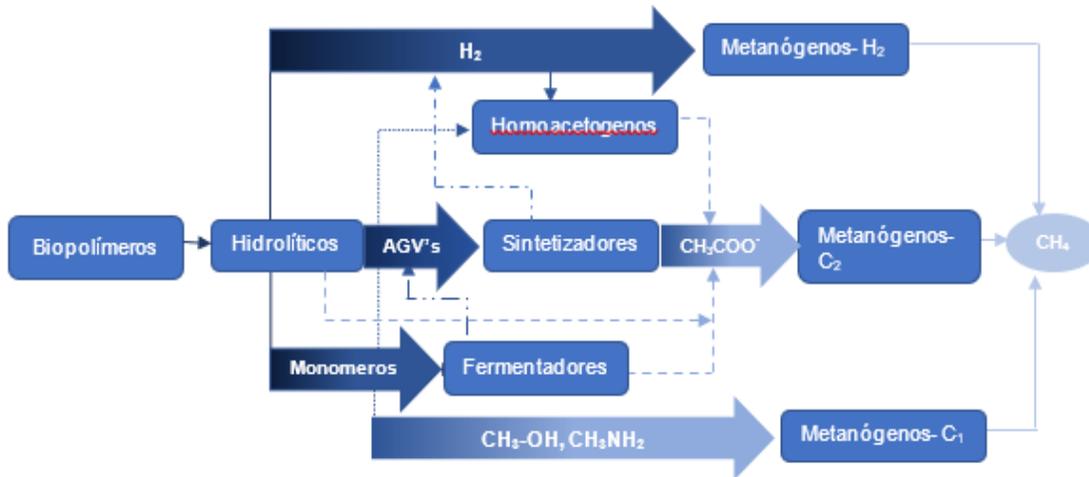


Figura 2-8. Esquema de las interacciones tróficas de las comunidades microbianas anaerobias para la degradación de materia orgánica (Kotsyurbenko, 2010).

Los organismos involucrados en los procesos anaerobios actúan de manera sintrófica, en donde existe una interacción en la cual dos tipos de organismos con diferentes metabolismos están vinculados por la necesidad de mantener un intercambio de metabolitos entre ambas partes para hacer la reacción factible (Figura 2-9). En los procesos anaerobios esta cooperación se basa en la transferencia de hidrogeno y acetato de las bacterias fermentativas a las arqueas metanogénicas para hacer la degradación de sustratos termodinámicamente favorable (Sieber et al., 2010).

Los primeros reportes de organismos metanogénicos a altas temperaturas fueron realizados por Zeikus y Wolfe (1972). En reactores anaerobios termofílicos, van Lier et al. (1993) y Schmidt y Ahring (1995) realizaron los primeros reportes acerca de los organismos metanogénicos termofílicos, así como el efecto de la temperatura sobre los gránulos anaerobios. Desde entonces, se han encontrado géneros y especies de 5 órdenes distintos capaces de utilizar los diferentes sustratos para la producción de metano en condiciones termofílicas (Tabla 2-3).

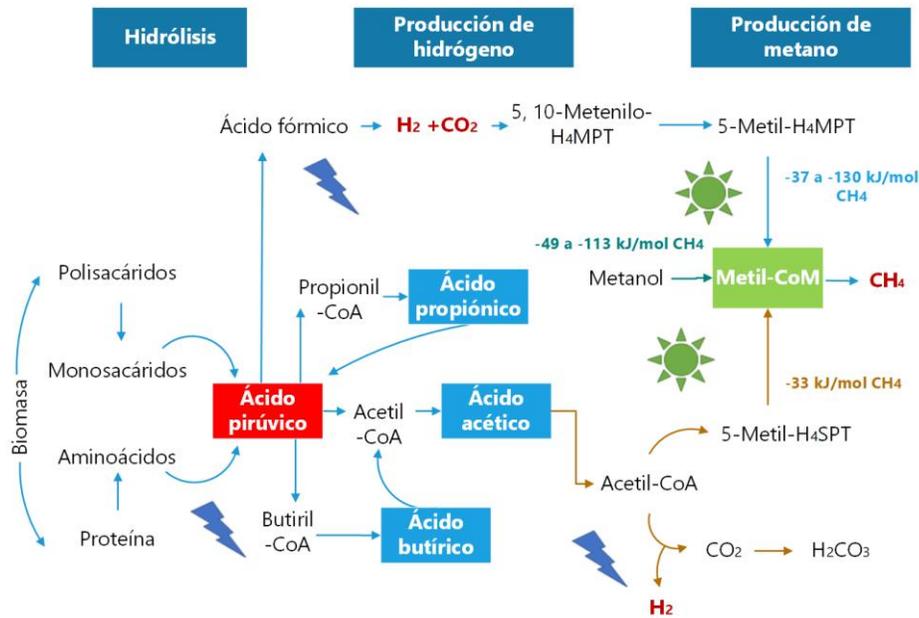


Figura 2-9. Descripción de la ruta metabólica de la metanogénesis, los rayos azules representan bacterias, los soles verdes representan arqueas. (Jia et al., 2017).

La mayor parte de las especies de arqueas termofílicas reportadas en la literatura son organismos quimio autótrofos que utilizan exclusivamente el H_2 y fijan el CO_2 , con algunas especies que pueden utilizar el formato y otras especializadas en convertir el metanol y las aminas metiladas. De entre este rango de metabolismos solo existe una única arquea metanogénica acetoclástica termófila (*Methanosaeta thermophila*) mientras *Methanosarcina thermophila* puede utilizar acetato, metanol y aminas metiladas junto con el hidrogeno. (Ollivier y Cayol, 2010). Algunos de los principales géneros reportados en la literatura durante la operación de reactores en termofilia han sido *Methanoculleus*, *Methanothermobacter* y *Methanosarcina* (Tabla 2-3) (Buitrón, Martínez-Valdez, et al., 2019; Ghasimi et al., 2016; Shi et al., 2018; Wu et al., 2020).

Diversos estudios han demostrado que temperaturas elevadas durante la operación de reactores anaerobios tienen un impacto en la abundancia y diversidad bacteriana. Se ha reportado que el incremento de la temperatura lleva a una reducción en la diversidad de especies bacterianas (Buitrón et al., 2019; Feng et al., 2019). Este fenómeno es atribuido al estrés y falta de adaptación de ciertos grupos

de bacterias a esas condiciones de temperatura, lo que lleva a una selectividad específica. Ghasimi et al. (2016) observaron una menor diversidad, pero mayor estabilidad en la comunidad de arqueas metanógenas en condiciones termofílicas.

Tabla 2-3. Géneros y especies encontrados en condiciones termofílicas (Adaptado de Y. Liu, 2010).

Orden	Géneros y especies
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacterium Formicicum, ivanovii,</i> <i>Methanobrevibacter millerae,</i> género <i>Methanothermobacter,</i> género <i>Methanothermus</i>
<i>Methanococcales</i>	géneros <i>Methanocaldococcus</i> y, <i>Methanotorris,</i> <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> y <i>okinawensis</i>
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanoculleus thermophilicus, Methanolinea tarda.</i>
<i>Methanopyrales</i>	<i>M. kandleri</i>
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcina thermophila, Methanomethylovorans</i> <i>thermophila, Methanosaeta thermophila,</i> <i>Methermicoccus shengliensis, Methanohalobium</i> <i>evestigatum.</i>

Estos resultados demuestran que la comunidad anaerobia termofílica es menos diversa en comparación con su contraparte mesofílica, sin embargo, los rendimientos en todos los casos han sido mayores lo que sugiere que los organismos termofílicos son menos diversos pero más activos.

2.3. Operación de reactores anaerobios termofílicos

Un biorreactor eficiente tiene como principal objetivo la máxima producción de metano, con una máxima carga orgánica y un mínimo tiempo de retención hidráulica y que permite una alta eficiencia de remoción compuestos orgánicos con bajos

costos de operación (Fig. 2-10). En los procesos de digestión anaerobia, el diseño y operación de los reactores es importante para mejorar la eficiencia y la producción de biogás. La elección y aplicación de cada uno de estos sistemas deberá basarse en la característica del efluente. Una correcta selección puede mejorar considerablemente la eficiencia de conversión y tratamiento del efluente (Murphy y Thamsiroj, 2013).



Figura 2-10. Objetivos de un biorreactor eficiente y los factores que influyen en esta eficiencia (Herrmann y otros., 2018).

Numerosos tipos de biorreactores anaerobios han sido desarrollados para el tratamiento de aguas residuales los cuales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de operación, así como a la forma la biomasa se encuentra dentro del reactor (Fig. 2-11).

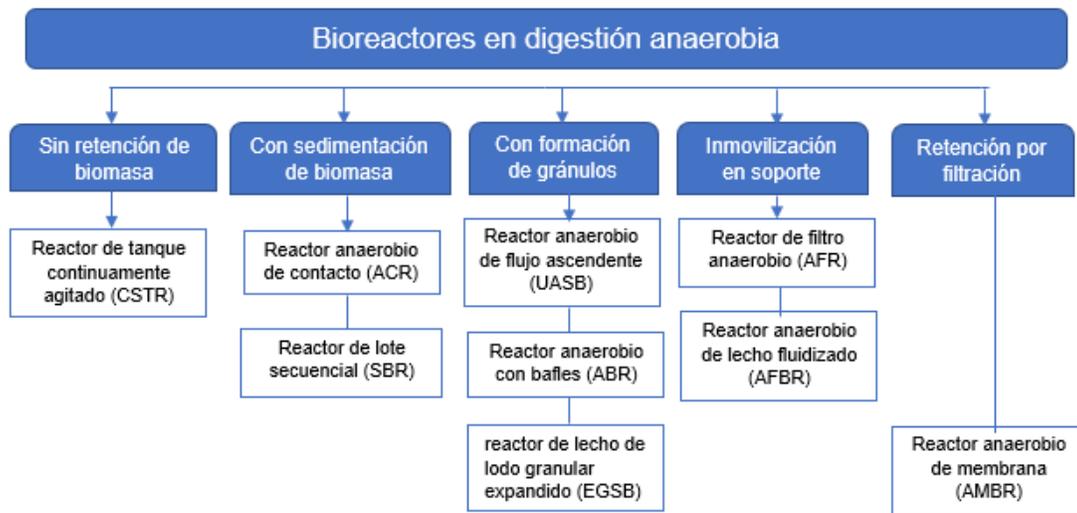


Figura 2-11. Tipos de biorreactores para la digestión anaerobia basados en sus características de biomasa(Herrmann et al., 2018).

De entre los distintos tipos de biorreactores el Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) es el más popular para el tratamiento de distintos tipos de aguas residuales industriales, debido a su alta capacidad de tratamiento, comparado con otros sistemas (España-Gamboa et al., 2012). Este tipo de reactor consiste en un tanque en el cual el agua residual es alimentada por el fondo del mismo, atravesando una capa de biomasa, la cual transforma la materia orgánica en biogás (Lettinga et al., 1980).

La operación de biorreactores en condiciones termofílicas ha sido utilizada debido a sus altas velocidades de reacción y los bajos tiempos de retención requeridos para llevar a cabo el proceso (Gebreeyessus y Jenicek, 2016), sin embargo, la operación en condiciones termofílicas requiere de un minucioso monitoreo y control debido al riesgo de una irreversible acidificación debido a la acumulación de AGV, así como a una menor capacidad de amortiguamiento del sistema (Ryue et al., 2020).

2.3.1. Tiempo de retención hidráulica

El tiempo de retención hidráulica (TRH) se define como el tiempo promedio que el líquido se mantiene en el reactor antes de ser descargado. Este se puede calcular de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde,

TRH = Tiempo de retención hidráulica (día);

V= Volumen del reactor, m³;

Q= Flujo volumétrico del agua residual (m³/día)

El TRH es directamente proporcional al tamaño del reactor. A mayores concentraciones de materia orgánica en el agua residual, es necesario mayor tiempo del tratamiento. En general las aguas residuales con altos niveles de materia orgánica requieren mayores tiempos de retención debido a la hidrólisis de esta (Akunna, 2018). Si el TRH es menor que la velocidad de crecimiento, los microorganismos de lento crecimiento serán lavados del reactor. Al manipular este valor se puede hacer una selección de los organismos que estarán presentes dentro del reactor lo que puede llevar al enriquecimiento, de igual manera, este parámetro de operación puede ayudar a promover una sintrofía eficiente entre organismos (O-Thong et al., 2018).

2.3.2. Carga orgánica

La carga orgánica (C.O.) se refiere a la cantidad de materia orgánica que es alimentada al reactor por unidad de volumen de trabajo del biorreactor y está definida por la siguiente ecuación:

$$CO = \frac{Q C}{V}$$

Donde,

CO = Carga orgánica ($\text{kg}/\text{m}^3 \text{ d}$);

V= volumen del reactor, m^3 ;

Q= Flujo volumétrico del agua residual (m^3/d);

C= concentración de sólidos volátiles ($\text{kg}_{\text{SV}}/\text{m}^3$, $\text{kg}_{\text{DQO}}/\text{m}^3$)

La producción de biogás por unidad de tiempo incrementa con el incremento de la carga orgánica, sin embargo, una sobrealimentación de carga orgánica puede llevar a la excesiva formación de AGV, lo que a su vez lleva a alteraciones en el proceso de generación de biogás al acidificar el medio y finalmente, a una falla irreversible del mismo. La carga orgánica es un parámetro relevante que depende de la concentración de sólidos o materia orgánica, el volumen del reactor y el flujo de agua en el reactor (Herrmann et al., 2018).

2.3.3. Ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos son moléculas orgánicas que consisten en un carbono unido a un grupo metilo al final de la cadena y un ácido carboxílico en el carbono número 1. (López-Lara y Geiger, 2010). Estos ácidos son producidos en la etapa acidogénica del proceso anaerobio por vía fermentativa a través de una serie de reacciones químicas catalizadas por distintas enzimas (Figura 2-12) y cuyos productos finales son sustancias orgánicas como el ácido propiónico, ácido acético, ácido butírico, etanol y acetona, entre otros (Corrales et al., 2015)

En general, cambios abruptos en las condiciones ambientales en el digestor, como la composición del sustrato o la variación de la temperatura pueden resultar en una inhibición de la población microbiana metanogénica, lo que lleva a un incremento en la concentración de AGV y su posterior acumulación (Tabatabaei et al., 2018). Esta acumulación se genera cuando los metanógenos no pueden continuar con la degradación de estos ácidos, causando una caída en el pH y la alcalinidad que a su vez inhibe a estos organismos. (Robles et al., 2018).

Algunos estudios realizados han encontrado discrepancias en el efecto de la temperatura sobre la producción de AGV. Hao y Wang (2015) obtuvieron un incremento de hasta 10 veces la concentración de AGV en reactores termofílicos debido al incremento de la actividad enzimática. Contrariamente, Fernández-Domínguez et al. (2020) obtuvieron una producción mayor de estos ácidos en condiciones mesofílicas debido al incremento en la concentración de otros compuestos inhibitorios en termofilia. En termofilia, se ha reportado un efecto negativo a concentraciones de 8 g/L de ácidos butírico y propiónico (Mamimin et al., 2017). Debido a su rápida generación en condiciones termofílicas, el monitoreo y control de AGV debe ser un parámetro clave.

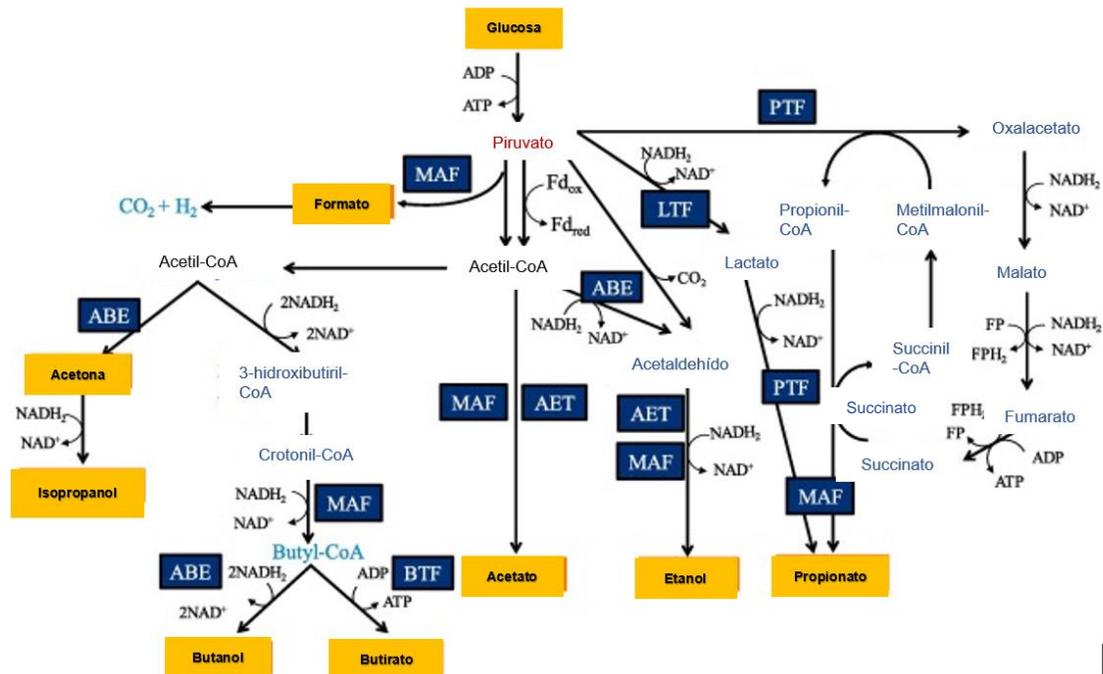
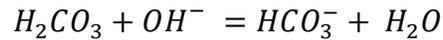
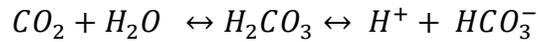


Figura 2-12. Ruta metabólica acidogénica de conversión de moléculas a ácidos grasos volátiles (Zhou et al., 2018).

2.3.4. Alcalinidad

El parámetro que controla el pH en la anaerobiosis es la alcalinidad. La alcalinidad en forma de carbonatos (CO_3^{2-}) y bicarbonatos (HCO_3^-) neutralizará la acidez el medio.



De acuerdo con la ley de Henry, a menor temperatura habrá una mayor cantidad de CO₂ disuelto, lo que propiciará una mayor formación de carbonato que le conferirá una mayor capacidad de amortiguamiento al sistema (Murphy y Thamsiroj, 2013). Es por este motivo que, en condiciones termofílicas, la capacidad de amortiguamiento del sistema puede llegar a ser menor, lo que lleva a una mayor sensibilidad a cambios en el pH, afectando negativamente la producción de metano. La disminución en la capacidad de amortiguamiento ha sido relacionada con la inestabilidad en reactores anaerobios.

La termofilia tiene el potencial de proveer ciertas ventajas en la operación de reactores anaerobios. Abd Nasir et al. (2019) observaron un aumento en la productividad de metano con la reducción del TRH en reactores SBR termofílicos. de La Rubia et al. (2006) reportaron un incremento en la capacidad de reactores UASB a soportar mayores cargas orgánicas en termofilia. Mismo fenómeno reportaron Castrillón et al. (2002) en reactores CSTR. Ramos y Silva (2020) observaron un incremento en la capacidad de carga orgánica de 12 a 21.6 kgDQO m⁻³ día⁻¹ en un sistema de dos etapas operado en condiciones termofílicas. Wu et al. (2020) encontraron un mejor desempeño en la producción de metano, con un incremento del 18% con respecto a condiciones mesofílicas. Cavinato et al. (2013) obtuvieron mejor desempeño en reactores termofílicos para tratar lodos residuales y demostraron que, a pesar de requerir mayor gasto energético, ésta se ve compensada con el incremento en la producción de biogás.

Dentro de los inconvenientes en la operación de reactores en termofilia se ha encontrado la necesidad de ajustes continuos en el pH (Bayr y Rintala, 2012) así como incrementos en las concentraciones de ácidos grasos volátiles (Moset et al., 2014) los cuales pueden tener efectos inhibitorios en reactores anaerobios. También se ha observado una reducción en la eficiencia de remoción de materia orgánica (Castrillón et al., 2002).

2.4. Producción termofílica de metano a partir de vinazas y efluentes de biorrefinerías.

Como se mencionó anteriormente, el estudio de efluentes de biorrefinerías lignocelulósicas para la producción de biocombustibles líquidos aún se encuentra en etapas de desarrollo. Sin embargo, existe una gran variedad de estudios realizados sobre el tratamiento de efluentes en termofilia de la producción de alcohol en destilerías, así como algunos estudios sobre efluentes de biorrefinerías de primera generación, los cuales comparten ciertas características con los efluentes lignocelulósicos.

Durante los años 80 y 90, se realizaron los primeros estudios en termofilia a partir de efluentes de destilerías. Wiegant et al. (1985), Souza et al. (1992) y Harada et al. (1996) fueron los primeros en evaluar la producción de metano en reactores UASB a 55°C. Estos se caracterizaron por tener altas capacidades de carga orgánica, como se observa en lo reportado por Souza et al. (1992) con cargas orgánicas de hasta 25 kg DQO/ m³ d. Por lo que quedó demostrada la factibilidad para utilizar la digestión anaerobia termofílica como tratamiento de vinazas. Los estudios más recientes sobre el tratamiento de vinazas se han centrado en aquellos efluentes de biorrefinerías de primera generación (Tabla 2-4); principalmente productoras de bioetanol a partir de cultivos como la caña, el maíz, entre otros.

Intanoo et al. (2014) realizaron un estudio sobre la producción en termofilia de metano, a partir del efluente de la producción de bioetanol con yuca, obteniendo una máxima producción de metano de 164 NmL CH₄/ g DQO. Djalma Nunes Ferraz Júnior et al. (2016) demostraron la factibilidad de un proceso anaerobio termofílico para la producción de metano a partir del efluente de una biorrefinería de caña; Albuquerque et al. (2019) realizaron un estudio en termofilia a partir de este tipo de efluentes, en un reactor SBR, con producciones cercanas a los 350 mL de CH₄/ gDQO y eficiencias de remoción cercanas al 90% de los carbohidratos presentes en el efluente.

Tabla 2-4. Estudios realizados con vinazas en condiciones termofílicas

Alimentación	Configuración de reactor	Temperatura	Carga orgánica (kg DQO m ³ d)	TRH (d)	Producción máxima de metano (NmLCH ₄ gDQO)	Productividad de metano (m ³ CH ₄ m ³ d)	Eficiencia de remoción (%)	Referencia
Vinaza a partir de rastrojo de trigo	UASB	55°C	17	2	155	0.63	76	Kaparaju et al., 2010
Vinaza a partir de yuca	UASB-UASB	55°C	25	ND	165	0.56	86	Intanoo et al., 2014
Vinaza partir de bagazo de caña	UASB	55°C	25	ND	253	2.2	63	Djalma Nunes Ferraz Júnior et al., 2016
Vinaza de caña de azúcar	UASB-STBR	55°C	30	2	329	2.28	84	Fuess y et al., 2017
Vinaza de producción de bioetanol	aSSBR	55°C	26	ND	407	7	82	Albuquerque et al., 2019
Vinaza de caña de azúcar	aFBR-aFBR	55°C	21.6	ND	260	5.57	70	Ramos y Silva, 2020

Existen en la literatura algunos trabajos centrados en efluentes de biorrefinerías lignocelulósicas. Kaparaju et al. (2010) investigaron la digestión anaerobia termofílica de vinazas a partir de rastrojo de trigo, encontrando que la concentración del sustrato y la carga orgánica influyen en el desempeño del reactor. Buitrón, Hernández-Juárez, et al. (2019) demostraron que es factible la producción de metano a partir de los residuos provenientes de la producción de bioetanol a partir de diferentes biomazas lignocelulósicas, sin embargo, también observaron un bajo porcentaje de biodegradabilidad debido a un efecto inhibitorio.

Existe en la literatura una falta de información sobre el tratamiento de los efluentes de biorrefinerías lignocelulósicas, así como su efecto en los lodos anaerobios termofílicos y la comunidad microbiana de estos. Debido a esto, es necesario continuar explorando esta área y cerrar la brecha de conocimiento de este tipo de efluentes, toda vez que la producción de biocombustibles a partir de este tipo de biomasa muestra ser el futuro en este campo.

3. Hipótesis

La aplicación de un proceso termofílico propiciará una alta producción de metano, así como de remoción de materia orgánica de un efluente de biorrefinería lignocelulósica, debido a una alta actividad metanogénica del lodo anaerobio.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la producción de metano a partir de un efluente de biorrefinería lignocelulósica productora de biocombustibles líquidos por medio de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente operado en condiciones termofílicas.

4.2. Objetivos particulares

1. Determinar la carga orgánica y TRH, que maximicen la producción de metano, así como el desempeño de la degradación de materia orgánica del efluente.
2. Evaluar el efecto del efluente lignocelulósico sobre la actividad metanogénica específica de un lodo anaerobio termofílico.
3. Evaluar el efecto del efluente lignocelulósico, sobre la composición y diversidad de la comunidad microbiana en un reactor anaerobio termofílico.

5. Metodología

Para cumplir con los objetivos establecidos en este trabajo se plantea llevar a cabo una estrategia experimental como se muestra en el siguiente esquema:

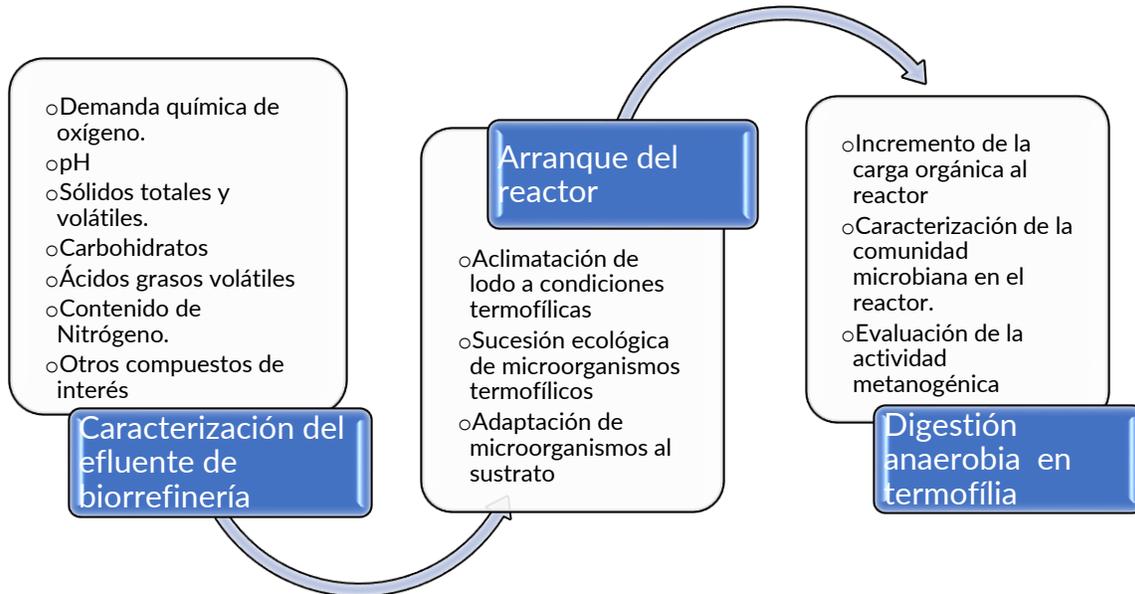


Figura 5-1. Etapas experimentales.

Inicialmente, se llevó a cabo la caracterización del agua residual a utilizar, en este caso procedente de un efluente del proceso de producción experimental de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. En la siguiente etapa se llevó a cabo la puesta en marcha del reactor anaerobio: Se llevó a cabo el arranque de un reactor anaerobio de flujo ascendente en condiciones termofílicas (55°C). Al obtener una biomasa aclimatada a las condiciones de temperatura y al sustrato a evaluar, se llevó a cabo la parte experimental con la evaluación de las distintas condiciones de operación (carga orgánica y TRH) en el reactor. Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la comunidad microbiana y su actividad metanogénica.

5.1. Caracterización del efluente

El efluente por tratar es generado en un proceso experimental de biorrefinación de residuos lignocelulósicos agroindustriales (pajas de maíz, trigo, caña y agave) en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Guadalajara. Estos residuos son secados, molidos y pretratados con explosión de vapor saturado a 150°C. Durante este proceso se realiza la separación de la celulosa, quedando un residuo sólido rico en hemicelulosa y otros compuestos (Aguilar y colaboradores, 2018) . La fracción líquida obtenida de esta etapa es utilizada en el proceso de fabricación de etanol. Parte del hidrolizado no es utilizado y queda como residuo.

Tabla 5-1. Análisis de laboratorio realizados para la caracterización del efluente

Parámetro	Método
DQO	Colorimétrico HACH, rango alto
Determinación de sólidos	Gravimétrico estándar (APHA, 2017)
Carbohidratos totales	Colorimétrico (Dubois et al., 1956)
AGV	Cromatografía de gases
Fenoles totales	Colorimétrico (Folin- Ciocalteu)
Hidroximetilfurfural (HMF) y Furfural	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC)
Nitrógeno total	Colorimétrico HACH

Este residuo fue utilizado en el estudio. El residuo, de color caramelo, es una mezcla, de material sólido (paja muy fina), azúcares, lignina y otros compuestos de la reacción de la hidrólisis térmica. Se obtuvo un lixiviado después de aplicar una extracción con agua al residuo de la hidrólisis con el fin de extraer los compuestos

orgánicos y separar la paja residual. Para este estudio se utilizó una mezcla del lixiviado de los cuatro tipos de residuos y así obtener un solo efluente de acuerdo con lo propuesto por Hernández-Juárez (2019). Para la caracterización de este efluente se realizaron los análisis de laboratorio reportados en la Tabla 5-1.

5.2. Métodos analíticos

La demanda química de oxígeno total y soluble se determinó por método colorimétrico (Hatch 435, con un rango de 0 a 15,000 mg DQO/ L). Este proceso se basa en el pretratamiento de una muestra con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y la oxidación de la materia orgánica mediante un agente oxidante, en este caso dicromato de potasio ($Cr_2O_7^{-2}$) el cual es reducido al ion cromo 3, (Cr^{+3}) el cual presenta una coloración verdosa. Este cambio de coloración es proporcional a la cantidad de materia oxidable en la muestra y se cuantifica mediante espectrofotometría en el rango visible a 620 nm.

La cantidad de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) fue determinada por método gravimétrico estándar (APHA, 2005). Este método se basa en la retención de las partículas sólidas en un filtro de fibra de vidrio con poro de $1,5 \mu m$ a través del cual se hace pasar una muestra homogénea; el residuo que queda retenido se seca a $103-105^\circ C$. El incremento en el peso del filtro representa la cantidad de sólidos suspendidos totales en el filtro. La muestra lleva a $550^\circ C$, con lo cual los sólidos volátiles se evaporan.

La cuantificación de nitrógeno total se determinó por método colorimétrico (Hatch 10072, con un rango 2- 150 mg N/ L) La determinación de furfurales (Furfural y Hidroximetilfurfural) se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (Agilent Technologies, modelo. Infinity II).

La determinación de carbohidratos totales se determinó mediante el método colorimétrico propuesto por Dubois y colaboradores (1956). Este método se basa en la reacción de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, los cuales son tratados con una solución de fenol al 5% y llevados a digestión con

ácido sulfúrico concentrado, con lo cual la muestra adquiere una coloración amarillo-naranja, la cual puede ser cuantificada posteriormente por espectrofotometría a 480 nm.

La determinación de fenoles totales se realizó aplicando la técnica propuesta por Marina et al., (2008), basada en el reactivo Folin- Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. Estos complejos son convertidos en óxidos cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_2) y molibdeno (Mo_8O_2), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L. Se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20 %. Se preparó una disolución 1N del reactivo de Folin-Ciocalteu. El contenido de fenoles totales se determinó tomando 2 mg muestra, se colocaron en un matraz erlenmeyer y se les agregó 50 mL de agua destilada y se agitó. Enseguida se tomaron 0,5 mL de cada una de estas disoluciones y se mezclaron con 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregaron 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitaron fuertemente para luego, dejar reposar durante 90 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm. Los resultados se reportan como mg equivalentes a ácido gálico (mg eq. Ac gal/ L)

La concentración de ácidos grasos volátiles fue determinada mediante cromatografía de gases (Agilent Technologies, mod. 7890). El equipo cuenta con un detector de ionización de llama y una columna DB-FFAP de 15 m de longitud (530 μ m x 1 μ m). La temperatura del inyector y detector se mantienen a 190°C y 210°C, respectivamente. Se utiliza como gas de acarreo nitrógeno a un flujo de 25 mL/ min. Las muestras fueron procesadas para obtener una concentración de acuerdo con la

curva de calibración del equipo, la cual mide valores por debajo de los 2000 mg/L. La muestra diluida se filtra utilizando membranas de nitrocelulosa a 0.45 μm .

La composición del biogás se determinó mediante cromatografía de gases (SRI Instruments, mod. 8610C). El equipo cuenta con un detector de conductividad térmica. El instrumento está equipado con dos columnas, la primera es una columna empacada con gel de sílice, mientras la otra columna es un tamiz molecular. La temperatura inicial es de 40°C, que se mantiene así durante 4 minutos. Después la temperatura se incrementa hasta 110°C y se mantiene así por 3 minutos. El gas de acarreo es nitrógeno a un flujo de 20 mL/min.

5.3. Arranque del reactor anaerobio termofílico

Se utilizó un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) con capacidad de 2L, operado a 55°C. Para mantener la temperatura del reactor en condiciones termofílicas se utilizó un intercambiador de calor en forma de serpentín alrededor de la columna del reactor (Julabo, mod. Corid CD-BT27). El reactor fue aislado térmicamente con una película de fibra de vidrio y burbuja de aire, con la finalidad de minimizar la pérdida de calor del sistema.

El reactor fue equipado con un termómetro para monitorear la temperatura del líquido dentro del reactor, así como un potenciómetro (Vernier) para el monitoreo en tiempo real del pH. El reactor contaba con un sistema de alimentación por bombeo (Cole Palmer, mod. Masterflex L/S Digital Miniflex) y un sistema de recirculación por bombeo (Cole Palmer, mod. Easy Load II). El volumen de operación fue de 1.8 Litros. El reactor fue equipado con un flujómetro de gas (Bioprocess Control, mod. μFlow) para la cuantificación del biogás. El flujómetro estaba conectado a una trampa de sílica gel y viruta de hierro con la finalidad de la humedad, así como el ácido sulfhídrico, que pudieran haberse generado en el reactor. La velocidad ascensional del reactor fue de 2.5 m/h. Se utilizaron perlas de sílica para separar el vapor de agua del biogás (Figura 5-1)

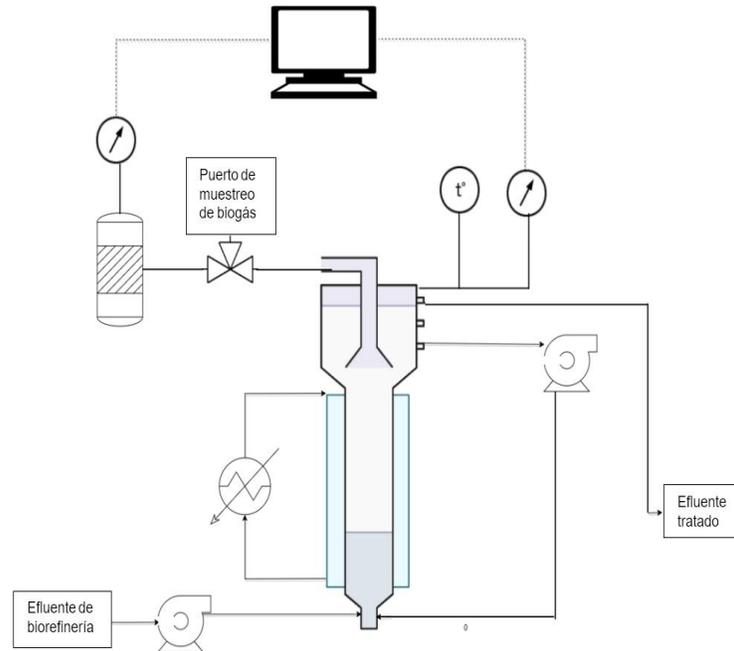


Figura. 5-1. Diagrama del reactor UASB utilizado para este trabajo.

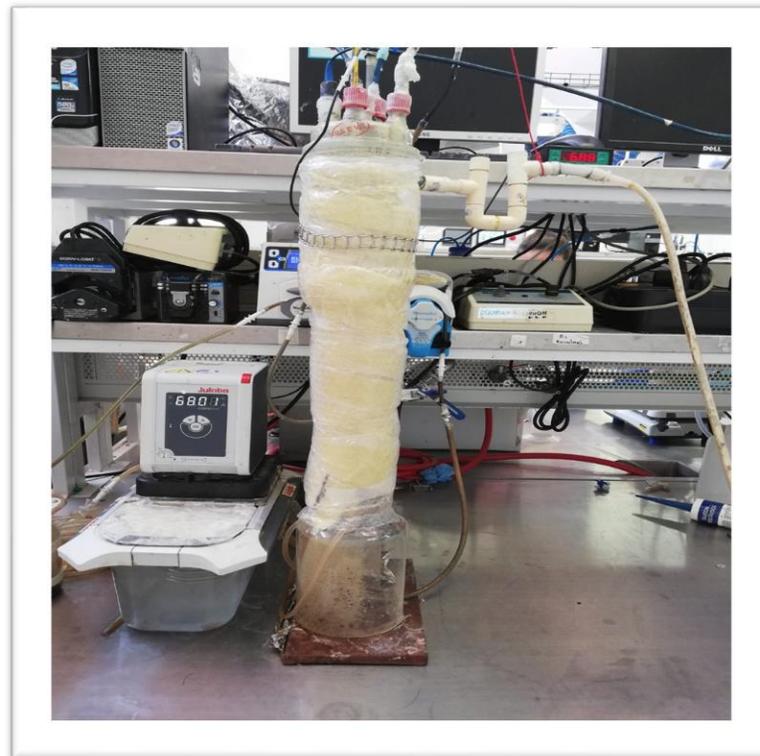


Figura. 5-2. Fotografía del sistema montado en el laboratorio.

El reactor fue inoculado con lodo granular anaerobio mesofílico a una concentración de 12.5 g SV/L, proveniente de una planta de tratamiento anaerobia de la industria harinera. El proceso de aclimatación a termofilia se llevó a cabo en un paso de 37°C a 55°C ya que se ha demostrado que este procedimiento es efectivo para generar un lodo anaerobio termofílico (Figueroa-González, y otros, 2018). El reactor fue operado por ciclos durante 30 días con medio sintético (Etapa I a), de acuerdo con lo propuesto por Lettinga (1983). El TRH en cada ciclo fue de 7 días. La C.O. en este ciclo fue de 0.07 kg DQO/ m³ día. Posteriormente, se procedió a la aclimatación de la biomasa al efluente de biorrefinería lignocelulósica (Etapa I b). El TRH de cada ciclo fue de 14 días, lo cual equivalió a una C.O. DE 0.15 kg DQO/ m³ día. Al final de cada ciclo se dejaba sedimentar la biomasa y se cambiaba el 50% del volumen de operación.

La duración de los ciclos en esta etapa se redujo con la finalidad de incrementar gradualmente la carga orgánica en el reactor. Una vez obtenida una producción estable de metano y una remoción constante de la DQO se consideró que el reactor se encontraba aclimatado a las condiciones de operación. En la **Tabla 5-2** se presenta un resumen de las condiciones de operación utilizadas para la etapa de aclimatación.

Tabla 5-2. Resumen de las condiciones de operación del reactor UASB durante la etapa de aclimatación.

	Etapa I a (Generación de lodo termofílico)		Etapa I b (Aclimatación al efluente)	
	Medio sintético (AGV)	Medio sintético (AGV+ Glu)	Efluente de biorrefinería (5 gDQO/ L)	
Sustrato				
C.O. (kg DQO/ m ³ d)	0.07	0.57	0.15	0.35
TRH (d)		7	14	7
Tiempo de operación (d)		30	42	21

El medio sintético utilizado al inicio estaba compuesto con los siguientes reactivos: $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (170 mg/L), Na_2HPO_4 (37 mg/L), KCl (25 mg/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8 mg/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (9 mg/L) y una solución de vitaminas (Biotina 2 mg/L, Piridoxina 10 mg/L, tiamina 5 mg/L, riboflavina 5 mg/L, cianocobalamina 0.1 mg/L, ácido aminobenzoico 5 mg/L, ácido pantoténico 5 mg/L). Como fuente de carbono, se adicionó una mezcla de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato) en proporción 1:1:1 a una concentración de 700 mg DQO/L y glucosa (5000 mg/L). Durante la alimentación con el efluente de biorrefinería, se suspendió la adición de AGV y glucosa. Se utilizó como fuente de nitrógeno urea en una relación C/N de 30, la cual ha sido reportada en literatura como la óptima. Además, se continuó adicionando el resto de los reactivos como fuente de nutrientes. Durante la aclimatación se llevó a cabo el monitoreo de la producción y composición del biogás, así como el consumo de DQO, carbohidratos y AGV.

Durante la operación del reactor se monitoreo el pH y se ajustó a 7.0 con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5 N y bicarbonato de sodio (NaHCO_3) para proporcionar la suficiente capacidad de amortiguamiento al reactor. La alcalinidad fue determinada mediante el índice alfa. Este parámetro se midió por titulación utilizando 20 mL de muestra tomada del reactor. Se procedió a un ajuste de pH con HCl 0.2 N. hasta alcanzar un pH 5.75, lo cual corresponde a la alcalinidad debida a la presencia de AGV. Posterior a esto se continua la titulación hasta alcanzar un pH de 4.3, el cual representa la alcalinidad total del medio. Se cuantificaron los volúmenes utilizados para el ajuste a cada pH y se determinó el índice alfa de acuerdo a la siguiente ecuación (Vital-Jácome & Buitrón, 2021):

$$\alpha = \frac{V_{pH4.3} - V_{pH5.75}}{V_{pH4.3}}$$

Donde,

α = Índice alfa;

$V_{pH4.3}$ = volumen de ácido gastado para alcanzar un pH 4.3;

$V_{pH5.75}$ = volumen de ácido gastado para alcanzar un pH 5.75

5.4. Producción de metano a partir del efluente de biorrefinería

Una vez estable la operación del reactor, se procedió a la operación en continuo. Uno de los objetivos de este proyecto fue el de evaluar la producción de metano al variar las condiciones de operación del proceso. Las cargas orgánicas a evaluar fueron de 5 y 8.5 kg DQO/ m³ día, en alimentación continua con recirculación. Los TRH de operación fueron de 48, 24 y 18 horas (**Tabla 5-3**). El tiempo de operación con cada una de las condiciones de operación fue de 30 días. Durante la operación del reactor se cuantificó la producción de AGV, así como el consumo de carbohidratos y de la DQO en el influente. Se monitoreo el pH y la alcalinidad como parámetro de control de la estabilidad del sistema.

Tabla 5-3. Resumen de las condiciones de operación en la etapa experimental.

	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
C.O. (kg DQO/ m ³ d)	5	8.5	5
TRH (d)	1	0.75	2
Tiempo de operación (d)	30	30	30

Se cuantificó la producción de biogás en el reactor a partir del volumen registrado y de la composición de biogás cuantificada en el reactor. Se realizó el cálculo de la producción volumétrica de metano de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PVM = \frac{\left(\frac{V_1 - V_0}{t_1 - t_0}\right) * \%CH_4}{V_{reactor}}$$

Donde,

PVM = Producción volumétrica de metano (N L CH₄ (L reactor d)⁻¹);

V_1 = volumen de biogás normalizado, registrado al final de una medición (N L);

V_0 = volumen de biogás normalizado, registrado al inicio de una medición (N L);

$\%CH_4$ = Porcentaje de metano en el biogás, expresado en escala 0 a 1;

t_1 = Tiempo registrado al final de una medición (d);

t_0 = Tiempo registrado al inicio de una medición (d);

$V_{reactor}$ = Volumen del reactor (L)

5.5. Evaluación de la Actividad Metanogénica Específica (AME)

La actividad metanogénica específica se determinó mediante ensayos en viales de 500 mL de capacidad por triplicado. La actividad se midió durante los primeros ciclos de la aclimatación, a fin de evaluar la condición inicial del lodo y poder compararla con la actividad al finalizar la experimentación. Se preparó una solución de acetato de sodio a una concentración de 2g DQO/ L. Se utilizó el lodo termofílico del reactor después de 216 días de operación a una concentración de 1 gSV/ L. Se utilizó un medio de vitaminas y otros nutrientes de acuerdo con Angelidaki y Sanders (2004), el cual es recomendado para ensayos de biodegradabilidad anaerobia y que les brinda a los microorganismos los nutrientes necesarios para su actividad. Se utilizó un equipo automatizado AMPTS, marca Bioprocess Control para la obtención de las curvas de metanización. A partir de este ensayo se obtuvieron diferentes curvas del valor de producción de metano acumulado durante un periodo de tiempo. Para el cálculo de la actividad se utilizó la pendiente de la curva (gCH_4/h) dividido entre los gramos de sólidos volátiles utilizados en el ensayo. La actividad metanogénica específica se expresó como $gCH_4-DQO/gSV d$.

5.6. Evaluación de la comunidad microbiana

Se tomaron tres muestras de lodo del reactor con la finalidad de evaluar los cambios en la comunidad microbiana durante las distintas etapas del proceso. Las muestras por evaluar fueron; 1) al fin del periodo de la aclimatación a termofilia con medio sintético; 2) al terminar el periodo de aclimatación al efluente de biorrefinería y, 3) al

concluir la operación del reactor. Cada muestra de lodo se almacenó en congelamiento para su posterior procesamiento y análisis. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo señalado por el fabricante. La lisis celular se produce por métodos mecánicos y químicos. El ADN se captura en una membrana de sílice. Se adiciona suficiente muestra y se homogeniza. Se utilizan una serie de soluciones con la finalidad de eliminar inhibidores de PCR

La composición se determinó por secuenciación mediante amplicones del gen 16S de ARNr, mediante la plataforma MiSeq Illumina. La concentración y pureza de los extractos se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop (2000C, ThermoScientific, USA), usando la relación de absorbancias de las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. El ADN extraído se mantuvo a -20°C hasta su secuenciación. Se utilizó un cebador universal para el gen 16s para procariontes de la región variable V4-V5 515F5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 926R 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'. La muestra fue enviada a procesamiento al Integrated Microbiome Resource (IMR, Universidad de Dalhousie, Canadá)

Se determinó la composición taxonómica y la abundancia relativa utilizando software especializado en el ambiente informático R paquete DADA2. Se utilizó el índice de Shannon para determinar si existe una mayor o menor diversidad entre los géneros presentes en cada una de las etapas mencionadas anteriormente. Se determinó el índice Chao-1 para cuantificar la abundancia de géneros en cada una de las muestras.

5.7. Análisis estadístico

Los análisis de laboratorio se llevaron a cabo por triplicado y se calculó el promedio de los valores, así como su desviación estándar. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existió diferencia entre cada una de las cargas orgánicas a las que se operó el reactor, así como una prueba de post hoc de Tukey ($\alpha < 0.05$) para determinar el nivel de significancia entre cada una de ellas.

6. . Resultados y discusión

6.1. Caracterización del efluente de biorrefinería

En la siguiente tabla se presentan los resultados de la caracterización del efluente proveniente de la biorrefinación de residuos lignocelulósicos:

Tabla 6-1. Caracterización del efluente de biorrefinería.

Componente	Concentración (mg / L)
Sólidos suspendidos totales (SST)	34,030 ± 1351
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	29,120 ± 1170
% de sólidos volátiles	86
pH	2.24
DQO total	64,200 ± 3253
DQO soluble	12,095 ± 636
Carbohidratos solubles	6,530 ± 0.504
Etanol	53
Ácido acético	124
HMF	ND
Furfural	ND
Fenoles totales	456 ± 23
Nitrógeno total	<0.001

Los valores de sólidos totales y volátiles, así como el valor de DQO total y la concentración de carbohidratos en el efluente se encuentran dentro de los valores reportados previamente para este tipo de efluentes (Barros et al., 2016; de Albuquerque et al., 2019). Estos efluentes se caracterizan por tener alto contenido de material orgánico, principalmente carbohidratos residuales que quedan

presentes después de las etapas de termohidrólisis y en los procesos de destilación así como ácidos grasos remanentes del proceso de fermentación (Sanchez et al., 2017). El valor de pH en el efluente de biorrefinería fue más bajo con relación a los valores típicos para este tipo de efluentes (entre 3.5 y 5.5.). La concentración de AGV fue menor de los valores reportados para este tipo de efluente. Buitrón, Hernández-Juárez, et al. (2019) encontraron concentraciones de acetato de 2,000 mg DQO/ L, además de la presencia de etanol y otros compuestos como el furfural y el HMF, así como solventes como acetona y butanol, en la fracción líquida de residuos de termohidrólisis de producción de bioetanol, los cuales no se encontraron en este trabajo. Este cambio en la composición del efluente posiblemente se debió a las condiciones en las que se encontraba almacenado. Al estar a un pH en el que estos compuestos se encuentran en su forma no dissociada y considerando las condiciones de temperatura ambiente, es probable su volatilización.

De acuerdo al balance de masas, el 54% de la DQO soluble está representada por los carbohidratos (6,530 mg DQO/L). El restante 46% se pueden explicar con la presencia de los compuestos fenólicos encontrados en la caracterización. Estos compuestos son comunes en estos tratamientos, principalmente de la explosión de vapor y, generalmente, provienen de compuestos de degradación de la lignina (de Bhowmick et al., 2018; Jing et al., 2009; Kim et al., 2011). Un estudio realizado por Rasmussen et al. (2017) encontró hasta 26 compuestos fenólicos provenientes de la biomasa lignocelulósica pretratada. Existe además, evidencia de la ocurrencia de un tipo (Monlau et al., 2014) de reacción de Malliard durante el procesamiento hidrotérmico de biomasa, la cual genera diversos compuestos poliméricos como melanoidinas, oligosacáridos y polisacáridos (Peterson et al., 2010). La concentración de compuestos fenólicos encontrados en este trabajo son menores a las reportadas como inhibitorias para la digestión anaerobia en condiciones mesofílicas, arriba de 1 g/L (Monlau et al., 2014) , sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos tienen un mayor impacto en procesos anaerobios termofílicos (Levén et al., 2012).

6.2. Arranque del reactor anaerobio termofílico

Durante los dos primeros ciclos se alimentó el reactor con una mezcla de AGV a una concentración de 1,000 mg DQO/ L. Se obtuvo una eficiencia de remoción de entre el 20 y 30%. Durante el ciclo 3 y 4 se añadió glucosa, con la finalidad de promover el crecimiento de las bacterias hidrolíticas y fermentativas, por lo que se pasó a una DQO de 8 000 mg DQO/ L. El consumo de la DQO durante el ciclo 3 paso a un 40%, sin embargo, para el ciclo 4 se observó una disminución del consumo de DQO (**Figura 6-1**). Esta reducción se debió a una posible sobrealimentación del reactor. Esta sobrealimentación se pudo revertir reduciendo la concentración de la DQO en los siguientes ciclos. La composición de biogás durante los primeros ciclos pasó de un 25% a un 50% de metano. La producción de biogás en el reactor se mantuvo constante en aproximadamente 170 mL CH₄/ gDQO

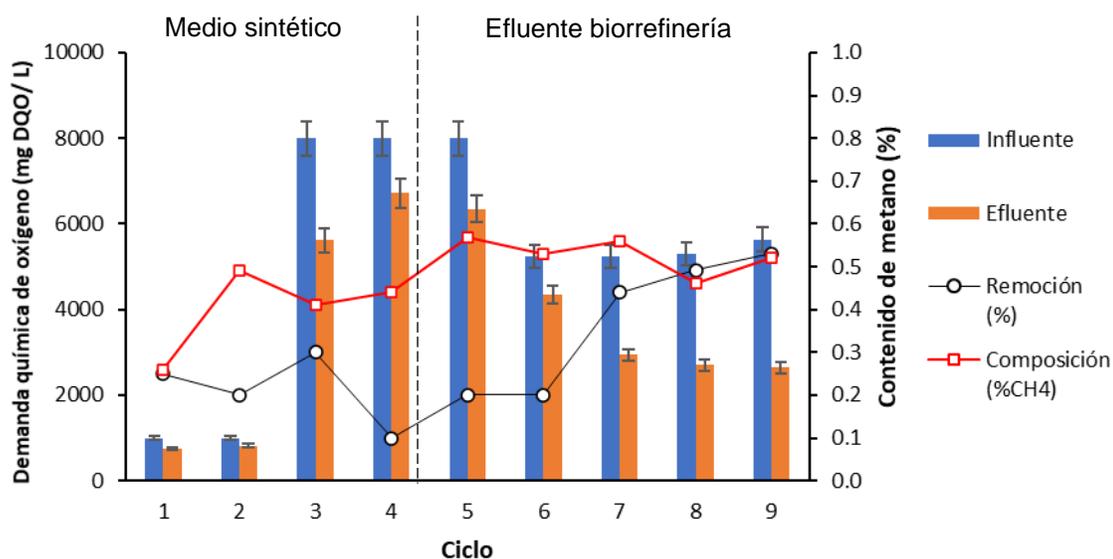


Figura 6-1. Evolución del reactor UASB durante la fase de aclimatación a las condiciones de operación.

A partir del ciclo 5 se alimentó el reactor con efluente de biorrefinería en una dilución 1:2 con agua desmineralizada, para tener una concentración de aproximadamente 6,000 mg DQO/ L. A partir del ciclo 7, al no observar un cambio

significativo en la eficiencia de remoción y producción de metano, se redujo el TRH de 14 a 7 días. Se alcanzó una remoción del 50% al ciclo 8. La eficiencia de remoción de carbohidratos durante la fase de aclimatación al efluente de biorrefinería fue del 90% durante los ciclos 5 al 9. Resultados de consumo de carbohidratos similares se obtuvieron en otros estudios con vinazas en termofilia (Albuquerque et al., 2019; Djalma Nunes Ferraz Júnior et al., 2016). La composición de biogás durante la fase de aclimatación al efluente de biorrefinería lignocelulósica fue de entre el 50% y el 60% de metano.

La eficiencia de remoción de DQO, así como la composición de metano en el biogás obtenidos en este trabajo es menor a las reportadas en la literatura para las fases de arranque de reactores anaerobios termofílicos alimentados con efluentes de biorrefinerías de primera generación, donde se alcanzaron eficiencias de remoción por encima del 70% y composición de metano cercanas al 70% (de Albuquerque et al., 2019; Djalma Nunes Ferraz Júnior et al., 2016; Harada et al., 1996). Al no observarse un incremento significativo en la eficiencia de remoción de la DQO y composición de biogás se consideró que el proceso de aclimatación había concluido.

Los resultados obtenidos demostraron que la fracción biodegradable corresponde a los carbohidratos presentes en el efluente, los cuales fueron consumidos casi en su totalidad. Este resultado demuestra que la estimulación del crecimiento las arqueas metanogénicas fue el paso limitante para el arranque de un reactor termofílico alimentado con agua residual de biorrefinería lignocelulósica. Esto se debe a que el tiempo de duplicación de las bacterias productoras de ácidos es de solo 10 a 30 minutos, lo cuales es mucho más rápido que los tiempos de las arqueas metanogénicas (Feng et al., 2019). De igual manera, se ha demostrado que la biomasa termofílica es más sensible a compuestos generados a partir del tratamiento de materiales lignocelulósicos con relación a la biomasa mesofílica (Ghasimi et al., 2016).

6.3. pH, alcalinidad y ácidos grasos volátiles

Durante el inicio de la aclimatación del lodo a condiciones termofílicas (Etapa I a), se observó una variación de pH entre 7.1 y 5.5, así como valores de índice alfa de entre 0.5 y 0.7 (**Figura 6-2**). La adición de glucosa a partir del día 15 llevó a una caída a valores por debajo de pH 6, ocasionada por el aumento de AGV en el reactor por lo que fue necesaria la adición de NaOH. De igual manera, el aumento de AGV en el medio llevó a un incremento del valor del índice alfa a valores por arriba de 0.4 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), que es el valor óptimo para digestores anaerobios (Vital-Jacome y Buitrón, 2021). Para solucionar el problema de la alcalinidad se adicionó a la alimentación bicarbonato de sodio (NaHCO_3), en proporción de 1.5 g NaHCO_3 / gDQO. Esta concentración fue suficiente para mejorar la alcalinidad en el reactor. El índice alfa se mantuvo en valores entre 0.2 y 0.4 a partir del día 54. Este resultado indica que el reactor tenía suficiente capacidad de amortiguamiento y que era capaz de prevenir la acumulación de AGV (Albuquerque et al., 2019). Durante el periodo vacacional se suspendió el monitoreo del pH.

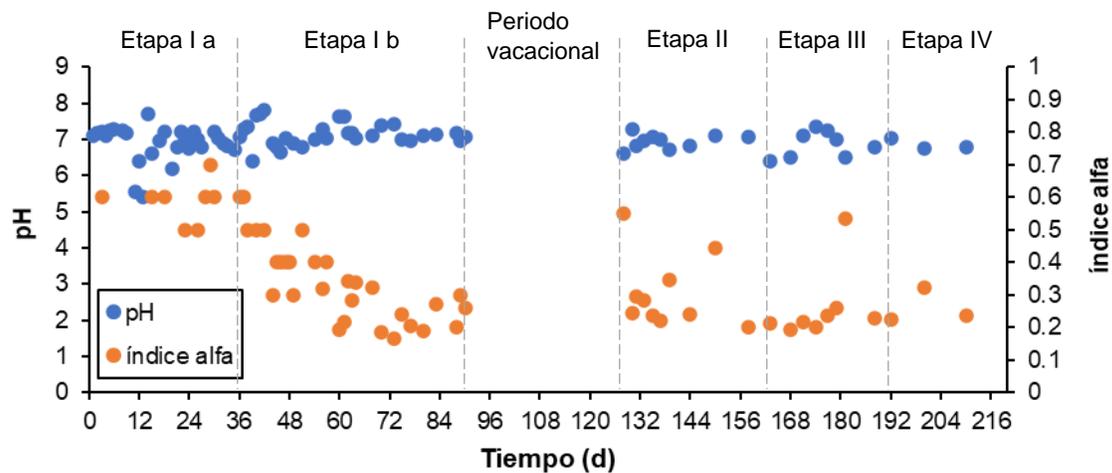


Figura 6-2. pH e índice alfa en el reactor.

Se observó un incremento en la concentración de AGV en el medio (Fig. 6-3), lo que llevó a un aumento del índice alfa al pasar a la alimentación en continuo (día 135). Este incremento se debió al aumento de la carga orgánica en el reactor, que derivó en una acumulación de AGV durante los primeros días de alimentación en continuo. En cada una de las etapas de alimentación en continuo se observaron picos en el índice alfa por arriba de 0.5 (Fig. 6-2). Estos picos fueron señales de acidificación debido al incremento de la carga orgánica. Para evitar una acumulación de AGV, se adicionó NaHCO_3 cuando se observaron estas disminuciones en la alcalinidad.

La composición de ácidos grasos volátiles en el efluente, durante la etapa de aclimatación fue principalmente de acetato (835 ± 150 mgDQO /L), además de propionato (215.83 ± 44 mg DQO /L) y butirato, así como otros ácidos superiores, como caproato y valerato, aunque en concentraciones menores a los 150 mg DQO/L. (**Figura 6-3**). Esta concentración de acetato es mayor a lo reportado en otros trabajos con vinazas en termofilia durante el periodo de aclimatación (Ramos y Silva, 2020; Albuquerque, et al, 2019). Sin embargo, aún se encuentra por debajo de las concentraciones inhibitorias reportadas en la literatura. A partir del cambio de medio sintético a efluente de biorrefinería se observó un cambio en el patrón de la composición de AGV, donde se observó una mayor diversidad de estos. Este cambio probablemente se deba a la alimentación semicontinua, así como a la complejidad del efluente utilizado para alimentar el reactor (Náthia-Neves et al., 2018). Se observó una disminución en la concentración de AGV durante el periodo de aclimatación al efluente, esto es un indicativo de la adaptación de las arqueas termofílicas a las condiciones ambientales a las que se encontraban. A los 105 días se obtuvo la concentración más baja durante la etapa de aclimatación. Esta baja concentración, junto con los valores de pH e índice alfa se tomaron en cuenta para determinar que el reactor se encontraba totalmente aclimatado a las condiciones de efluente y temperatura.

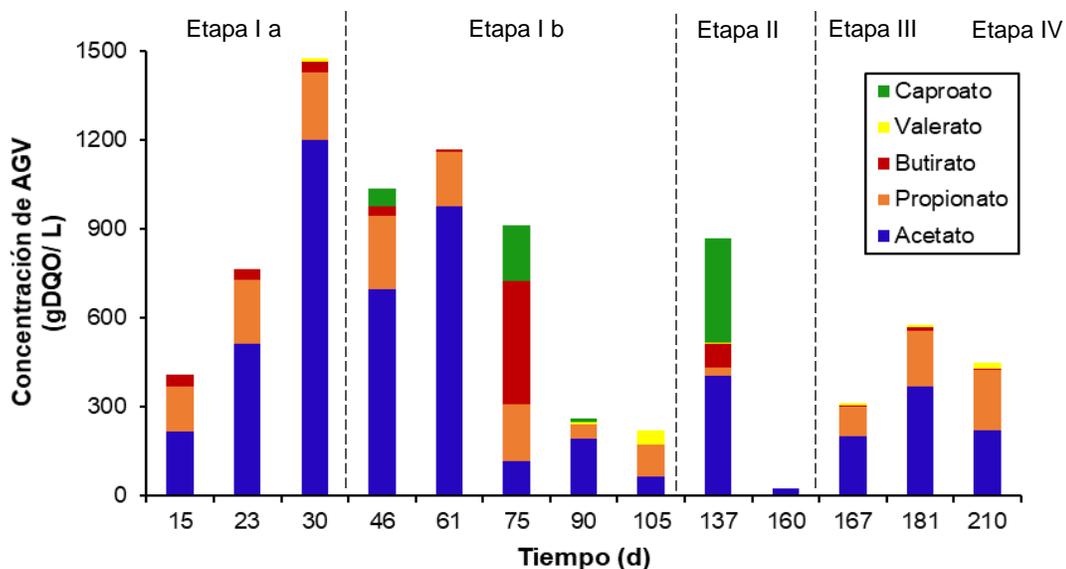


Figura 6-3. Perfil de Ácidos Grasos Volátiles durante la experimentación.

Se observó un incremento en la concentración de AGV en el efluente al cambiar el régimen de alimentación continua (día 137). Esto debido al incremento en la carga orgánica en el reactor, sin embargo, después de 25 días de operación la concentración de AGV a la salida era prácticamente nula. Al incrementar la carga orgánica en el día 167 se observó un incremento en la concentración de estos ácidos en el reactor y, a diferencia de la etapa anterior, la concentración de AGV al final de esta etapa fue mayor que al inicio. Yamada et al.(2006) reportaron una disminución en el porcentaje de remoción al incrementar la carga orgánica debido a la acumulación de AGV Debido a estos indicios de acumulación de AGV, se optó por no continuar incrementando la carga orgánica ya que el reactor comenzaba a ser sobrepasado en capacidad.

Durante las etapas finales de operación (167-210), se observó un incremento en la concentración de ácido propiónico en efluente del reactor. Este ácido es el primero en presentar acumulación al incrementar la carga orgánica (Lettinga, 1983), además, la proporción propionato /acetato puede ser utilizada como un indicador de desbalance en el reactor si este excede un valor de 1.4 (Barros et al., 2017). En este trabajo la proporción propionato /acetato pasó de 0.076 en el día 166, a 0.652 en el día 210. La conversión propionato a acetato se considera el paso limitante en

reactores anaerobios ya que es la primera ruta metabólica sujeta a interferencia cuando no existen las condiciones adecuadas en el reactor (Fuess et al., 2017).

6.4. Desempeño del proceso de digestión anaerobia

El reactor termofílico metanogénico fue operado durante 216 días. Durante la fase I, se realizó el arranque del reactor en condiciones termofílicas con glucosa (I a), así como la aclimatación con efluente de biorrefinería lignocelulósica (I b). Una vez obtenida la biomasa aclimatada, se procedió a la operación en continuo a partir del día 126. Se evaluaron tres tiempos de retención (1, 0.75 y 2 días) resultando en cargas orgánicas de 5 y 8.5 kg DQO/ m³ d. Durante la fase de aclimatación al efluente (Etapa I b) se mantuvo una carga orgánica de 0.737 kg DQO/ m³ d, lo que corresponde a un TRH de 14 días. Con esta estrategia se consiguió pasar de una eficiencia de remoción de DQO de 30% a 50% durante los primeros ciclos de operación (**Figura 6-4.B**).

Cabe mencionar que, al finalizar la etapa III de operación, al no observarse un incremento proporcional entre la carga orgánica y la productividad de biogás, se aumentó el TRH a 2 días para tratar de mejorar la productividad del reactor. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presenta el resumen de las distintas etapas del proceso y los principales parámetros evaluados durante la operación. Al pasar a una operación en continuo (día 126) la eficiencia de remoción se mantuvo en un valor de 50% y, no se observó una diferencia significativa al realizar las variaciones del parámetro TRH durante el resto de la experimentación.

La eficiencia de remoción obtenida en esta investigación es menor a lo obtenido en otros estudios de digestión anaerobia de vinazas en reactores UASB operados en termofilia (**Tabla 6-3**). Esto se debe a la generación de compuestos recalcitrantes durante el pretratamiento hidrotérmico de la biomasa. Ortega-Martínez et al., (2021) demostraron la generación de material recalcitrante al realizar un tratamiento hidrotérmico a un sustrato, lo que llevó a una reducción del 30% de la degradación de la DQO durante un proceso anaerobio en termofilia.

Tabla 6-2. Resultados obtenidos durante la evaluación del desempeño del reactor UASB.

Parámetro	Etapa I b	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
Tiempo (d)	36-96	126-166	166-192	192-216
Carga orgánica (kg DQO/ m ³ d)	0.714	5	8.5	5
TRH (d)	14	1	0.75	2
DQO efluente (mg /L)	2575 ± 338	2459.75 ± 135.9	2391 ± 216.9	5730 ± 1000
Eficiencia de remoción de DQO (%)	49 ± 3.2	48 ± 2	50 ± 2.3	39 ± 12
Producción volumétrica de metano (N L CH ₄ / L reactor d)	0.096 ± 0.069	0.363 ± 0.017	0.418 ± 0.040	0.419 ± 0.049
Producción máxima de metano (N L CH ₄ / kg DQO removido)	38.58	145.40	167.12	167.52

La productividad de metano en el reactor pasó de 0.096 N L CH₄ / L reactor d durante la fase de aclimatación, a 0.363 N L CH₄ / L reactor d al cambiar a una operación en continuo y una carga orgánica de 5 kg DQO/ m³ d (**Figura 6-4A**). Contrario a lo esperado, no se observó una diferencia significativa en la productividad al reducir el TRH e incrementar la carga orgánica. Kaparaju et al. (2010) obtuvieron rendimientos similares al tratar el efluente de una biorrefinería de segunda generación y observaron un decremento en la producción de biogás al incrementar la carga orgánica.

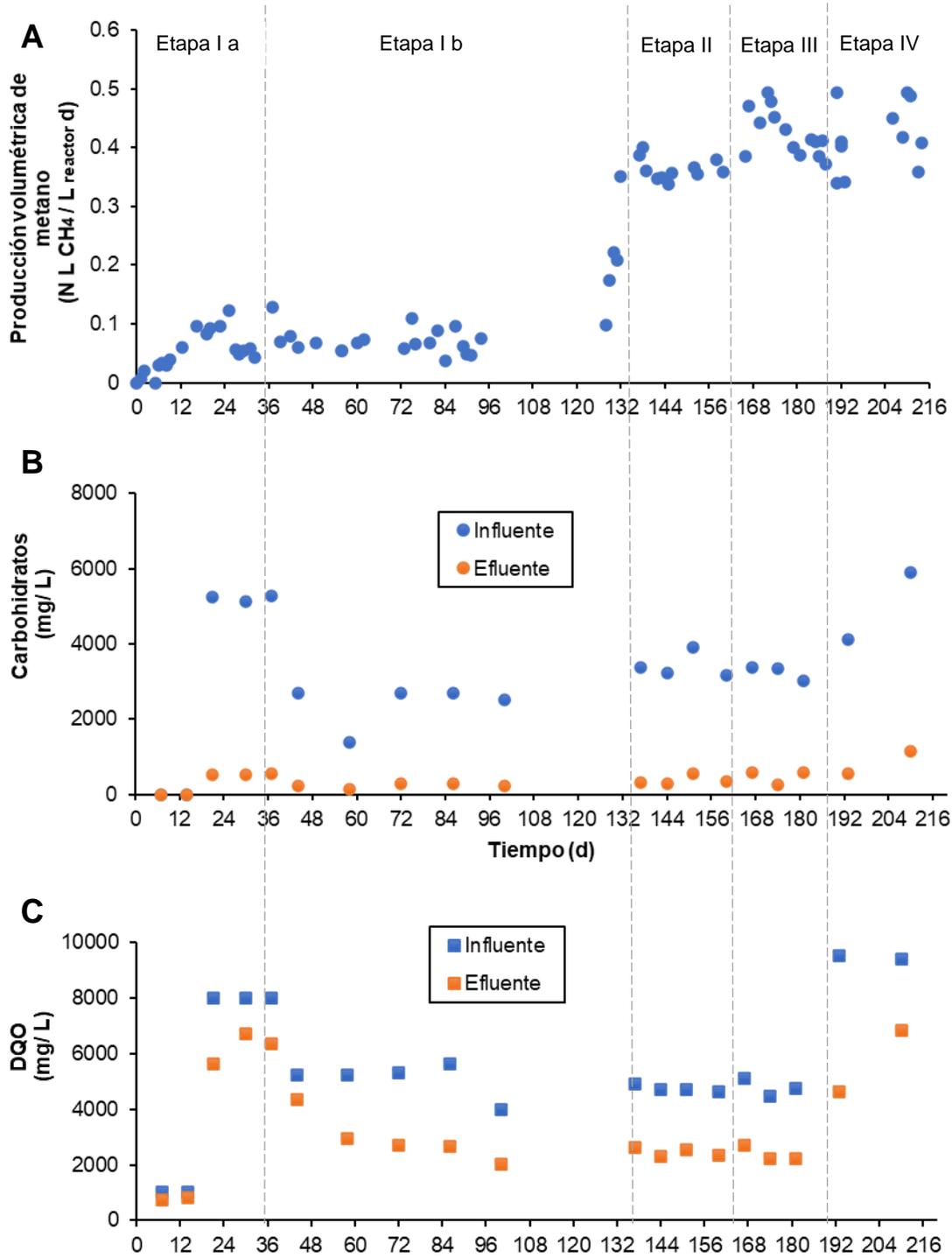


Figura 6-4. A) Productividad de metano en el reactor UASB B) Concentración de DQO en el Influyente y Efluente del reactor y C) Concentración de carbohidratos en el Influyente y Efluente del reactor.

Existen en la literatura algunos estudios sobre termofilia en reactores UASB, en los cuales se han obtenido eficiencias de remoción de DQO por arriba de lo obtenido en este trabajo. Además, estos estudios tuvieron productividades superiores a los 2 N L CH₄ / L reactor d (Tabla 6-3).

Tabla 6-3. Operación de reactores UASB para el tratamiento de efluentes de biorrefinerías en condiciones termofílicas.

Alimentación	Carga orgánica (kg DQO m ³ d)	TRH (d)	Producción máxima de metano (LCH ₄ / kgDQO)	Productividad de metano (N L CH ₄ / L d)	Eficiencia de remoción (%)	Referencia
Biorrefinería de caña de azúcar	28	24	240	3.3	70	Barros et al., 2017
Biorrefinería de caña de azúcar	20	1.6	234.2	2.1	60	Djalma Nunes Ferraz Júnior et al., 2016
Biorrefinería lignocelulósica	17.1	2	154.8	ND	76	Kaparaju et al., 2010
Biorrefinería lignocelulósica	8.5	0.7	167.1	0.4	50	Este trabajo

Las altas productividades y eficiencias de remoción en estos trabajos con respecto a lo obtenido en este trabajo se deben al hecho de que fueron realizados con vinazas obtenidas de procesos que no involucran ningún tipo de pre tratamiento a altas temperaturas o presiones. Este tipo de pretratamientos presentan como desventaja la generación de compuestos inhibitorios, derivados de la degradación de la lignocelulosa (Ximenes et al., 2017). Estudios previos a este trabajo han demostrado que estos compuestos, como los fenoles, y otros compuestos derivados de la degradación de la hemicelulosa, así como de aquellos generados durante las reacciones de Maillard, pueden llegar a tener un efecto inhibitorio en la producción de biogás (Barakat et al., 2014; Ghasimi et al., 2016; Ortega-Martínez et al., 2021).

6.5. Actividad metanogénica específica (AME)

Durante la aclimatación con medio sintético, se observó un incremento gradual de la AME acetoclástica en cada ciclo hasta alcanzar una máxima actividad de 0.044 g CH₄- DQO/ gSV día a los 30 días de operación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kalogo et al. (2001) durante el arranque de un reactor UASB mesofílico auto inoculado. En este estudio, la baja actividad se debe a la utilización de un lodo mesofílico, el cual debe hacer el cambio de la comunidad microbiana a las bacterias y arqueas termofílicas. El incremento de la actividad metanogénica durante las primeras semanas de operación demuestra una gradual adaptación del lodo a condiciones termofílicas.

Se evaluó la AME acetoclástica y otros parámetros cinéticos al terminar la etapa experimental a fin de conocer el efecto que tuvo el efluente sobre la capacidad del lodo a producir metano. La AME acetoclástica al final de la etapa experimental presentó un incremento, al pasar de los 0.044 a 0.3710 g CH₄-DQO/ gSV día. Los resultados de la cinética se presentan en la **Tabla 6-4**. Este resultado es menor a los reportados en la literatura, que se encuentran entre 1.51 y 2.89, para AME con acetato (Ahn et al., 2000; Ahring et al., 2001). Por otro lado, Yamada et al. (2006) reportaron una actividad metanogénica acetoclástica de 1.95 g CH₄- DQO/ gSV día al finalizar la operación de un reactor UASB que trataba una vinaza de destilación de alcohol en termofilia. Estos valores son hasta 6 veces más altos que el resultado obtenido en este trabajo. Está demostrado que la actividad metanogénica depende de las características del efluente e un cambio en ésta se debe a la presencia de compuestos inhibitorios, así como la acumulación de compuestos de lenta o nula biodegradabilidad (Hussain et al., 2015). Una posible explicación es la presencia de los compuestos fenólicos encontrados en el efluente. En este sentido, se ha demostrado que los compuestos fenólicos pueden llegar a reducir hasta en un 50% la AME, sin llegar a la completa inhibición debido a la adaptación de ciertos organismos (Chapleur et al., 2016).

Es interesante observar cómo la presencia de la materia recalcitrante tuvo un efecto negativo en los distintos parámetros cinéticos del lodo. (Li et al., 2020)

obtuvieron una fase de adaptación menor a las 48 h., en la degradación termofílica de acetato. Se han demostrado largos tiempo de aclimatación en procesos termofílicos en presencia de compuestos fenólicos (Levén et al., 2012). En esta investigación se obtuvo un periodo de adaptación de más del doble para la degradación de acetato. La tasa de producción de metano ($R_{\text{máx}}$) en este trabajo fue 3 veces menor a lo reportado por (Figuroa-González et al., 2018) para un lodo anaerobio termofílico, la cual fue de 27.52 mL/ gDQO h al utilizar una vinaza vitivinícola como sustrato.

Tabla 6-4. Resultados de los parámetros cinéticos de la producción de metano después del tratamiento de un efluente de biorrefinería lignocelulósica.

AME (CH ₄ - DQO/ gSV día)	H máx (mL/ gDQO)	R máx (mL/ gDQO h)	λ (h)	R
0.37	114.5	8.3	100.4	0.997

Aunque se ha demostrado que las altas temperaturas generan condiciones cinéticas favorables para la actividad de los organismos anaerobios (Ahn et al., 2000), los resultados aquí obtenidos demuestran que la presencia de los compuestos inhibitorios en los efluentes lignocelulósicos tiene un efecto negativo sobre la actividad metanogénica del lodo.

6.6. Cambios en la estructura de la comunidad microbiana

Se pudo observar un incremento en la diversidad, tanto de arqueas como de bacterias, al finalizar la etapa de aclimatación (**Figura 6-5** A, C). Esto posiblemente se deba a que el lodo termofílico aún continuaba en periodo de aclimatación a las condiciones de temperatura empleadas. Con respecto a la abundancia de organismos, se puede observar que ésta disminuyó en el caso de las bacterias al terminar la aclimatación al efluente. (**Figura 6-5** B, D). Al finalizar la etapa de aclimatación se obtuvo un lodo más diverso, pero con una menor cantidad de organismos (**Tabla 6-5**). Un lodo con mayor diversidad permite una mejor sinergia entre organismos y permite la utilización de diferentes metabolitos para su

conversión a metano. Sin embargo, al pasar a un régimen de alimentación continua y elevar la carga orgánica en el reactor, se pudo observar un descenso drástico en los índices de abundancia y diversidad, tanto en bacterias como en arqueas.

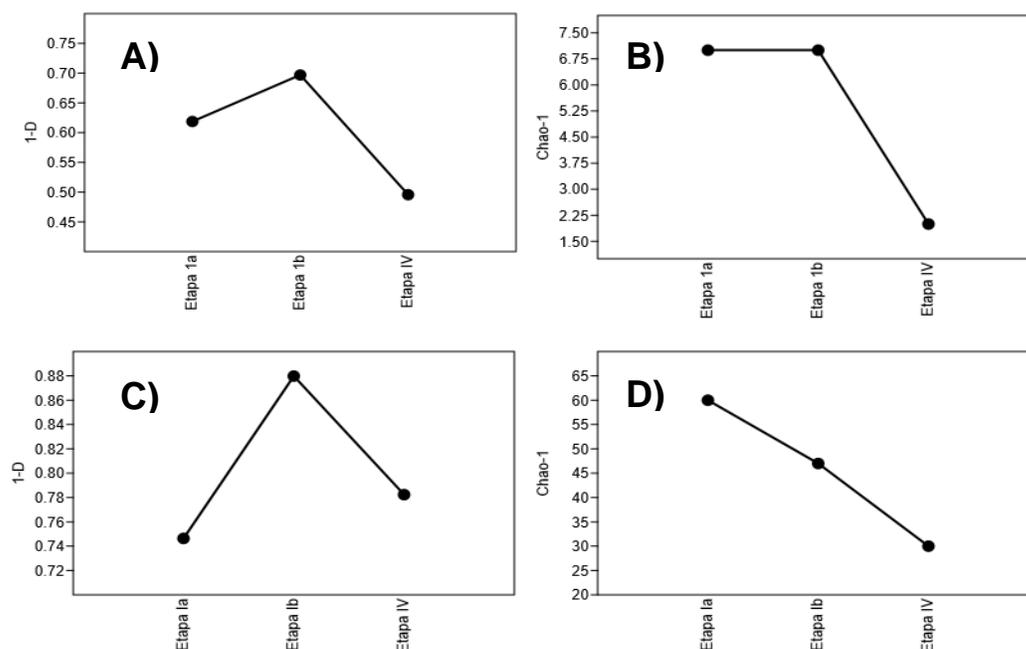


Figura 6-5. Evolución de la diversidad alfa durante la operación del reactor anaerobio A) índice de diversidad Simpson, B) índice de abundancia Chao-1 para arqueas; C) índice de diversidad Simpson y D) índice de abundancia Chao-1 de bacterias, a distintas etapas de operación.

Este resultado demuestra que la exposición a altas cargas orgánicas de un efluente de biorrefinería lignocelulósica ejerció una presión selectiva en la comunidad del lodo termofílico debido a la presencia de compuestos tóxicos derivados del pretratamiento hidrotérmico. La baja diversidad en procesos termofílicos en presencia de compuestos fenólicos puede causar una disminución en la capacidad de degradación de los procesos anaerobios (Levén et al., 2012)., además de un bajo rendimiento en la producción de metano ((Merlino et al., 2013).

Tabla 6-5. Índices de diversidad alfa obtenidos a distintas etapas de operación.

Etapa	Índices de diversidad alfa	
	Simpson	Chao-1
Arqueas		
Etapa I a	0.6188	7
Etapa I b	0.6969	7
Etapa IV	0.4957	2
Bacterias		
Etapa I a	0.7464	60
Etapa I b	0.8798	47
Etapa IV	0.7824	30

6.6.1. Evolución taxonómica de arqueas

Los principales filos encontrados en el lodo durante la operación del reactor pertenecieron a Euryarchaeota (56%), Halobacterota (41%). A nivel orden, la taxonomía del lodo al terminar la fase de aclimatación a termofilia consistió principalmente de orden Methanobacteriales (55%), seguido del orden Methanosarcinales (24%). Al terminar la fase de aclimatación, se observó un incremento en la diversidad de las arqueas termofílicas (**Figura 6-6**). Finalmente, la presión selectiva que ejerció el efluente terminó reducir esta distribución y únicamente se observó la presencia de Methanobacteriales (55%) y Methanosarcinales (45%) al finalizar la fase experimental. Los géneros dominantes fueron *Methanosarcina* y *Methanothermobacter* (45% y 55%, respectivamente). Buitrón, et al., (2019) reportaron la dominancia de *Methanothermobacter* al finalizar la operación de un reactor en termofilia alimentado con vinazas vitivinícolas. Barros et al., (2017) obtuvieron una abundancia del 80% de *Methanothermobacter* al tratar vinazas de la producción de etanol. En este trabajo, la presencia de este género fue solo del 55%, esto demuestra la influencia del sustrato en la composición de las arqueas en un lodo.

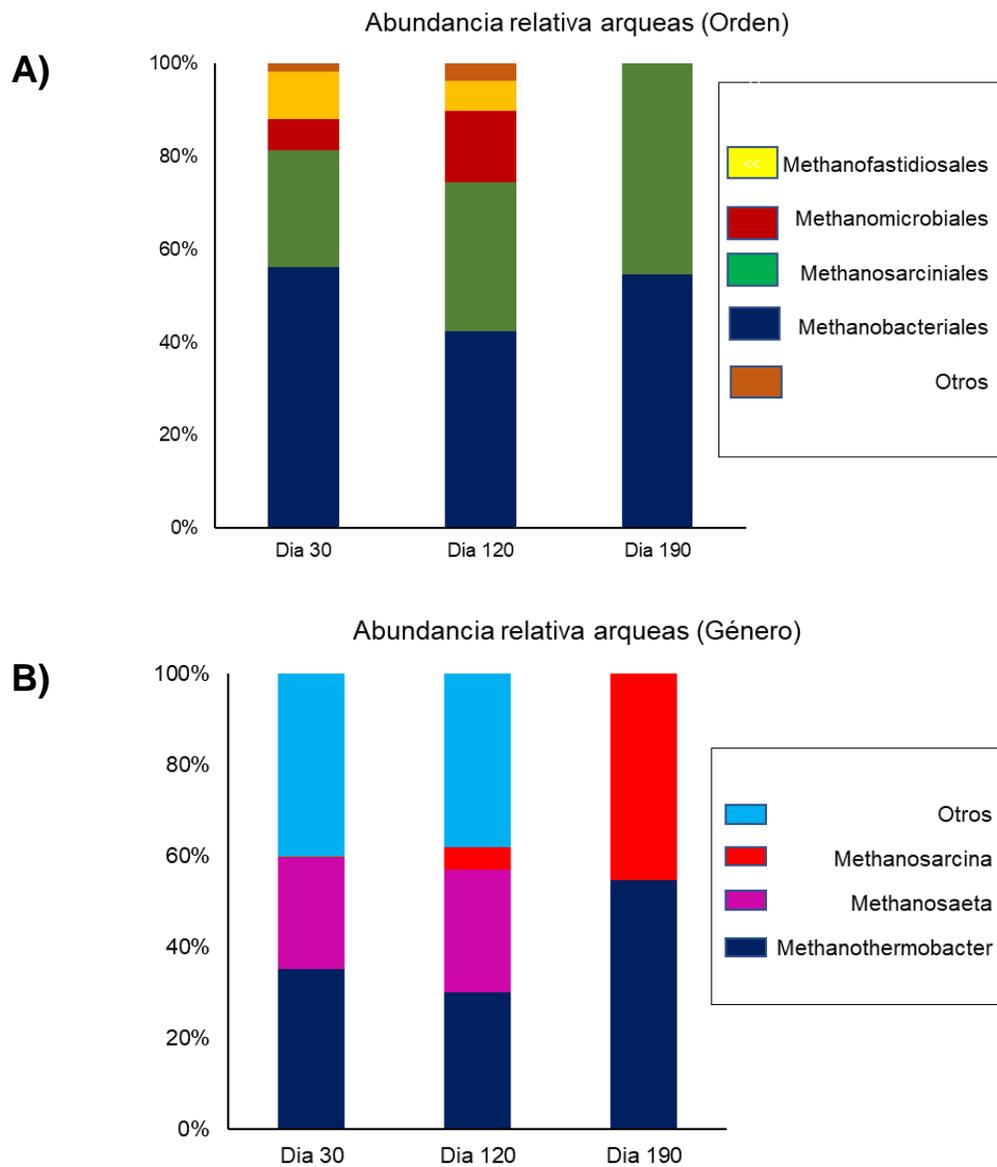


Figura 6-6. Cambios en la estructura de la comunidad microbiana en A) Orden y B) Género, de las muestras tomadas durante diferentes periodos de tiempo.

La presencia de *Methanosarcina* indica que este género es el responsable la conversión de acetato a metano, al ser la única arquea termófila acetoclástica (Ollivier y Cayol, 2010) La presencia de *Methanothermobacter* en una proporción casi idéntica a la de *Methanosarcina*, demuestra la importancia de la ruta hidrogenotrófica en el tratamiento de este tipo de efluentes por lo que es necesario

más investigación en el futuro, a fin de comprender mejor esta ruta metabólica, así como las posibles sinergias con las bacterias termofílicas presentes en el lodo.

6.6.2. Evolución taxonómica de bacterias

El filo principal observado en el lodo termofílico fue Coprothermobacterota (28%). Este filo constituye una de las principales líneas de descendencia en el dominio bacteria, son organismos fermentadores quimiorganotrofos que producen ácido acético, hidrogeno y CO₂ (Pavan et al., 2019). Sin embargo, al finalizar la fase experimental fueron los filos Planctonmycetota (15%) y Firmicutes (12%) los que se encontraron en mayor abundancia. Estudios previos han encontrado a Firmicutes, como el filo dominante en reactores UASB alimentado con vinazas (Barros et al., 2017; Callejas et al., 2022; Martínez et al., 2014).

A nivel orden, la taxonomía del lodo al terminar la fase de aclimatación consistió principalmente de orden Coprothermobacterales (47%), seguido de una gran diversidad de órdenes, los cuales se encontraron distribuidos de manera equitativa, entre 1 y 5%. Al finalizar la fase de aclimatación se observó un enriquecimiento del lodo (**Figura 6-7**).

Es interesante observar el efecto que el efluente tuvo sobre los Coprothermobacterales, los cuales claramente no resistieron las condiciones ambientales del reactor, lo que generó una reducción en su abundancia a solamente el 8%. Caso contrario lo sucedido con los Thermotogales y el orden MSBL9, los cuales pasaron de una abundancia menor al 2%, a ser los dominantes con un 19% y 40%, respectivamente al finalizar la fase experimental. Estudios previos han demostrado la capacidad del orden MSBL9, como fermentadores especializados, los cuales tienen la capacidad de metabolizar carbohidratos a etanol, acetato y lactato (Suominen et al., 2021). El orden Thermotogales se caracteriza por ser organótrofos, capaces de fermentar carbohidratos simples y complejos, con la formación de lactato, acetato e hidrógeno como productos finales de su metabolismo (Bonch-Osmolovskaya, 2008).

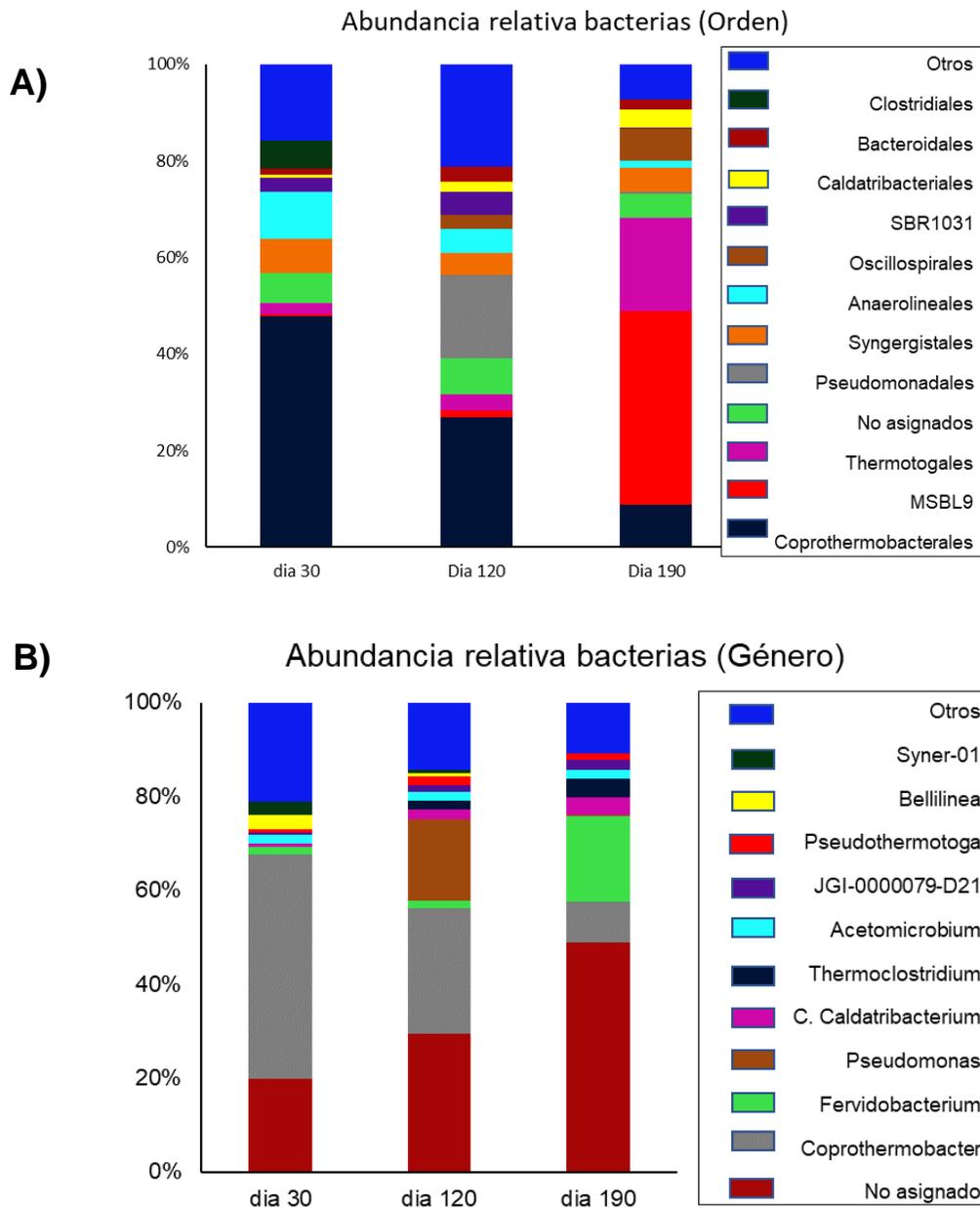


Figura 6-7. Abundancia de bacterias termofílicas a nivel A) Orden y B) Género, en distintas etapas del proceso.

El género dominante al iniciar la fase experimental en termofilia fue *Coprothermobacter*, con un 48% de abundancia en el lodo termofílico. El género *Fervidobacterium* fue uno de los que se vio favorecido por el cambio de sustrato a biorrefinería. Este género se caracteriza por la conversión de carbohidratos a diferentes AGV, así como la producción de CO₂ e H₂. (Huber y Stetter, 2015). Niz

et al., (2021) reportaron una gran abundancia de *Fervidobacterium* y *Coprothermobacter* en un reactor anaerobio en termofilia alimentado con vinazas de primera generación. *C. Caldatribacterium*, tuvo un ligero incremento en su abundancia en la etapa final del proceso. Este género está asociado con la producción de hidrógeno y ácidos grasos (Ao et al., 2019). La presencia del efluente de biorrefinería lignocelulósica a altas cargas orgánicas llevó a un cambio en la distribución de especies en la comunidad microbiana hacia una dominancia de géneros no asignados (49%). Debido a la característica experimental del efluente, es necesario continuar con el estudio de comunidades microbianas a fin de entender mejor estos géneros desconocidos y su rol en el tratamiento anaerobio de vinazas lignocelulósicas.

Los datos obtenidos en este trabajo soportan el rol del orden Thermotogales y, principalmente el orden MSBL9 como los principales degradadores de los carbohidratos complejos presentes en el efluente de una biorrefinería de segunda generación. Estos resultados sugieren un papel clave del orden MSBL9 en la ruta de degradación de vinazas lignocelulósicas, así como una resistencia a los compuestos tóxicos presentes en éstas. Debido a esto, es necesario realizar más estudios con herramientas de biología molecular, a fin de poder tener mejor entendimiento de este orden en la degradación de efluentes lignocelulósicos.

7. Conclusiones

El presente trabajo demuestra que es posible la digestión anaerobia en condiciones termofílicas de un efluente de biorrefinería lignocelulósica, sin embargo, la producción de metano y la eficiencia de remoción fueron bajas con respecto a otros procesos termofílicos con efluentes de biorrefinerías. Los mejores resultados del tratamiento de este efluente se obtuvieron con un TRH de 18 horas (0.75 días) y una carga orgánica de 8.5 kg DQO/ m³ d. La máxima productividad de metano obtenida fue de 0.43 N L CH₄ / L reactor d y fue lograda a los 160 días de operación del reactor. El máximo rendimiento de metano alcanzado fue de 167 N L CH₄/ kg DQO removido. Se logró la completa remoción de la fracción biodegradable correspondiente a los carbohidratos presentes en el efluente, con una máxima eficiencia de remoción de DQO del 50%.

La concentración de compuestos inhibitorios en el efluente generó una disminución de la actividad metanogénica específica termofílica del lodo utilizado, así como en otros parámetros cinéticos, lo que llevó a una baja producción de metano. La exposición a altas concentraciones de efluente de biorrefinería lignocelulósica llevó a una presión selectiva en el lodo, lo que redujo la diversidad de la comunidad microbiana, tanto de bacterias como de arqueas. Los filos más abundantes correspondientes a las bacterias en el lodo termofílico al final del proceso fueron Planctonmycetoa y Firmicutes. A nivel orden, las arqueas Methanobacteriales y Methanosarcinales fueron los que se encontraron en mayor proporción. El orden de bacterias MSBL9 desempeña un papel clave en la degradación de la fracción biodegradable de un efluente de biorrefinería lignocelulósica.

8. Referencias

- Abd Nasir, M. A., Jahim, J. M., Abdul, P. M., Silvamany, H., Maaroff, R. M., & Mohammed Yunus, M. F. (2019). The use of acidified palm oil mill effluent for thermophilic biomethane production by changing the hydraulic retention time in anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *44*(6), 3373–3381. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2018.06.149>
- Aguilar, D. L., Rodríguez-Jasso, R. M., Zanuso, E., de Rodríguez, D. J., Amaya-Delgado, L., Sanchez, A., & Ruiz, H. A. (2018). Scale-up and evaluation of hydrothermal pretreatment in isothermal and non-isothermal regimen for bioethanol production using agave bagasse. *Bioresource Technology*, *263*, 112–119. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.04.100>
- Ahn, Y., Lee, Y. J., Kim, H.-S., & Park, S. (2000). Monitoring of specific methanogenic activity of granular sludge by confocal laser scanning microscopy during start-up of thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biotechnology Letters*, *22*(20), 1591–1596. <https://doi.org/10.1023/A:1005696017394>
- Ahring, B. K., Ibrahim, A. A., & Mladenovska, Z. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Research*, *35*(10), 2446–2452. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00526-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00526-1)
- Akunna, J. C. (2018). *Anaerobic Waste-Wastewater Treatment and Biogas Plants*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351170529>
- Alberto, C., Bustamante, G., & Cerutti, O. M. (2016). *ESTADO DEL ARTE DE LA BIOENERGÍA EN MÉXICO*.
- Albuquerque, J. N., Ratusznei, S. M., & Rodrigues, J. A. D. (2019). Biomethane production by thermophilic co-digestion of sugarcane vinasse and whey in an AnSBBR: Effects of composition, organic load, feed strategy and temperature. *Journal of Environmental Management*, *251*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109606>
- Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *3*(2), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>
- Ao, T., Li, R., Chen, Y., Li, C., Li, Z., Liu, X., Ran, Y., & Li, D. (2019). Anaerobic Thermophilic Digestion of Maotai-Flavored Distiller's Grains: Process Performance and Microbial Community Dynamics. *Energy & Fuels*, *33*(9), 8804–8811. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b02582>

- Azapagic, A. (2014). Sustainability considerations for integrated biorefineries. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.009>
- Ballesteros, L. F., Michelin, M., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Cerqueira, M. Â. (2018). *Lignocellulosic Materials: Sources and Processing Technologies* (pp. 13–33). https://doi.org/10.1007/978-3-319-92940-8_2
- Barakat, A., Kadimi, A., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2014). Impact of xylan structure and lignin–xylan association on methane production from C5-sugars. *Biomass and Bioenergy*, 63, 33–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.033>
- Barros, V. G. de, Duda, R. M., & Oliveira, R. A. de. (2016). Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 628–639. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2016.04.021>
- Barros, V. G. de, Duda, R. M., Vantini, J. da S., Omori, W. P., Ferro, M. I. T., & Oliveira, R. A. de. (2017). Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and Thermotogae bacteria. *Bioresource Technology*, 244, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.106>
- Bayr, S., & Rintala, J. (2012). Thermophilic anaerobic digestion of pulp and paper mill primary sludge and co-digestion of primary and secondary sludge. *Water Research*, 46(15), 4713–4720. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.033>
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H. M. N., Hu, H., & Zhang, X. (2017). Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 447–458. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.01.133>
- Bonch-Osmolovskaya, E. (2008). Thermotogales. En *eLS*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000467.pub2>
- Buitrón, G., Hernández-Juárez, A., Hernández-Ramírez, M. D., & Sánchez, A. (2019). Biochemical methane potential from lignocellulosic wastes hydrothermally pretreated. *Industrial Crops and Products*, 139, 111555. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.111555>
- Buitrón, G., Martínez-Valdez, F. J., & Ojeda, F. (2019). Biogas Production from a Highly Organic Loaded Winery Effluent Through a Two-Stage Process. *Bioenergy Research*, 12(3), 714–721. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-09984-7>

- Cabrera-Díaz, A., Pereda-Reyes, I., Oliva-Merencio, D., Lebrero, R., & Zaiat, M. (2017). Anaerobic Digestion of Sugarcane Vinasse Through a Methanogenic UASB Reactor Followed by a Packed Bed Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(4), 1127–1145. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2488-2>
- Callejas, C., López, I., Bovio-Winkler, P., Etchebehere, C., & Borzacconi, L. (2022). Temporal analysis of the microbiota involved in the anaerobic degradation of sugarcane vinasse in a full-scale methanogenic UASB reactor. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(9), 3887–3897. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01281-8>
- Castrillón, L., Vázquez, I., Marañón, E., & Sastre, H. (2002). Anaerobic thermophilic treatment of cattle manure in UASB reactors. *Waste Management and Research*, 20(4), 350–356. <https://doi.org/10.1177/0734247X0202000406>
- Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P., Fatone, F., & Cecchi, F. (2013). Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge and source sorted biowaste in pilot- and full-scale reactors. *Renewable Energy*, 55, 260–265. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2012.12.044>
- Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264, 370–381. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.06.004>
- Chapleur, O., Madigou, C., Civade, R., Rodolphe, Y., Mazéas, L., & Bouchez, T. (2016). Increasing concentrations of phenol progressively affect anaerobic digestion of cellulose and associated microbial communities. *Biodegradation*, 27(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9751-4>
- Chen, H., Hao, S., Chen, Z., O-Thong, S., Fan, J., Clark, J., Luo, G., & Zhang, S. (2020). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of aqueous phase generated from hydrothermal liquefaction of cornstalk: Molecular and metabolic insights. *Water Research*, 168, 115199. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2019.115199>
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2013.09.005>
- Clark, J., & Deswarte, F. (2015). The Biorefinery Concept. *Introduction to Chemicals from Biomass: Second Edition*, 9781118714485, 1–29. <https://doi.org/10.1002/9781118714478.CH1>
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., & Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y

- contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55–81. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- de Albuquerque, J. N., Orellana, M. R., Ratusznei, S. M., & Rodrigues, J. A. D. (2019). Thermophilic biomethane production by vinasse in an AnSBBR: Start-up strategy and performance optimization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(2), 717–731. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20170611>
- de Bhowmick, G., Sarmah, A. K., & Sen, R. (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*, 247, 1144–1154. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.163>
- de La Rubia, Á., Pérez, M., Sales, D., & Romero, L. I. (2006). Municipal sludge degradation kinetic in thermophilic CSTR. *AIChE Journal*, 52(12), 4200–4206. <https://doi.org/10.1002/AIC.11004>
- Djalma Nunes Ferraz Júnior, A., Koyama, M. H., de Araújo Júnior, M. M., & Zaiat, M. (2016). Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renewable Energy*, 89, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.064>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (s/f). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Recuperado el 28 de agosto de 2022, a partir de <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- España-Gamboa, E. I., Mijangos-Cortés, J. O., Hernández-Zárata, G., Maldonado, J. A. D., & Alzate-Gaviria, L. M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels*, 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-82>
- Feng, S., Hou, S., Huang, X., Fang, Z., Tong, Y., & Yang, H. (2019). Insights into the microbial community structure of anaerobic digestion of municipal solid waste landfill leachate for methane production by adaptive thermophilic granular sludge. *Electronic Journal of Biotechnology*, 39, 98–106. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2019.04.001>
- Fernández-Domínguez, D., Astals, S., Peces, M., Frison, N., Bolzonella, D., Mata-Alvarez, J., & Dosta, J. (2020). Volatile fatty acids production from biowaste at mechanical-biological treatment plants: Focusing on fermentation temperature. *Bioresource Technology*, 314, 123729. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123729>
- Figuroa-González, I., Moreno, G., Carrillo-Reyes, J., Sánchez, A., Quijano, G., & Buitrón, G. (2018). From mesophilic to thermophilic conditions: one-step temperature increase improves the methane production of a granular sludge

- treating agroindustrial effluents. *Biotechnology Letters*, 40(3), 569–575. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2490-3>
- Fiorese, G., Catenacci, M., Verdolini, E., & Bosetti, V. (2013). Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey. *Energy Policy*, 56, 293–311. <https://doi.org/10.1016/J.ENPOL.2012.12.061>
- Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>
- Gebreyessus, G. D., & Jenicek, P. (2016). Thermophilic versus Mesophilic Anaerobic Digestion of Sewage Sludge: A Comparative Review. *Bioengineering* 2016, Vol. 3, Page 15, 3(2), 15. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING3020015>
- Ghasimi, D. S. M., Aboudi, K., de Kreuk, M., Zandvoort, M. H., & van Lier, J. B. (2016). Impact of lignocellulosic-waste intermediates on hydrolysis and methanogenesis under thermophilic and mesophilic conditions. *Chemical Engineering Journal*, 295, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.045>
- Ghatak, H. R. (2011). Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 4042–4052. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2011.07.034>
- Hamelinck, C. N., & Faaij, A. P. C. (2006). Outlook for advanced biofuels. *Energy Policy*, 34(17), 3268–3283. <https://doi.org/10.1016/J.ENPOL.2005.06.012>
- Hao, J., & Wang, H. (2015). Volatile fatty acids productions by mesophilic and thermophilic sludge fermentation: Biological responses to fermentation temperature. *Bioresource Technology*, 175, 367–373. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.10.106>
- Harada, H., Uemura, S., Chen, A.-C., & Jayadevan, J. (1996). ANAEROBIC TREATMENT OF A RECALCITRANT DISTILLERY WASTEWATER BY A THERMOPHILIC UASB REACTOR. En *Bioresource Technology* (Vol. 55).
- Hassan, S. S., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2019). Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: Drivers, challenges, and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 101, 590–599. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.11.041>
- Herrmann, C., Ramm, P., & Murphy, J. D. (2018). The relationship between bioreactor design and feedstock for optimal biogas production. *Green Energy and Technology*, 0(9789811076763), 163–197. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0_5/TABLES/2

- Huber, R., & Stetter, K. O. (2015). *Fervidobacterium*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–5). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01269>
- Hussain, A., Shashi, •, & Dubey, K. (2015). Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Applied Water Science* 2015 7:2, 7(2), 535–542. <https://doi.org/10.1007/S13201-015-0305-Z>
- Intanoo, P., Rangsangvit, P., Malakul, P., & Chavadej, S. (2014). Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 173, 256–265. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.09.039>
- Jia, X., Xi, B. D., Li, M. X., Yang, Y., & Wang, Y. (2017). Metaproteomics analysis of the functional insights into microbial communities of combined hydrogen and methane production by anaerobic fermentation from reed straw. *PLOS ONE*, 12(8), e0183158. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0183158>
- Jing, X., Zhang, X., & Bao, J. (2009). Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(3), 696–707. <https://doi.org/10.1007/S12010-009-8525-Z/FIGURES/6>
- Kalogo, Y., MBouche, J. H., & Verstraete, W. (2001). Physical and Biological Performance of Self-Inoculated UASB Reactor Treating Raw Domestic Sewage. *Journal of Environmental Engineering*, 127(2), 179–183. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2001\)127:2\(179\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2001)127:2(179))
- Kaparaju, P., Serrano, M., & Angelidaki, I. (2010). Optimization of biogas production from wheat straw stillage in UASB reactor. *Applied Energy*, 87(12), 3779–3783. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.06.005>
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2011). Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(4–5), 408–415. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2011.01.007>
- Kotsyurbenko, O. R. (2010). Methanogenic Communities. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 615–624). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_49
- Lettinga, G. (1980). *Starting up of a Thermophilic anaerobic digestion*.
- Lettinga, G., van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., de Zeeuw, W., & 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. <https://doi.org/10.1002/BIT.260220402>

- Levén, L., Nyberg, K., & Schnürer, A. (2012). Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste – A review of important microorganisms and impact of temperature. *Journal of Environmental Management*, 95(SUPPL.), S99–S103. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2010.10.021>
- Li, Q., Liu, Y., Yang, X., Zhang, J., Lu, B., & Chen, R. (2020). Kinetic and thermodynamic effects of temperature on methanogenic degradation of acetate, propionate, butyrate and valerate. *Chemical Engineering Journal*, 396, 125366. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125366>
- Liguori, R., & Faraco, V. (2016). Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*, 215, 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.04.054>
- Lin, C. Y., Noike, T., Sato, K., & Matsumoto, J. (1987). Temperature Characteristics of the Methanogenesis Process in Anaerobic Digestion. *Water Science and Technology*, 19(1–2), 299–300. <https://doi.org/10.2166/WST.1987.0210>
- Liu, R., Gong, H., Xu, Y., Cai, C., Hua, Y., Li, L., Dai, L., & Dai, X. (2021). The transition temperature (42 °C) from mesophilic to thermophilic micro-organisms enhances biomethane potential of corn stover. *Science of The Total Environment*, 759, 143549. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143549>
- Liu, Y. (2010). Taxonomy of Methanogens. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 547–558). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_42
- López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2010). Formation of Fatty Acids. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 385–393). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_26
- Mamimin, C., Prasertsan, P., Kongjan, P., & O-Thong, S. (2017). Effects of volatile fatty acids in biohydrogen effluent on biohythane production from palm oil mill effluent under thermophilic condition. *Electronic Journal of Biotechnology*, 29, 78–85. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2017.07.006>
- Marina, D., Avella, G., Christopher, A., Ortiz García, A., & Mendoza, C. (s/f). *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*.
- Martínez, M. A., Romero, H., & Perotti, N. I. (2014). Two amplicon sequencing strategies revealed different facets of the prokaryotic community associated with the anaerobic treatment of vinasses from ethanol distilleries. *Bioresource Technology*, 153, 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.030>

- Merlino, G., Rizzi, A., Schievano, A., Tenca, A., Scaglia, B., Oberti, R., Adani, F., & Daffonchio, D. (2013). Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Research*, 47(6), 1983–1995. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.01.007>
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2014). Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 32(5), 934–951. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>
- Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 888–903. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.01.023>
- Moset, V., Bertolini, E., Cerisuelo, A., Cambra, M., Olmos, A., & Cambra-López, M. (2014). Start-up strategies for thermophilic anaerobic digestion of pig manure. *Energy*, 74(C), 389–395. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2014.07.003>
- Murphy, J. D., & Thamsiroj, T. (2013). Fundamental science and engineering of the anaerobic digestion process for biogas production. *The Biogas Handbook: Science, Production and Applications*, 104–130. <https://doi.org/10.1533/9780857097415.1.104>
- Náthia-Neves, G., de Alencar Neves, T., Berni, M., Dragone, G., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2018). Start-up phase of a two-stage anaerobic co-digestion process: hydrogen and methane production from food waste and vinasse from ethanol industry. *Biofuel Research Journal*, 18, 813–820. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.2.5>
- Niz, M. Y. K., Fuentes, L., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2021). Sugarcane vinasse extreme thermophilic digestion: a glimpse on biogas free management. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(7), 1405–1421. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02517-7>
- Oh, Y. K., Hwang, K. R., Kim, C., Kim, J. R., & Lee, J. S. (2018). Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. *Bioresource Technology*, 257, 320–333. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.02.089>
- Ollivier*, B., & Cayol, J.-L. (2010). Thermophilic Methanoarchaea Inhabiting Hot Ecosystems. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 681–691). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_54

- Ortega-Martínez, E., Chamy, R., & Jeison, D. (2021). Thermal pre-treatment: Getting some insights on the formation of recalcitrant compounds and their effects on anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*, 282, 111940. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.111940>
- O-Thong, S., Mamimin, C., & Prasertsan, P. (2018). Biohythane Production from Organic Wastes by Two-Stage Anaerobic Fermentation Technology. *Advances in Biofuels and Bioenergy*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.74392>
- Parajuli, R., Dalgaard, T., Jørgensen, U., Adamsen, A. P. S., Knudsen, M. T., Birkved, M., Gylling, M., & Schjørring, J. K. (2015). Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 244–263. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.11.041>
- Parkin, G. F., & Owen, W. F. (1986). Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges. *Journal of Environmental Engineering*, 112(5), 867–920. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1986\)112:5\(867\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1986)112:5(867))
- Parsaee, M., Kiani Deh Kiani, M., & Karimi, K. (2019). A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy*, 122, 117–125. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2019.01.034>
- Patel, A., & Shah, A. R. (2021). Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(2), 108–128. <https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2021.02.001>
- Pavan, M. E., Pavan, E. E., Kämpfer, P., Pettinari, M. J., & López, N. I. (2019). Coprothermobacterota. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–3. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.PBM00036>
- Peterson, A. A., Lachance, R. P., & Tester, J. W. (2010). Kinetic Evidence of the Maillard Reaction in Hydrothermal Biomass Processing: Glucose–Glycine Interactions in High-Temperature, High-Pressure Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(5), 2107–2117. <https://doi.org/10.1021/ie9014809>
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W. J., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R., & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311(5760), 484–489. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1114736/ASSET/51FE6499-18E4-4701-88F6-5DE91BC524D8/ASSETS/GRAPHIC/311_484_F4.JPEG

- Ramos, L. R., & Silva, E. L. (2020). Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5239–5251. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.05.025>
- Rasmussen, H., Tanner, D., Sørensen, H. R., & Meyer, A. S. (2017). New degradation compounds from lignocellulosic biomass pretreatment: routes for formation of potent oligophenolic enzyme inhibitors. *Green Chemistry*, 19, 464. <https://doi.org/10.1039/c6gc01809b>
- Robles, G., Nair, R. B., Kleinstuber, S., Nikolausz, M., & Sárvári Horváth, I. (2018). *Biogas Production: Microbiological Aspects*. 163–198. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77335-3_7
- Rodionova, M. V., Poudyal, R. S., Tiwari, I., Voloshin, R. A., Zharmukhamedov, S. K., Nam, H. G., Zayadan, B. K., Bruce, B. D., Hou, H. J. M., & Allakhverdiev, S. I. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8450–8461. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125>
- Ruiz, H. A., Conrad, M., Sun, S. N., Sanchez, A., Rocha, G. J. M., Romani, A., Castro, E., Torres, A., Rodríguez-Jasso, R. M., Andrade, L. P., Smirnova, I., Sun, R. C., & Meyer, A. S. (2020). Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 299, 122685. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122685>
- Ryue, J., Lin, L., Kakar, F. L., Elbeshbishy, E., Al-Mamun, A., & Dhar, B. R. (2020). A critical review of conventional and emerging methods for improving process stability in thermophilic anaerobic digestion. *Energy for Sustainable Development*, 54, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2019.11.001>
- Saddler, J., Ebadian, M., & Mcmillan, J. D. (2020). *Advanced Biofuels-Potential for Cost Reduction*.
- Sanchez, A., Valdez-Vazquez, I., Soto, A., Sánchez, S., & Tavarez, D. (2017). Lignocellulosic n-butanol co-production in an advanced biorefinery using mixed cultures. *Biomass and Bioenergy*, 102, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2017.03.023>
- Schmidt, J. E., & Ahring, B. K. (1995). Granulation in thermophilic upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995 68:4, 68(4), 339–344. <https://doi.org/10.1007/BF00874144>
- Shi, X., Guo, X., Zuo, J., Wang, Y., & Zhang, M. (2018). A comparative study of thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of food waste and wheat

- straw: Process stability and microbial community structure shifts. *Waste Management*, 75, 261–269. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2018.02.004>
- Sieber, J. R., McInerney, M. J., Plugge, C. M., Schink, B., & Gunsalus, R. P. (2010). Methanogenesis: Syntrophic Metabolism. En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 337–355). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_22
- Souza, M. E., Fuzaro, G., & Polegato, A. R. (1992). Thermophilic Anaerobic Digestion of Vinasse in Pilot Plant UASB Reactor. *Water Science and Technology*, 25(7), 213–222. <https://doi.org/10.2166/WST.1992.0153>
- Stams, A. J. M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 1994 66:1, 66(1), 271–294. <https://doi.org/10.1007/BF00871644>
- Suominen, S., van Vliet, D. M., Sánchez-Andrea, I., van der Meer, M. T. J., Sinninghe Damsté, J. S., & Villanueva, L. (2021). Organic Matter Type Defines the Composition of Active Microbial Communities Originating From Anoxic Baltic Sea Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628301>
- Tabatabaei, M., Valijanian, E., Aghbashlo, M., Ghanavati, H., Sulaiman, A., & Wakisaka, M. (2018). *Prominent Parameters in Biogas Production Systems*. 135–161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77335-3_6
- Tobin, T., Gustafson, R., Bura, R., & Gough, H. L. (2020). Integration of wastewater treatment into process design of lignocellulosic biorefineries for improved economic viability. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13068-020-1657-7/FIGURES/6>
- Uçkun Kiran, E., Stamatelatou, K., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2016). Production of biogas via anaerobic digestion. *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition*, 259–301. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100455-5.00010-2>
- Usmani, Z., Sharma, M., Awasthi, A. K., Lukk, T., Tuohy, M. G., Gong, L., Nguyen-Tri, P., Goddard, A. D., Bill, R. M., Nayak, S. C., & Gupta, V. K. (2021). Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 148, 111258. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111258>
- Valdez-Vazquez, I., & Sanchez, A. (2018). Proposal for biorefineries based on mixed cultures for lignocellulosic biofuel production: a techno-economic analysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(1), 56–67. <https://doi.org/10.1002/BBB.1828>

- van Lier, J. B. (1995). *Thermophilic Anaerobic Wastewater Treatment; Temperature Aspects and Process Stability* [Landbouwniversiteit Wageningen]. <https://edepot.wur.nl/200091>
- van Lier, J. B., Hulsbeek, J., Stams, A. J. M., & Lettinga, G. (1993). Temperature susceptibility of thermophilic methanogenic sludge: Implications for reactor start-up and operation. *Bioresource Technology*, 43(3), 227–235. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90035-A](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90035-A)
- van Lier, J. B., Sanz Martin, J. L., & Lettinga, G. (1996). Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge. *Water Research*, 30(1), 199–207. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00107-V](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00107-V)
- Vandevivere, P., de Baere, L., & Verstraete, W. (2003). Types of anaerobic digester for solid wastes. *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*, 111–140. https://books.google.com/books/about/Biomethanization_of_the_Organic_Fraction.html?hl=es&id=BBxRYaSaapQC
- Vital-Jacome, M. A., & Buitrón, G. (2021). Thermophilic anaerobic digestion of winery effluents in a two-stage process and the effect of the feeding frequency on methane production. *Chemosphere*, 272, 129865. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129865>
- Wiegant, W. M., Claassen, J. A., & Lettinga, G. (1985). Thermophilic anaerobic digestion of high strength wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(9), 1374–1381. <https://doi.org/10.1002/BIT.260270915>
- Wilkie, A. C., Riedesel, K. J., & Owens, J. M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19(2), 63–102. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)
- Wu, Z. L., Lin, Z., Sun, Z. Y., Gou, M., Xia, Z. Y., & Tang, Y. Q. (2020). A comparative study of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of municipal sludge with high-solids content: Reactor performance and microbial community. *Bioresource Technology*, 302, 122851. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122851>
- Ximenes, E., Farinas, C. S., Kim, Y., & Ladisch, M. R. (2017). Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. En *Hydrothermal Processing in Biorefineries* (pp. 181–205). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56457-9_7
- Yamada, M., Yamauchi, M., Suzuki, T., Ohashi, A., & Harada, H. (2006). On-site treatment of high-strength alcohol distillery wastewater by a pilot-scale

thermophilic multi-staged UASB (MS-UASB) reactor. *Water Science and Technology*, 53(3), 27–35. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.073>

Zeikus, J. G., & Wolfe, R. S. (1972). *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an Anaerobic, Autotrophic, Extreme Thermophile. *Journal of Bacteriology*, 109(2), 707–715. <https://doi.org/10.1128/JB.109.2.707-713.1972>

Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W. C., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource Technology*, 248, 68–78. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.06.121>