



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

PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE BAGAZO DE AGAVE  
UTILIZANDO CULTIVOS MIXTOS

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

PRESENTA:  
ELBA LUPITA ALVARADO MICHÍ

TUTOR PRINCIPAL  
IDANIA VALDEZ VAZQUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA – UNAM

COMITÉ TUTOR  
BIBIANA CERCADO QUESADA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ELECTROQUÍMICA  
GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA – UNAM

Ciudad de México, Noviembre de 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Germán Buitrón Méndez  
Secretario: Dr. Oscar González Barceló  
Vocal: Dra. Bibiana Cercado Quezada  
1<sup>er</sup>. Suplente: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga  
2<sup>d o</sup>. Suplente: Dra. Idania Valdez Vazquez

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), UNAM – Campus Juriquilla, Querétaro.

**TUTOR DE TESIS:**

NOMBRE

-----  
**FIRMA**

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 491296/281591 para llevar a cabo los estudios de maestría.

Al “Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACyT”, a través del proyecto 247006 del Clúster Biocombustibles Gaseosos.

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

A la Ing. Cristina Araoz y Lic. Lucila Correa por ayudar a resolver los trámites administrativos durante todo este proceso.

M. en C. Gloria Moreno Rodríguez, M. en C. Jaime Pérez Trevilla, M. en B. Martín Barragán Trinidad, Dr. Julián Carillo Reyes y Dra. Karla María Muñoz Páez por su apoyo técnico y científico durante la ejecución de esta investigación.

## Dedicatoria

Para evocar a todos esos seres que no pararon de alumbrarme con su luz y su amor de muchas maneras, como cuando la luz blanca pasa a través del prisma.

Quiero empezar por a aquel ser supremo, al que solemos llamar Dios, al que me paso pidiendo y poco agradeciendo, por todo lo que me da y me quita, gracias infinitas, la maestría fue una gran enseñanza de vida en el aspecto espiritual y de conocimientos, aprendí a conocerme mejor, superar mis autolimitaciones y sorprenderme de lo que puedo ser capaz.

Por su puesto a mis padres hermosos, Cira y Adrián, las personas que más me quieren en el mundo y que no me basta la vida para mostrarles lo mucho que agradezco que siempre respalden cualquier decisión que tome en mi camino.

A dos personitas maravillosas, que el destino nos ha unido, los que conozco y me conocen mejor que a la palma de nuestras manos, mis hermanos Abel y Ady, que me apoyan incondicionalmente cuando los necesito. Mis sobrinitos también son mi felicidad, Hanit, Pamela y Yahel me hacen sentir muy contenta por compartir tiempo, espacio y lugar, yo los veo como un reflejo de mi infancia y adolescencia, les deseo mucha alegría en toda su vida.

A mis grandes amigos que son como los castillos de mi casa, que me han aportado tanto en todo momento. Qué bueno haberlos conocido y compartir con todos ustedes alegrías y también momentos tristes, difíciles o de enojo colectivo. Fabitch que desde lejitos fue una orejota atenta, que no me juzga y que me enriquece con su fortaleza, al querido Markich que hasta desde sus sueños también me procura y se preocupa por mí, que además se porta como un carnal cuando nos vemos. Mi querida Rouz que estuvo tan pendiente de mis movimientos y que quiere lo mejor para mí. Caro baby que permanece en mi mente y me trae buenos recuerdos.

Voy a continuar con la lista aunque parezca un poco larga, quisiera dejar aquí constancia de que los llevo siempre en mi corazón. Es como unos créditos de película pero al principio, que nadie se queda a ver nunca pero que sin todos ellos no hubiera sido posible lograrlo.

Va mi familia en Querétaro. A Majo tan linda con quien vivimos y sobrevivimos esta aventura, que nunca se da por vencida, que tiene el temple y el tacto, que no duda ni por un instante en ayudar a los demás cuando está en sus posibilidades. El buen amigo Felo (Felipe Ferra Gome Señor) a quien admiro por mostrarse en todo momento a la altura en la academia, con los amigos y con la vida, que lucha por dar lo mejor que tiene y es tan buena compañía. Beriii tan especial mujerón, que nunca se deja y que da cariño sincero al

por mayor. Gerardito, cómplices de fechorías, tan creativo, compartimos penas, pesares e ideas, su activismo artístico es impresionante. Martin que además de ser una persona bien inteligente y apasionada por la ciencia, es un ser lleno de alegría y buen humor, con quien me divertí mucho al platicar y que agradezco su confianza. Carito del Norte tan bella, con quien me sentí afín, y con quien nos confiamos mutuamente y abrimos nuestros corazones.

Carito del Sur, linda linda, que al llegar a la escuela me transmitía una súper sonrisa y alegría con muchos comentarios positivos todo el tiempo. Luigi beat rolando musiquita y cambiando el nombre a todas las cosas para que no se le olviden ¡que buenas risas! UAQ Team tanpreciado, gente súper dedicada como Matiu con su olor a mar de las algas, Searchii y Dieguito Go que me dieron tanto cariño en micro y en todo, Karen saludando muy contenta, despiden pura buena vibra. Me quedo con las frases de Chivis: “No aguanto lo a gusto” y Sharon: ¡Vida Solo hay una! son bien guerreras. A Review (René) que a pesar de todo no se rinde. Elianex con los rides a y desde nuestro barrio, por toda su ayuda. Karla, ejemplar investigadora con toda la disposición de ayudarme, además de que lo hacía de muy buena voluntad, nunca cambies!!! Jenny por todos los convivios juntas, tan buena onda. A la bandita del lipata Aide, Gerald, Manuel, Beto Cuevas, Rodo, Citlali, Maestra Gloria, Lore, Juan Sebastian Bach, David Carnalito, Lirio, Carni. Y por supuesto que no podía faltar “La Loma Folks”: Deus, que me pregunto ¿qué hubiera hecho sin él en la loma? carnalito que hasta en la tesis me ayudó, César el fiel adepto de la loma, Brito bien solidario, Paco, Anahix, Platitas, Davi, Havipe y Dany.

A mi queridísimo Luis Fernando, que nunca me han dejado de alegrar sus llamadas, sus pláticas, su compañía y todo su afecto. La buena Karime por incluirme en el esfuerzo para estudiar juntas matemáticas para poder entrar al posgrado. Vero Diego, que desde la primera palabra que cruzamos antes de presentar al examen nos compartimos cariño y estudio. A mis buenos amigos Raquel, Bere, Ana Goma, Darío, Anita, Dante, Jouz, Eder, Charo, Gore, Chío, Necha, Eva, Chatis, Diana, Monse, Naye.

Abrazo con mucha fuerza al Son Jarocho de Querétaro que ayudó a darle paz a mi alma, cuando me sentía ofuscada o derrotada, fue mi mejor terapia contra el estrés y la tristeza, la única contraindicación es que puedes volverte adicto: Paulina, Abraham, Diego, Saraí, Don Polo, Daniel, Juan Manuel, Nancy, Pepe, Isidrio, Chio, Son la Cosecha, y todo el Son de Tierra Adentro, qué bueno que me los encontré.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

# Índice

Índice de tablas .....	I
Índice de figuras.....	II
Resumen .....	III
Abstract.....	IV
1. Introducción .....	1
2. Objetivos y metas.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos específicos .....	2
2.3. Metas .....	2
3. Marco Teórico y Antecedentes.....	3
3.1. Residuos sólidos agrícolas .....	3
3.2. Residuos sólidos agrícolas de la industria del Tequila .....	4
3.3. Composición química del bagazo de agave .....	6
3.4. Concepto de biorefinería para obtención de biocombustibles .....	8
3.4.1. Hidrólisis de la biomasa lignocelulósica .....	10
3.4.2. Formación de inhibidores.....	16
3.4.3. Producción de biohidrógeno vía fermentación oscura.....	18
3.4.4. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica .....	21
4. Metodología .....	25
4.1. Inóculo .....	26
4.2. Ensayo de tolerancia a inhibidores .....	28
4.2.1. Medio de cultivo.....	28
4.2.2. Diseño experimental y procedimiento .....	28

4.3. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave.....	30
4.3.1. Hidrolizados de bagazo de agave .....	30
4.3.2. Producción de hidrógeno en reactores en lote .....	31
4.3.3. Producción de hidrógeno en reactor discontinuo secuencial (ASBR)...	32
4.4. Métodos analíticos .....	34
4.4.1. Caracterización del bagazo de agave .....	34
4.4.2. Volumen y composición del biogás .....	34
4.4.3. Ácidos grasos volátiles (AGV).....	35
4.4.4. Concentración de azúcares, compuestos furánicos y sus derivados ...	35
4.4.5. Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	36
4.4.5. Fenoles.....	36
4.5. Estructura de la comunidad microbiana .....	36
4.6. Análisis cinético .....	37
4.7. Análisis estadístico .....	37
5. Resultados y discusión.....	38
5.1. Ensayo de tolerancia a inhibidores durante la producción de H <sub>2</sub> .....	38
5.2. Producción de H <sub>2</sub> a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave .....	48
5.2.1. Hidrolizados ácido de bagazo de agave .....	48
5.2.2. Producción de hidrógeno en reactores en lote .....	49
5.2.3. Producción de hidrógeno en ASBR.....	54
6. Conclusiones .....	61
Anexo. Productividad derivada de la tesis.....	63
Referencias.....	64

## Índice de tablas

<b>Tabla 3.1</b>	Composición química de bagazo de agave.....	7
<b>Tabla 3.2</b>	Pretratamientos de biomasa lignocelulósica.....	13
<b>Tabla 3.3</b>	Pretratamiento del bagazo de agave.....	14
<b>Tabla 3.4</b>	Producción de H <sub>2</sub> a partir de diferentes residuos agrícolas.....	24
<b>Tabla 4.1</b>	Diseño experimental en el ensayo de tolerancia a inhibidores para la producción de hidrógeno.....	29
<b>Tabla 4.2</b>	Condiciones probadas para tratamiento ácido de bagazo de agave.	31
<b>Tabla 5.1</b>	Parámetros cinéticos y resultados experimentales en el ensayo de tolerancia.....	41
<b>Tabla 5.2</b>	Comparación de estudios de producción de hidrógeno a partir de xilosa en presencia de inhibidores.....	46
<b>Tabla 5.3</b>	Parámetros cinéticos y resultados experimentales en ensayo con hidrolizados.....	51
<b>Tabla 5.4</b>	Comparación de estudios de producción de hidrógeno en lote a partir hidrolizados de biomasa lignocelulósica.....	52
<b>Tabla 5.5</b>	Comparación de estudios de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica con ASBR.....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 3.1</b>	Distribución de residuos sólidos agrícolas en México.....	4
<b>Figura 3.2</b>	Producción de tequila y consumo de agave.....	5
<b>Figura 3.3</b>	Esquema general de biorefinería para la producción biocombustibles y solventes.....	9
<b>Figura 3.4</b>	Comparación de pretratamientos para obtención de azúcares....	15
<b>Figura 3.5</b>	Reacciones ocurridas durante la hidrólisis ácida de BL.....	16
<b>Figura 3.6</b>	Efecto de inhibidores sobre producción de H <sub>2</sub> .....	17
<b>Figura 3.7</b>	Ruta metabólica para la producción de H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> .....	21
<b>Figura 4.1</b>	Estrategia experimental.....	25
<b>Figura 4.2</b>	Estructura de la comunidad microbiana en el inóculo tratado térmicamente.....	27
<b>Figura 4.3</b>	Esquema general de la configuración del reactor.....	33
<b>Figura 5.1</b>	Cinéticas de producción de H <sub>2</sub> a partir de xilosa en presencia de furfural (F), hidroximetilfurfural (H) y sus mezclas por un cultivo mixto.....	39
<b>Figura 5.2</b>	Rendimiento máximo de hidrógeno en función de la concentración de inhibidores.....	44
<b>Figura 5.3</b>	Metabolitos producidos en ensayo de tolerancia a furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas durante la producción de hidrógeno.....	44
<b>Figura 5.4</b>	Estructura microbiana al final del ensayo de tolerancia a furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas durante la producción de H <sub>2</sub> ...	45
<b>Figura 5.5</b>	Cinética de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave.....	50
<b>Figura 5.6</b>	Metabolitos al final de la fermentación de hidrolizados.....	51
<b>Figura 5.7</b>	Productividad de H <sub>2</sub> y composición de biogás en reactor ASBR..	55
<b>Figura 5.8</b>	Metabolitos solubles en ASBR.....	57
<b>Figura 5.9</b>	Estructura de la comunidad microbiana en diferentes ciclos del ASBR.....	58

## Resumen

Este estudio presenta los resultados de producción de hidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica en presencia de compuestos inhibitorios derivados del pretratamiento termoquímico; con xilosa ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como sustrato modelo así como hidrolizados ácidos de bagazo de *Agave Tequilana* Weber. Se utilizó como inóculo lodo granular anaerobio pretratado térmicamente. Se hizo un ensayo de tolerancia al furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y sus mezclas a diferentes concentraciones. Se encontró que el furfural ejerció menor inhibición sobre la producción de hidrógeno que el HMF debido a la capacidad del inóculo para metabolizarlo en compuestos menos tóxicos. Posteriormente, se obtuvieron hidrolizados ácidos de bagazo de agave (HCl al 1.4% (p/p),  $125 \text{ }^\circ\text{C}$ , 132 min) con  $19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales. Se diluyeron al 18%, 35% y 70%, obteniendo la mayor velocidad de producción de hidrógeno,  $778 \pm 95 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , con hidrolizados al 35%. Con este porcentaje de hidrolizados, se arrancó un reactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR, por sus siglas en inglés), y se incrementó gradualmente la concentración de hidrolizados. La mayor velocidad de producción de hidrógeno fue de  $206 \pm 11 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  con hidrolizados al 35 y 48%. Se encontró que al incrementar los porcentajes de hidrolizados ácidos, las especies productoras de  $\text{H}_2$  del género *Clostridium* fueron desplazadas por especies de *Lactobacillus*.

## Abstract

This study presents the results of hydrogen production from lignocellulosic biomass in the presence of inhibiting compounds derived from thermochemical pretreatment; with xylose ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) as a model substrate and acid hydrolysates of *Agave Tequilana Weber* bagasse. Thermally pre-treated anaerobic granular sludge was used as inoculum. A tolerance test was carried out on furfural, hydroxymethylfurfural (HMF) and their mixtures at different concentrations. It was found that furfural exerted less inhibition on the production of hydrogen than HMF due to the ability of the inoculum to metabolize it into less toxic compounds. Subsequently, acid hydrolysates of agave bagasse were obtained (HCl 1.4% (w / w),  $125 \text{ }^\circ\text{C}$ , 132 min) with  $19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of total carbohydrates. It was diluted to 18%, 35% and 70%, obtaining the highest speed of hydrogen production,  $778 \pm 95 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , with hydrolysates at 35%. With this percentage of hydrolysates, an anaerobic sequential batch reactor (ASBR) was started, and the concentration of hydrolysates was gradually increased. The highest hydrogen production rate was  $206 \pm 11 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  with hydrolysates at 35 and 48%. It was found that the percentages of hydrolyzed acids increase, the  $\text{H}_2$  producing species of the genus *Clostridium* were displaced by *Lactobacillus* species.

## 1. Introducción

Existe un alto potencial de producción de residuos sólidos lignocelulósicos derivados de la actividad agrícola en el país. En particular la industria del tequila, una de las principales en México, genera residuos sólidos en su proceso, como es el bagazo de agave, que generalmente es usado como material de acolchado para producción de hongos comestibles y para alimento de ganado, entre otros.

Es conveniente dar un valor agregado a este subproducto ya que, por su composición química, tiene un alto potencial para producir biocombustibles como el hidrógeno. Sin embargo, uno de los principales retos es la hidrólisis para su posterior fermentación, ya que los carbohidratos se encuentran dentro de una matriz lignocelulósica que es difícil de separar.

Un aspecto importante a señalar es que de los tratamientos ácidos, que son los más utilizados por obtener altos rendimientos de azúcares, se derivan compuestos como el furfural e hidroximetilfurfural, que se han reportado como inhibitorios de la fermentación (Eva Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

Es por tanto importante determinar la productividad de hidrógeno y cuál es la tolerancia del inóculo utilizado para estos compuestos con el objetivo de definir las etapas que se requieren para su conversión y de esta forma se introduzcan a un proceso integral de biorefinería de segunda generación.

De esta forma, México podría convertirse en foco central de atención para la producción de biocombustibles, como un campo que aún está en época temprana de exploración (Rios y Kaltschmitt, 2013).

## **2. Objetivos y metas**

### **2.1. Objetivo general**

Determinar la productividad de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave mediante un cultivo mixto anaerobio en lote y en un reactor ASBR.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar la relación que existe entre la conversión de carbohidratos, la concentración de inhibidores (furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas) con la productividad de H<sub>2</sub> utilizando un cultivo mixto.
- Obtener hidrolizados de bagazo de agave y caracterizar su contenido de azúcares, furfural e hidroximetilfurfural.
- Producir hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave en un reactor anaerobio discontinuo secuencial.

### **2.3. Metas**

6.1 Obtener hidrolizados de bagazo de agave con una concentración de azúcares de al menos 15 g·L<sup>-1</sup>.

6.2 Realizar ensayos para determinar el efecto de compuestos inhibitorios sobre la producción de hidrógeno con un cultivo mixto.

6.3 Operar un ASBR por lo menos 2 meses con hidrolizados de bagazo de agave.

### **3. Marco Teórico y Antecedentes**

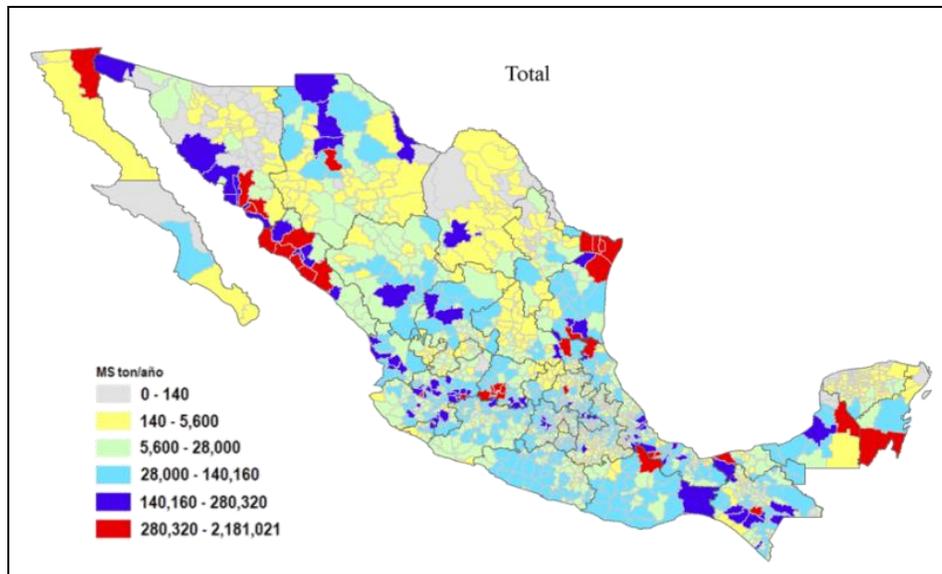
#### **3.1. Residuos sólidos agrícolas**

La actividad agrícola, sostiene la vida humana en el planeta, ésta, como otras actividades genera residuos sólidos ya que durante la cosecha y el procesamiento de alimentos, la planta no es utilizada en su totalidad, y se producen residuos que no son aprovechados o en su defecto son escasamente usados como alimento para ganado, composta, artesanías o como material de acolchado para crecimiento de plantas (Íñiguez *et al.*, 2006; Valdez-Vazquez *et al.*, 2010).

A nivel regional, América Latina y El Caribe, ocupan el 13% del total de la superficie mundial cultivada, lo que representa una ventaja si sus residuos se consideran como materia prima para la obtención de biocombustibles. México ocupa el tercer lugar en superficie cultivada en esta región, ya que en el año 2007 se produjeron alrededor de 270 millones de toneladas de productos agrícolas, de los cuales, 28% se disponen como residuos (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010).

Los residuos agrícolas pueden dividirse en dos principales categorías: los residuos primarios, que se refieren a aquellos materiales que son abandonados en el campo al momento de la cosecha como rastrojos de cereales, hojas y tallos, entre otros; y los residuos secundarios, que son aquellos generados durante el procesamiento del producto agrícola como cascarillas, olotes, bagazos, entre otros (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010).

La generación de residuos de cultivos primarios se estimó en 60.13 millones de toneladas, siendo los principales tallos de maíz, tallos de sorgo, paja de trigo, hojas y tallos de caña de azúcar. La generación de residuos de cultivos secundarios se estimó en 15.6 millones de toneladas de los cuales el bagazo de caña de azúcar, bagazo de maguey y pulpa de café son los principales contribuyentes (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010). En la Figura 3.1 se muestra el mapa de distribución del potencial de residuos sólidos agrícolas en el país.



**Figura 3.1** Distribución de residuos sólidos agrícolas en México, adaptado de Valdez-Vazquez *et al.* (2010).

De la Figura 3.1 se destaca que en los estados de Sinaloa, Baja California, Tamaulipas, Veracruz, Chihuahua y la Península de Yucatán es donde se genera una mayor cantidad de residuos sólidos de la actividad agrícola, que asciende a 2 millones de toneladas de materia seca por año.

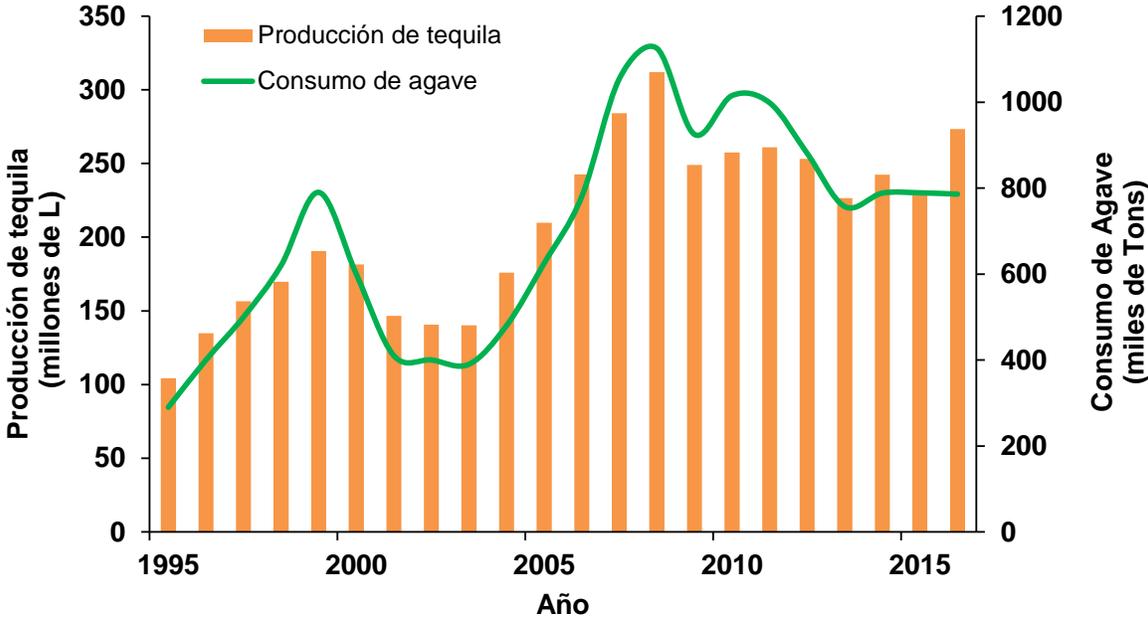
### **3.2. Residuos sólidos agrícolas de la industria del Tequila**

El género agave es endémico de América, en México se encuentran 150 de sus 200 especies y está distribuido en el 75% del territorio. El agave está ampliamente distribuido en zonas áridas y semiáridas, y es abundante en las serranías del centro del país, Sierra Madre Occidental, Altiplano Mexicano, Península de California y Sierra Madre Oriental. Este cultivo tiene una importancia histórica, cultural y económica para pueblos indígenas y mestizos que lo han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, ornato, fibras duras, abono, construcción de viviendas, elaboración de implementos agrícolas entre otros (García, 2007; Murillo-Alvarado *et al.*, 2014; Valdez-Vazquez *et al.*, 2010).

A nivel nacional, las bebidas alcohólicas se producen utilizando por lo menos 53 especies de agave, en 26 de las 32 entidades federativas, de los que se derivan el

mezcal, tequila, bacanora, pulque y sotol. Una de las industrias más importantes en México está relacionada con la producción de tequila, bebida obtenida únicamente a partir de la especie *Agave tequilana Weber* (agave azul), la mayor parte localizada en los estados de Jalisco, Guanajuato y Michoacán, actualmente están registradas 124 firmas productoras de tequila. En los últimos quince años, la industria tequilera ha crecido de manera significativa, produciendo más del doble entre 1995 y 2005 llegando a 209.7 millones de litros de tequila en el 2005, en la Figura 3.2 se muestra la producción de tequila y el consumo de *A. tequilana* hasta el año 2016 (Bowen & Zapata, 2009; Garcia, 2012; Valdez-Vazquez et al., 2010).

Como se observa en la Figura 3.2, la industria del tequila va en incremento con respecto de la década de los 90, tan solo en el año 2010 se consumieron alrededor de 990 miles de toneladas de bagazo de agave para producir 258 millones de litros de tequila, de lo cual se deriva que para producir un litro de tequila se generan en promedio 3.3 kg de bagazo de agave. Se señala también, de acuerdo al Consejo Regulador de Tequila (2017), que la producción se ha estabilizado en el último lustro.



**Figura 3.2** Producción de tequila y consumo de agave, adaptado de Consejo Regulador del Tequila (CRT, 2016).

Comercialmente, la parte importante de *A. tequilana* para la producción de tequila es el tallo, comúnmente llamado cabeza o piña. El tequila se puede producir mediante un proceso tradicional o mediante un proceso alternativo. El proceso tradicional consiste en cuatro principales pasos: cocción de cabezas de *A. tequilana*, extracción de azúcar por molienda (donde se genera el bagazo), fermentación y destilación. El proceso alternativo consiste en: extracción del jarabe de las cabezas de *A. tequilana* por molienda (donde se genera el bagazo), hidrólisis del jarabe, fermentación y destilación. El bagazo de *A. tequilana* es el principal residuo sólido generado por la industria tequilera en México, aproximadamente el 40% del total cosechado es convertido en bagazo (Arreola-Vargas *et al.*, 2015; Bowen & Zapata, 2009; Kestur *et al.*, 2013; Murillo-Alvarado *et al.*, 2014).

De lo anterior, se destaca la importancia de la composición química del bagazo de agave, con el fin de hallar las oportunidades de aprovechamiento de este material para la producción de biocombustibles dentro de un concepto de biorefinería de segunda generación.

### **3.3. Composición química del bagazo de agave**

El bagazo de agave se considera un tipo de biomasa lignocelulósica (BL). La biomasa es una de las formas de energía renovable más abundantes y versátiles en el mundo, incluye cualquier material biológico ya sea organismos vivos como madera virgen, cultivos energéticos, residuos agrícolas, residuos de comida, así como residuos y subproductos de la industria alimentaria (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010).

El agave consiste en una planta suculenta árida perenne con hojas delgadas alrededor de un tallo, se extiende radialmente y mide entre 1.2 y 1.8 m de altura, cuyos principales elementos son fibras, azúcares, minerales y agua (Kestur *et al.*, 2013; Murillo-Alvarado *et al.*, 2014).

Como se señaló anteriormente, el bagazo de agave es un subproducto en el proceso de producción de tequila, considerado como residuo, sin darle un valor

agregado; sin embargo es una fibra con importantes oportunidades de desarrollo para obtención de azúcares con el fin de producir biocombustibles, alcohol y ácidos orgánicos por vía biotecnológica, complemento lignocelulósico en la industria del papel, hemicelulosas para la industria química y alimentaria, medio de cultivo para la producción de hongos alimenticios, producción de aglomerados, carbón activado, complemento de forrajes, composta, alimento animal y paneles de construcción (Alonso & Rigal, 1997; Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001; Kestur *et al.*, 2013)

El bagazo de agave está compuesto de material fibroso heterogéneo de 10 a 12 cm de largo (llamadas haces fibrovasculares) y material orgánico no fibroso en forma de partículas finas (llamada médula) que corresponde a la corteza y envoltura fibrovascular dispersa en el interior de la planta de agave, el diámetro de dichas fibras varía entre 0.3 y 0.4 mm (Alonso & Rigal, 1997; Crespo González, 2011).

En términos de biomasa, el bagazo de agave es un compuesto lignocelulósico constituido principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosa, cuya composición depende de madurez de la planta antes de ser cosechada, clima, tipo de suelo, tipo de procesamiento industrial para extracción de jugos, entre otras. En la Tabla 3.1 se tiene la composición de *Agave tequilana* reportada en distintos estudios.

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

Especie	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Referencia
<i>Agave tequilana</i> <i>Weber</i>	66	6	17	Sanjuan y Grellman, 1987
<i>Agave tequilana</i>	43	19	15	Alonso y Rigal, 1997
<i>Agave tequilana</i> (cocido)	31	11	11	Arreola-Vargas <i>et al.</i> , 2015
<i>Agave tequilana</i> (sin cocer)	47	23	11	Arreola-Vargas <i>et al.</i> , 2015

La celulosa, hemicelulosa y lignina, están unidos por enlaces covalentes y de hidrógeno que la convierten en una estructura muy robusta y resistente a cualquier tipo de hidrólisis. Esta recalcitrancia se debe principalmente a la presencia de lignina, el grado de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización de los polisacáridos, el área de superficie disponible y el contenido de humedad, así que para favorecer la producción de biocombustibles a partir del bagazo de *A. tequilana*, es necesario llevar a cabo una hidrólisis para obtener azúcares en sus formas más simples y posteriormente fermentarlos (Arreola-Vargas *et al.*, 2015; Michelin *et al.*, 2015).

### **3.4. Concepto de biorefinería para obtención de biocombustibles**

La conversión de biomasa lignocelulósica (BL) para producir biocombustibles emulando procesos de refinación del petróleo es factible y necesario con el desarrollo de tecnología para obtener diferentes productos en serie a partir de BL, como el hidrógeno, metano, bioetanol, solventes, entre otros (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2011; Moncada *et al.*, 2015).

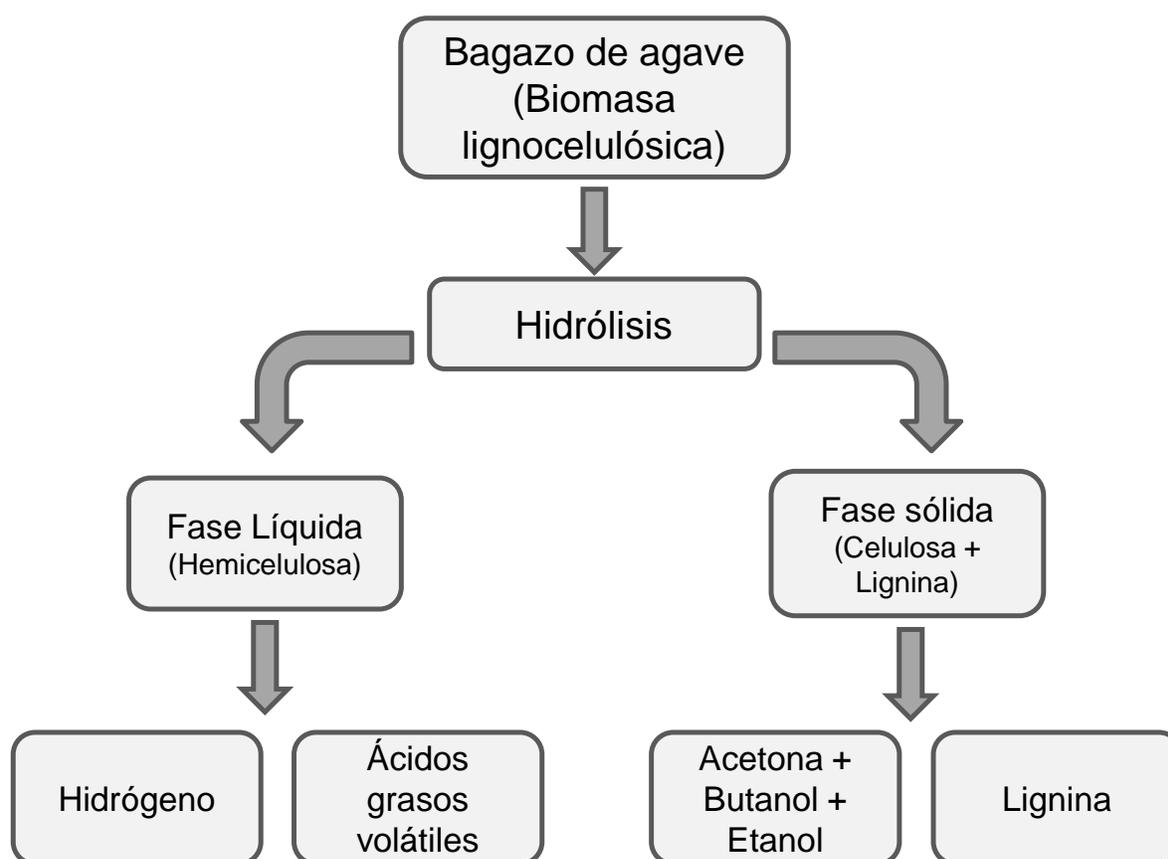
Los biocombustibles se clasifican en primera, segunda y tercera generación, los de primera generación se refieren a los que se derivan de cultivos específicamente destinados a la obtención de biomasa. Sin embargo, estos son controversiales debido a su impacto en la seguridad alimentaria y el cambio de uso de suelo que implica su cultivo (Raman *et al.*, 2014).

Los de segunda generación se obtienen a partir de residuos sólidos lignocelulósicos y cultivos no alimentarios en un esquema de producción integral para generar diversos productos de valor agregado (Demirbas, 2008).

Los de tercera generación, incluye vegetales no destinados a la alimentación de rápido crecimiento y potencial energético, para lograr esto se utilizan diversas tecnologías como la ingeniería genética. Entre estos se destaca a las microalgas, consideradas como una de las materias primas más promisorias para la producción de biocombustibles por su rápida tasa de crecimiento, alta capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, entre otras. Tienen un alto contenido de carbohidratos y lípidos

para su conversión en biodiesel, hidrógeno, butanol, gasolina, metano, etanol, aceite vegetal, entre otros (Biofuel.org.uk, 2015; Cheng *et al.*, 2011).

Entre los principales beneficios de una biorefinería de segunda generación, están por demás los beneficios económicos, ya que el costo de la materia prima es bajo por que se ocupan los residuos sólidos de la actividad agrícola, además de que se abren nuevos mercados para productos. Los beneficios sociales pueden ser el suministro de energéticos sustentables, seguridad energética así como el desarrollo económico rural (Lynd *et al.*, 2005). En la Figura 3.3 se presenta un esquema general de biorefinería a partir de bagazo de agave para la obtención de biocombustibles gaseosos y líquidos (Valdez-Vazquez *et al.*, 2015).



**Figura 3.3.** Esquema general de biorefinería para la producción biocombustibles y solventes, adaptado de Valdez-Vazquez *et al.* (2015).

Como se puede observar en la Figura 3.3, es posible obtener diversos subproductos a partir de la biomasa lignocelulósica. Este trabajo está enfocado en la conversión de hidrolizados del bagazo de agave, es decir, la fracción soluble de hemicelulosa de la BL por medio de fermentación oscura para producir hidrógeno. Una de las etapas más controversiales es la hidrólisis, ya que hay distintos métodos para obtener esta fracción, es por consiguiente señalar la importancia que tiene el pretratamiento para obtener el hidrolizado de manera eficiente.

#### **3.4.1. Hidrólisis de la biomasa lignocelulósica**

Los carbohidratos contenidos en la biomasa lignocelulósica son complejos por lo que es difícil que microorganismos degraden los polímeros de celulosa y hemicelulosa para producir azúcares. Estos compuestos complejos deben ser convertidos en azúcares simples para su fácil conversión en hidrógeno y así mejorar su rendimiento (Akobi *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2010).

El proceso de hidrólisis de la BL puede ser llevado por métodos físicos, químicos o biológicos como el explosión de vapor, tratamiento ácido (HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), tratamiento alcalino (NaOH y NH<sub>3</sub>), tratamiento con solventes orgánicos (etanol, etileno) o tratamiento biológico con hongos, bacterias o sus enzimas. Cada uno de los tratamientos mencionados tiene tanto ventajas como desventajas económicas y ambientales (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996).

En lo que respecta al pretratamiento fisicoquímico, se tiene a la auto-hidrólisis, basada en la depolimerización selectiva de hemicelulosa, que es catalizada por iones hidronio generados in situ por la auto-ionización del agua y por el ácido acético, lo que provoca la relocalización de lignina en la superficie de la BL. El pretratamiento con microondas, se fundamenta en una rápida liberación de energía y en consecuencia un rápido calentamiento del material que acelera la solubilidad de los compuestos, se ha usado para mejorar la hidrólisis enzimática de la celulosa. Otro pretratamiento fisicoquímico es la explosión de vapor, similar al anterior, a diferencia que las altas presiones son seguidas de una rápida descompresión, lo que modifica la lignocelulosa en tres polímeros: hemicelulosa

en el licor, lignina y celulosa en fracción insoluble. En el ultrasonido se genera un sustrato que es más fácil de hidrolizar por el incremento del área superficial disponible y a su vez afecta la cristalinidad (Michelin *et al.*, 2015).

En cuanto a los pretratamientos químicos, se tiene al alcalino, en el que se rompen los enlaces de lignina y glicosídicos de los polisacáridos, provocando una reducción en el grado de polimerización, incremento en la disponibilidad del área interna superficie, es decir que incrementa el número de puntos de contacto para reacciones químicas; también disminuye la cristalinidad de la celulosa, que es una estructura recalcitrante debido a que son cadenas de glucosa mediante enlaces  $\beta$ -1-4, que se encuentran unidas entre sí por fuertes enlaces de hidrógeno que forman cadenas de celulosa en microfibrillas. El pretratamiento ácido es considerado como una tecnología apropiada para la producción de bioetanol a escala industrial a partir de azúcares de hemicelulosa (Pedersen & Meyer, 2010; Ruiz *et al.*, 2011; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Otra técnica es la de solventes líquidos orgánicos para extraer lignina, ya que puede ser hidrolizada por ciertos solventes en un rango de temperatura de 100 a 250 °C. La ozonólisis es otro pretratamiento químico que incluye el uso del ozono gaseoso, oxidante poderoso y soluble en agua, para romper la lignina y hemicelulosa e incrementar la biodegradabilidad de la celulosa. El pretratamiento con líquidos iónicos a bajas temperaturas, bajas presiones de vapor, buena estabilidad térmica y diferentes combinaciones de aniones y cationes para su síntesis, pueden ser usados para residuos lignocelulósicos sin generar impactos ambientales (Cheng *et al.*, 2011; Michelin *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2013)

El tratamiento biológico implica el uso de microorganismos o enzimas. El proceso de degradación de lignina y la eficiencia de la hidrólisis enzimática puede ser afectado por el tamaño de partícula, contenido de humedad, tiempo de retención hidráulica y temperatura. Este tipo de pretratamiento ofrece ventajas como bajo consumo de energía y no requiere el uso de químicos, además a condiciones operacionales moderadas y sencillas de integración dentro de un sistema de bioproceso consolidado. Entre las desventajas se considera un tiempo de proceso

largo, amplios espacios requeridos, la necesidad de monitoreo continuo del crecimiento de microorganismos y los altos costos de las enzimas (*celulasas* y *hemicelulasas*). Por otra parte, no es necesaria la esterilización de sustratos lignocelulósicos cuando se utiliza un consorcio microbiano para el pretratamiento (Michelin *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011).

Por último se señala que un pretratamiento integrado es más eficiente, combinando técnicas físicas y microbiológicas o químicas, con lo que se logra mejorar la eficiencia de fraccionamiento, disminuir la formación de inhibidores y minimizar los tiempos de retención (Mood *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014 en Michelin *et al.*, 2015).

Los productos principales de la hidrólisis de material lignocelulósico después de su tratamiento químico, termoquímico o enzimático son hexosas (principalmente glucosa) y pentosas (principalmente xilosa) (Reginatto & Antônio, 2015).

En la Tabla 3.2 se tiene una comparación de pretratamientos para la hidrólisis con distintos tipos de BL, se observan las condiciones de temperatura, relación biomasa/líquido así como su rendimiento en cuanto a producción de azúcares y sus derivados.

**Tabla 3.2** Pretratamientos de biomasa lignocelulósica.

Pretratamiento	Sustrato	Condiciones	C6 g·L <sup>-1</sup>	C5 g·L <sup>-1</sup>	AS g·L <sup>-1</sup>	F g·L <sup>-1</sup>	HMF g·L <sup>-1</sup>	Fen g·L <sup>-1</sup>	Ac g·L <sup>-1</sup>
Hidro_ térmico	Rastrojo de maíz	Hidrotratamiento, 200°C, 10 min	3.7	8.8	12.5	1.00	0.20	-	5.3
	Viruta de maple	Hidrotratamiento, 200°C, 20 min	0.6	9.2	9.8	4.10	0	1.3	13.1
	Paja de trigo	Explosión de vapor, 220°C, 2.5 min	4.4	25	29.4	0.89	0.26	0	7.5
	Paja de trigo	Hidrotratamiento, 80 °C, 6 min, 180°C 15 min, 190 °C 3 min	2.9	12.6	15.5	0.25	0.14	0.14	0
Ácido	Residuos de yuca	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 170°C, 30 min	5.1	9.4	14.5	2.05	0	-	5.1
	Cáscara de arroz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 121°C, 180 min	1.83	8.6	10.4	0.94	0	-	1.96
	Paja de arroz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 160°C, 25 min	6.0	11.7	17.7	2.50	0.30	-	1.9
	Paja de arroz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 160°C, 5 min	4.0	14.4	18.4	0.10	0.90	-	1.3
Alcalino	Cáscara de arroz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1.6% (w/v), 25 °C, 12 h	8.0	1.12	9.1	0.08	0.03	5.23	2.2
	BCA	NaOH 5% (w/v)	2.0 %	42.4 %	7.5 %	NR	NR	NR	NR
Alcalino – biol.	BCA	NaOH 1.5 % (v/v), + <i>Cellulomonas uda</i>	15.0 %	5.0 %	1.3 %	-	-	-	-
Hongos enzimas	Tallos de maíz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> + celulasa ( <i>T. viride</i> )	77.2 %	16.3 %	48.0 %	-	-	-	-

C6: Azúcares de hexosas

F: Furfural

Ac: Acetato

C5: Azúcares de pentosas

HMF: Hidroxiimetil-furfural

BCA: Bagazo de caña de azúcar

AS: Azúcares solubles

Fen: Fenoles

NR: No reportado

Fuente: Nissilä *et al.* (2014); Zheng *et al.* (2014)

En cuanto al pretratamiento para la hidrólisis del agave, recientemente se han llevado a cabo investigaciones, donde se ha probado principalmente el pretratamiento con ácido diluido e hidrólisis enzimática, en la Tabla 3.3 se tienen las condiciones y rendimientos reportados en azúcares totales.

Como se observa, se han obtenido diferentes resultados que dependen de las condiciones y el tratamiento que se elija para la hidrólisis, el más utilizado hasta el momento es el de ácido clorhídrico diluido.

**Tabla 3.3** Pretratamiento del bagazo de agave

Tipo de bagazo	Pretratamiento	Azúcares totales (g·L <sup>-1</sup> )	Referencia
Bagazos de diferentes tequileras	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4%, BL/L 30%, 130 °C, 1.5 h.	10	Alonso y Rigal, 1997
Bagazo de agave	2%, 5% y 10% (g <sub>s</sub> /100 ml), 0 mM buffer de citratos, pH 4.8, 15 FPU <sup>b</sup> de <i>celulasa</i> y 30 CBU <sup>b</sup> <i>beta-glucosidasa</i> por 1 g de sólidos, 50 °C	15.1 <sup>a</sup> , 34 <sup>a</sup> y 47.2 <sup>a</sup>	Caspeta <i>et al.</i> , 2014
Bagazo cocido	HCl 2.7 % (w/w), BL/L 5 %, 123.6 °C, 1.3 h.	27.9	Arreola-Vargas <i>et al.</i> , 2015
Bagazo no cocido	HCl 1.2% (w/w), BL/L 5%, 123.6 °C, 2.1 h.	18.7	Arreola-Vargas <i>et al.</i> , 2015
Bagazo cocido	Enzimático, 4% (w/v), 50 mM buffer de citratos, pH 4.5, Celluclast 40 FPU/g, 45 °C, 10 h	8.9 <sup>a</sup>	Arreola-Vargas <i>et al.</i> , 2016
Bagazo cocido	HCl 2.7% (w/w), BL/L 5%, 123.6 °C, 1.3 h.	17.3	Arreola-Vargas <i>et al.</i> , 2016

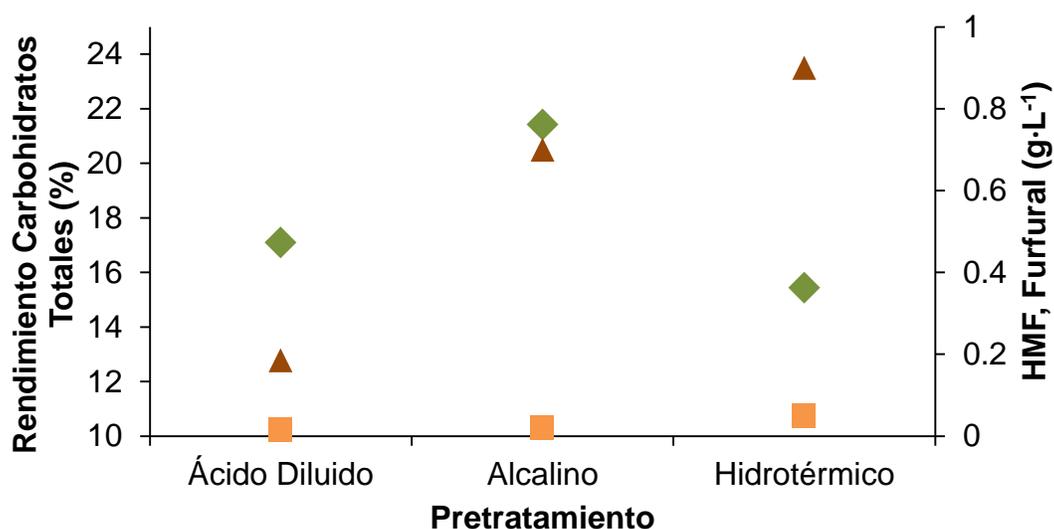
<sup>a</sup>: reportada en glucosa (g·L<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup>: FPU (Filter Paper Activity) y CBU (Cellobiase Activity) Son unidades de concentración de las enzimas celulaas y celobiasas definidas por la IUPAC.

A manera de ejemplo, en la Figura 3.4 se comparan tres de los pretratamientos que han sido más utilizados para hidrolizar el bagazo de caña de azúcar en cuanto al rendimiento de carbohidratos (recuperación de azúcares de la biomasa lignocelulósica, %) y la formación de inhibidores (furfural e hidroximetil fufural, HMF,  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Como se observa en la Figura 3.4, el ensayo de ácido diluido (Fangkum & Reungsang, 2011b) tiene un rendimiento de hasta 18 gramos de carbohidratos totales por cada gramo de bagazo en base seca, mientras que el pretratamiento alcalino (Bolado *et al.*, 2016) se observa un mayor rendimiento de azúcares y el tratamiento hidrotérmico (Sukhbaatar *et al.*, 2014) es equiparable en cuanto a contenido de azúcares con el de ácido diluido.

También se observa que el pretratamiento hidrotérmico es el que genera una mayor concentración de compuestos furánicos (furfural e hidroximetilfural) considerados como inhibitorios.



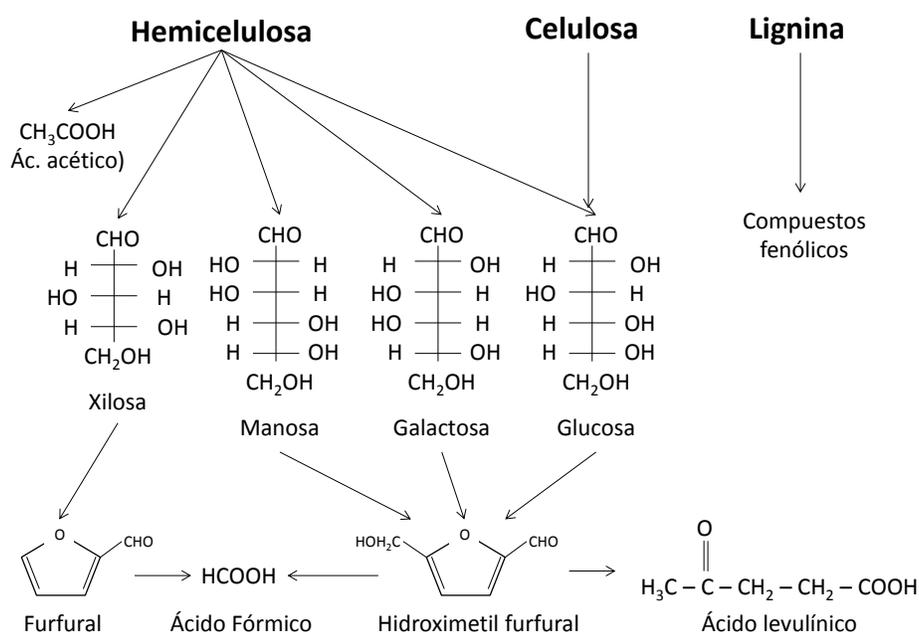
◆ Carbohidratos totales (%), ▲ Furfural ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ■ Hidroximetilfurfural ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

**Figura 3.4** Comparación de pretratamientos para obtención de azúcares, adaptado de Fangkum & Reungsang (2011b), Bolado *et al.* (2016) y Sukhbaatar *et al.* (2014).

### 3.4.2. Formación de inhibidores

Cuando la hemicelulosa es degradada, se libera xilosa, manosa, ácido acético, galactosa y glucosa; la celulosa es hidrolizada a glucosa; sin embargo, a altas temperaturas y presión, las pentosas se degradan a furfural cuando sufren una deshidratación y de manera similar, a partir de la degradación de las hexosas se forma el 5-hidroxi-metilfurfural (HMF) (Eva Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

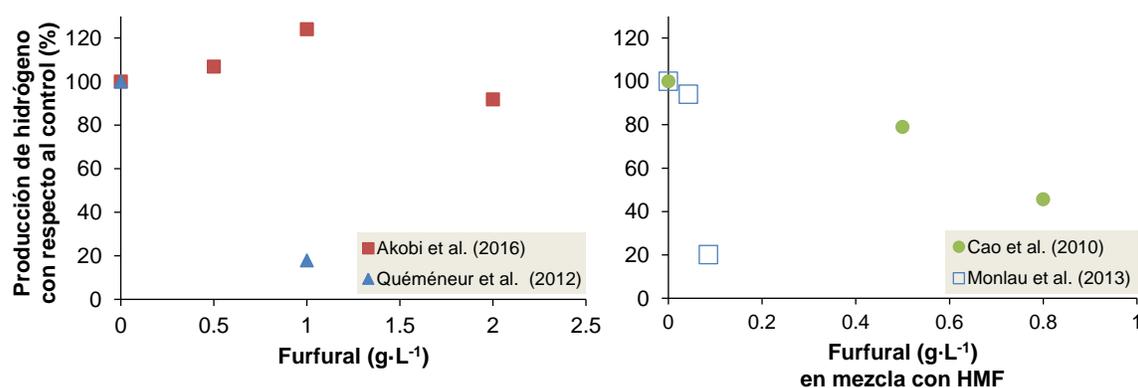
El ácido fórmico se sintetiza cuando el furfural y el HMF se rompen; mientras que el ácido levulínico se forma debido a la degradación del HMF. Por otra parte, los compuestos fenólicos se generan a partir de la ruptura parcial de la lignina, así como por la degradación de carbohidratos (Akobi *et al.*, 2016; E. Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). En la Figura 3.5 se tiene un esquema general de la formación de inhibidores en hidrolizados.



**Figura 3.5** Reacciones ocurridas durante la hidrólisis ácida de BL, adaptado de Palmqvist y Hahn (2000).

El efecto de estos compuestos en el proceso de fermentación es de interés, debido a que los compuestos furánicos, como el furfural y el HMF inhiben el crecimiento celular, inducen un daño en el ADN e inhiben a las enzimas en la fase de glicólisis. Estos compuestos dañan las células por la alteración de la permeabilidad de la membrana, provocando el escape de los compuestos intracelulares y la inactivación de sistemas enzimáticos esenciales. Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular son considerados más tóxicos para los microorganismos que los de alto peso molecular. El efecto de los inhibidores en las células es relativo a su estructura e hidrofobicidad, los microorganismos difieren en su capacidad para adaptarse al crecimiento en presencia de compuestos tóxicos y pueden usar diferentes mecanismos de adaptación para evitar o reparar daños por éstos (Monlau *et al.*, 2014).

Para evaluar el efecto de los inhibidores en la productividad de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica, se han llevado a cabo diversos estudios con mezclas sintéticas e hidrolizados reales, en los que se experimenta la tolerancia del inóculo a diferentes concentraciones de furfural y en mezcla con hidroximetilfurfural y otros componentes. En la Figura 3.6 se muestra la comparación de cuatro estudios en cuanto a la producción de H<sub>2</sub> con diferentes concentraciones de furfural e HMF.



**Figura 3.6** Efecto de inhibidores sobre producción de H<sub>2</sub>, adaptado de Cao *et al.* (2010), Quéméneur *et al.* (2012), Monlau *et al.* (2013) y Akobi *et al.* (2016).

En el primer caso, utilizaron un sustrato sintético usando xilosa como sustrato modelo y con un cultivo mixto donde imperó la *Clostridium beijerenkii* (Quéméneur *et al.*, 2012), se determinó que el furfural disminuyó un 80% la producción de H<sub>2</sub>, a partir de 1 g·L<sup>-1</sup> de furfural.

También Akobi *et al.* (2016), usaron un sustrato sintético con xilosa para probar la tolerancia del inóculo (cultivo mixto), donde se observó que las bacterias tienen un umbral, ya que a 1 g·L<sup>-1</sup> de furfural se produce más que el control, mientras que con concentraciones mayores o menores sí disminuye la producción de hidrógeno.

En lo que respecta al estudio con hidrolizados ácidos de maíz a diferentes concentraciones, donde utilizaron *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 como inóculo (Cao *et al.*, 2010), se observó una disminución hasta del 55 % con concentraciones de 0.8 g·L<sup>-1</sup> de furfural e hidroximetilfurfural.

Por último, en el estudio donde se utilizó un hidrolizado de tallos de girasol a diferentes concentraciones con un inóculo cultivo mixto como cultivo, en el que predominaban las bacterias del género *Clostridium* (Monlau *et al.*, 2013), se observó el efecto sinérgico que tienen ambos inhibidores, ya que a concentraciones menores de 0.5 g·L<sup>-1</sup> de furfural y menores de 0.1 g·L<sup>-1</sup> de HMF, el rendimiento del H<sub>2</sub> disminuyó drásticamente.

De lo anterior se destaca que la inhibición depende de la tolerancia del inóculo, además de la concentración y el tipo de inhibidor, ya que se observa un efecto diferente si se analizan separados o en mezcla, por tal motivo es importante estudiar la tolerancia del inóculo a diferentes concentraciones de los inhibidores.

### **3.4.3. Producción de biohidrógeno vía fermentación oscura**

El hidrógeno (H<sub>2</sub>) es uno de los biocombustibles más promisorios debido a que está libre de carbono y su combustión sólo produce agua, su generación con microorganismos por medio de reacciones bioquímicas ha atraído la atención a nivel mundial debido a que puede ser considerado como una fuente de energía limpia, inagotable y de bajo costo (Ren *et al.*, 2009).

Una de las principales características del hidrógeno, es que tiene un alto contenido energético (122 MJ/kg). En la actualidad, el H<sub>2</sub> es producido a partir de combustibles fósiles mediante pirólisis, transformación con plasma, en fase líquida y amoníaco (Holladay *et al.*, 2009; Nissilä *et al.*, 2014).

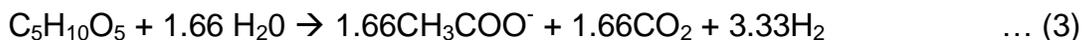
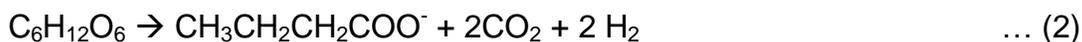
Los procesos biológicos más utilizados para su obtención son fotólisis, fotofermentación, fermentación oscura o celdas de electrólisis microbianas a partir de residuos sólidos, biomasa lignocelulósica o efluentes de plantas de tratamiento de agua (Nissilä *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2009).

#### **3.4.3.1 Ruta metabólica**

La fermentación oscura constituye una fase intermediaria del proceso de la digestión anaerobia, que involucra bacterias fermentativas productoras de H<sub>2</sub> y donde no se llega a la fase de metanogénesis. Para evitar la formación de metano, se ha propuesto utilizar cultivos puros, aunque se prefiere el uso de cultivos mixtos, debido a que son más accesibles económicamente y más fáciles de operar debido a que no es necesario trabajar bajo condiciones de esterilidad ( Monlau *et al.*, 2014).

En este proceso se tienen diferentes productos finales que dependen de las especies bacterianas, pH, presión parcial de hidrógeno, entre otras. Uno de los sustratos más estudiados es la glucosa, de su fermentación se obtiene H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, acetato y/o butirato. Teóricamente, cuando el producto final sólo es acetato se obtienen 4 moles de H<sub>2</sub> por cada mol de glucosa (ecuación 1) mientras que cuando el producto final es el butirato, se producen 2 moles de H<sub>2</sub> por cada mol de glucosa (ecuación 2) (Reginatto & Antônio, 2015).

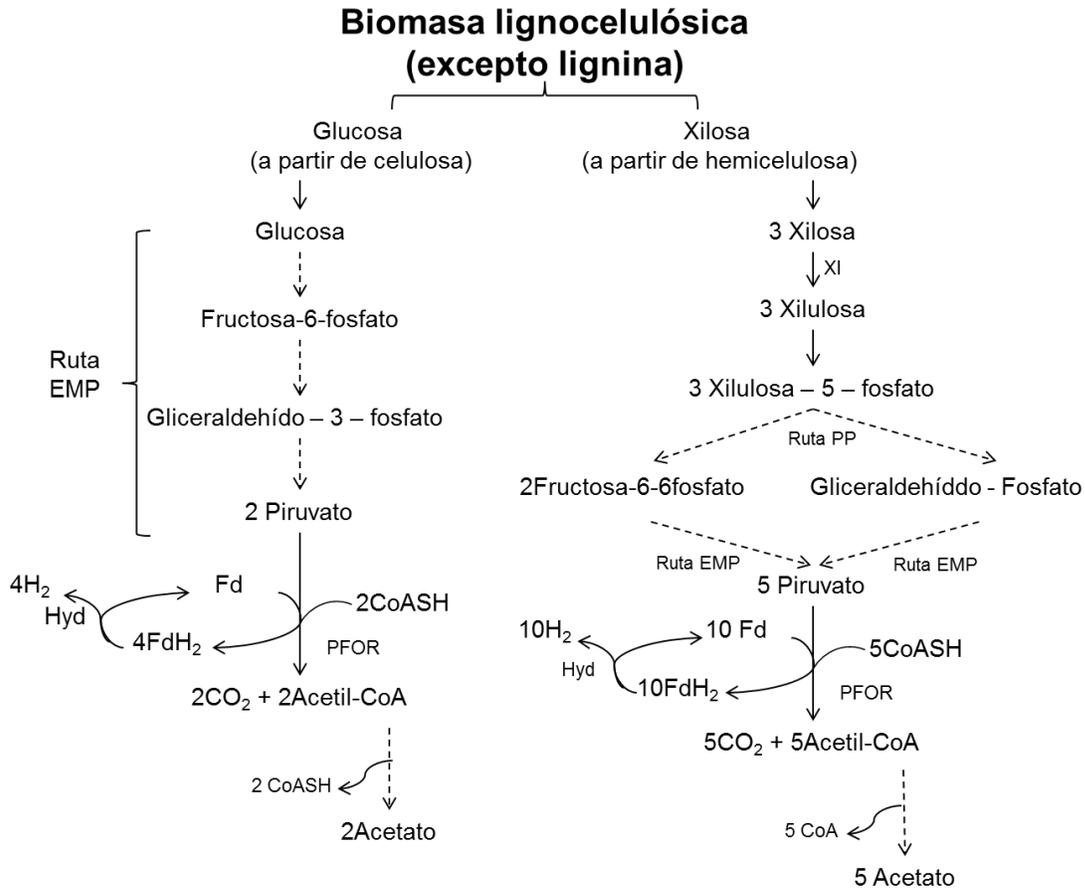
En la actualidad existen pocos estudios relacionados con la producción de H<sub>2</sub> a partir de xilosa, teóricamente por cada mol de xilosa se producen 3.33 moles de H<sub>2</sub> cuando el acetato es el producto final de la fermentación y 1.66 moles de H<sub>2</sub> por cada mol de xilosa cuando se produce butirato. En las ecuaciones 3 y 4 se tienen las ecuaciones estequiométricas (Kongjan *et al.*, 2009).



Las bacterias fermentativas forman ácidos orgánicos, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a partir de las moléculas monoméricas. En este punto, el H<sub>2</sub> y el acetato pueden ser utilizados y/o producidos por distintos grupos de microorganismos. Es así que el acetato también puede ser generado durante la acetogénesis a partir de la reducción del CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> por acetótrofos autotróficos por la ruta Wood-Ljungdhal, un proceso llamado homoacetogénesis (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

En la Figura 3.7 se tiene un esquema general de los principales pasos de la ruta metabólica y las enzimas para la producción de H<sub>2</sub> a partir de la fermentación de la glucosa y xilosa por microorganismos anaerobios. Se muestra que la enzima *xilosa isomerasa* (XI) cataliza la isomerización de xilosa a xilulosa, posteriormente es fosforilada por la enzima *xiluloquinasa* (XK) para formar la xilulosa-5-fosfato, uno de los productos intermediarios de la vía PP (pentosa fosfato). Por medio de la actividad de *epimerasas*, *isomerasas*, *transcelotasas* y *transaldoasas*, enzimas de la vía PP, la xilulosa-5-fosfato es convertida a fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. Ambos compuestos son intermediarios de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), a través de los cuales se convierten en piruvato. Las supuestas actividades de *piruvato*, *ferredoxin oxido-reductasa* (PFOR) y la *federroxina-dependiente hidrogenasa* (Hyd), producirán H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y acetato (Reginatto & Antônio, 2015).

Como se observa en la Figura 3.7, la glucosa se convierte en piruvato, a partir del cual se produce H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y acetato, cabe destacar que, como se enfatiza en las ecuaciones (4) y (6), para ambos carbohidratos, el consumo de energía reductora para generar butirato en lugar de acetato reduce el rendimiento de H<sub>2</sub>.



EMP, Embden-Meyerhof-Parnas; Fd ferredoxina oxidada; FdH<sub>2</sub>, ferredoxina reducida; Hyd, hidrogenasa; PFOR, piruvato: ferredoxin oxidoreductasa; PP, pentosas fosfato; XI xilosa isomerasa; XK, xiluloquinasa.

**Figura 3.7** Ruta metabólica para la producción de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>  
adaptado de Reginatto & Antônio (2015).

### 3.4.4. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica

Se ha demostrado que la producción de hidrógeno por procesos fermentativos es la más favorable debido a que se puede generar de forma continua y con altas tasas de producción comparado con otros procesos biológicos. Las fermentaciones se llevan a cabo a diferentes temperaturas, desde mesofílicas (25 - 40 °C), hasta termofílicas (> 50 °C), que genera biogás con H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>S y CH<sub>4</sub> (Zhao, Zhang, & Chen, 2015).

La fermentación oscura constituye una fase intermediaria del proceso de la digestión anaerobia, que involucra bacterias fermentativas productoras de H<sub>2</sub> y donde no se llega a la última fase que consiste en la metanogénesis. Para evitar la metanogénesis, se ha propuesto utilizar cultivos puros, aunque se prefiere el uso de consorcios de cultivos mixtos, debido a que son más accesibles económicamente, más fáciles de operar debido a que no es necesario operar bajo condiciones de esterilidad ( Monlau *et al.*, 2014).

Las principales bacterias productoras de H<sub>2</sub> están relacionadas con géneros estrictamente anaerobios (*Clostridia*, methylophils, bacterias ruminales, archa), facultativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) y del género aerobio (*Alcaligenes*, *Bacillus*) (Guo *et al.*, 2010).

Se han utilizado una amplia variedad de fuentes para obtener inóculo productor de hidrógeno, que incluyen lodo anaerobio de plantas de tratamiento de agua residual municipales, composta de estiércol vaca, residuos de ganado, lodos procedentes de efluente de molino de aceite de palma, suelo, composta de paja de arroz, así como lixiviados de rellenos sanitarios (Jung *et al.*, 2010b).

Bajo condiciones mesófilas se han encontrado bacterias que esporulan del género *Clostridium* en cultivos mixtos, con toda la probabilidad de existencia debido al uso de un tratamiento de choque térmico en el inóculo (Guo *et al.*, 2010).

La fermentación puede ser producida tanto en un sistema en lote, lote alimentado (estrategia limitante de sustrato para crecimiento de cultivo) o en continuo, la elección del tipo de fermentación depende de las propiedades cinéticas de los microorganismos. La inmovilización y recirculación de las células son formas de incrementar la concentración de la masa celular en la fermentación, lo que lleva a una alta productividad (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996).

En cuanto a producción de H<sub>2</sub>, teóricamente, cualquier sustrato rico en carbohidratos, lípidos y proteínas puede ser considerado para la producción de hidrógeno; sin embargo, los carbohidratos son la principal fuente de hidrógeno durante el proceso de fermentación, por lo tanto, residuos y biomasa ricos en

azúcares y/o carbohidratos complejos son consideradas materias primas adecuadas para la generación de biohidrógeno (Ntaikou *et al.*, 2010).

En este sentido, se han estudiado diferentes tipos de residuos agrícolas que incluyen bagazo de caña de azúcar, sorgo dulce, tallos y rastrojos de maíz, maíz forrajero, paja de trigo, entre otros. Debido a que los hidrolizados lignocelulósicos contienen diversos monosacáridos, se sugieren co-cultivos de por lo menos dos microorganismos debido que uno solo no puede fermentar todos los sustratos de manera óptima (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996).

En la Tabla 3.4 se tiene diferentes tipos de residuos utilizados como materia prima para la producción de hidrógeno, se han obtenido rendimientos que dependen de diversos factores, el caso de bagazo de agave, recientemente se han realizado un estudio (Arreola-Vargas *et al.*, 2015 y 2016), donde se comparan dos pretratamientos (enzimático y ácido) para la producción de hidrógeno, para demostrar el potencial de producción de hidrógeno a partir de este hidrolizado.

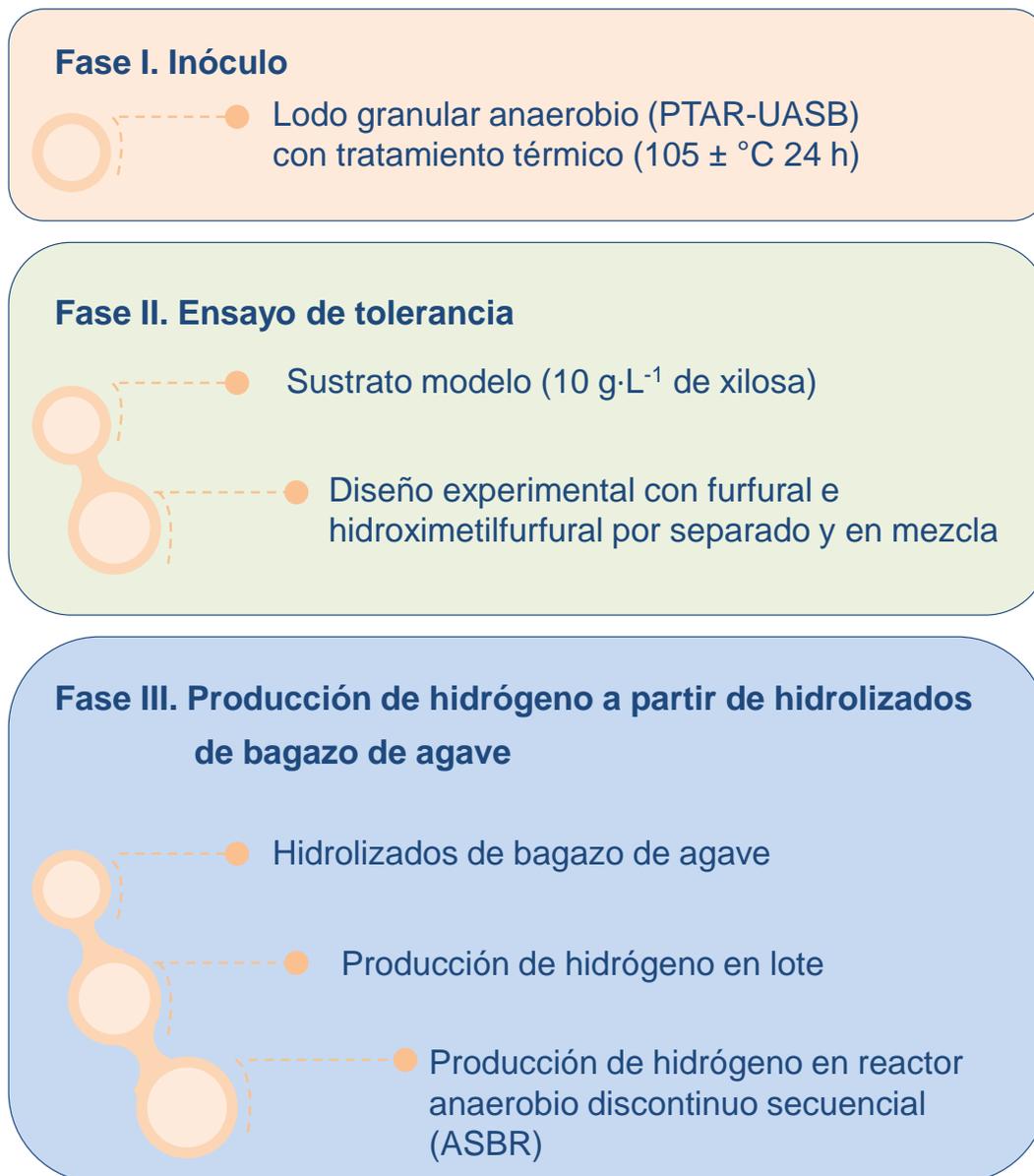
**Tabla 3.4** Producción de H<sub>2</sub> a partir de diferentes residuos agrícolas.

Sustrato	Pretratamiento	Inóculo	T (°C)	Rendimiento mmolH <sub>2</sub> ·g <sub>sus</sub> <sup>-1</sup>
Tallos de maíz	0.002% CaO, 50 °C, 96 h	Cultivo mixto de madera podrida	60	5.69
Tallos de maíz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	50	3.99
Tallos de maíz	<i>Trichoderma viride</i>	<i>T. thermosaccharolyticum</i>	50	4.06
Tallos de maíz	0.8% NaOH, 120 °C, 20 min	Lodo anaerobio	55	1.70
Tallos de maíz	Pretratamiento fúngico	Lodo anaerobio	55	2.01
Tallos de maíz	0.2% HCl, 96 °C, 30 min	Composta de heces de vaca	36	5.90
Rastrojos de maíz	1.2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , T <sup>a</sup> , 2 h y explosión de vapor, 200 °C, 1 min	Lodo seco	35	0.73
Rastrojos de maíz	Microondas, 0.3 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 45 min	Lodo anaerobio	55	0.68
Pasto	4% HCl, 96 °C, 30 min	Anaerobio	35	2.86
	0.5% NaOH, 96 °C, 30 min	Cultivo mixto	35	0.86
Paja de arroz	10% NH <sub>4</sub> , 121°C, 50 min 1.0% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 121 °C, 50 min	<i>T. neapolitana</i>	75	2.70
Bagazo caña de azúcar	0.5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 121°C, 60 min,	<i>C. butyricum</i>	37	11.41
Bagazo caña de azúcar	0.1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 121 °C, 60 min	Excremento de elefante precalentado	37	6.13
Bagazo caña de azúcar	0.1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 121 °C, 60 min	<i>T. thermosaccharolyticum</i>	55	7.5
Paja de trigo	Ozonificación	Composta de estiércol de vaca	36	3.04
Paja de trigo	Hidrotérmico, 180 °C, 15 min	Lodo anaerobio precalentado	70	9.46
Bagazo de agave	Enzimático (15 FPU <i>celulasa</i> y 20 CBU <i>beta-glucosidasa</i> )	Lodo granular anaerobio	37	3.4
Bagazo de agave	HCl 1.2%, x °C, x min	Lodo granular anaerobio	37	1.6

**Fuente:** Arreola-Vargas *et al.* (2016); Reginatto & Antônio (2015)

## 4. Metodología

La estrategia experimental para este proyecto consistió en dos fases principales: la primera, determinar la tolerancia del inóculo al furfural (F), hidroximetilfurfural (H) y sus mezclas durante la producción de hidrógeno; y la segunda, determinar la productividad de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave en un reactor discontinuo secuencial (ASBR, pos sus siglas en inglés). En la figura 4.1 se tiene un esquema general de la estrategia experimental.



**Figura 4.1** Estrategia experimental

## 4.1. Inóculo

El inóculo que se utilizó durante todo el proyecto fue un cultivo mixto no definido proveniente del lodo granular anaerobio de un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) de una planta de tratamiento de agua residual de una industria cervecera localizada en Jalisco, México. Los lodos fueron colectados en el mes de mayo de 2015 y almacenados a 4 °C hasta su uso.

El inóculo fue sometido a un tratamiento térmico a  $105 \pm 5$  °C por 24 h. Posteriormente, se minimizó el tamaño de partícula por molienda en un mortero hasta lograr un tamaño igual o inferior a 850  $\mu\text{m}$ . El contenido de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) del inóculo fue de  $0.6 \pm 0.1$  gST·g<sup>-1</sup> y  $0.4 \pm 0.1$  gSV·g<sup>-1</sup>, respectivamente.

En principio, el tratamiento térmico selecciona bacterias que esporulan como *Clostridium* y *Bacillus*, y que son bacterias productoras de H<sub>2</sub> (Nissilä *et al.*, 2014). A su vez, este tratamiento desactiva arqueas metanogénicas. Después de la aplicación del tratamiento térmico, se determinó la estructura microbiana del inóculo de acuerdo a lo reportado por Valdez-Vazquez *et al.* (2017).

La Figura 4.2 presenta la caracterización de la comunidad microbiana del inóculo a distintos niveles taxonómicos. Se identificaron en total 20 filos, que comprenden 25 clases, 49 ordenes, 72 familias, 111 géneros y 165 especie. Se destaca que tan sólo el 4.5% de las secuencias obtenidas estuvo conformado por las Clases de Clostridia y Bacilli que incluyen los géneros de *Clostridium* y *Bacillus*, respectivamente. Es decir, el método detectó bacterias que posiblemente fueron inactivadas por el tratamiento térmico.

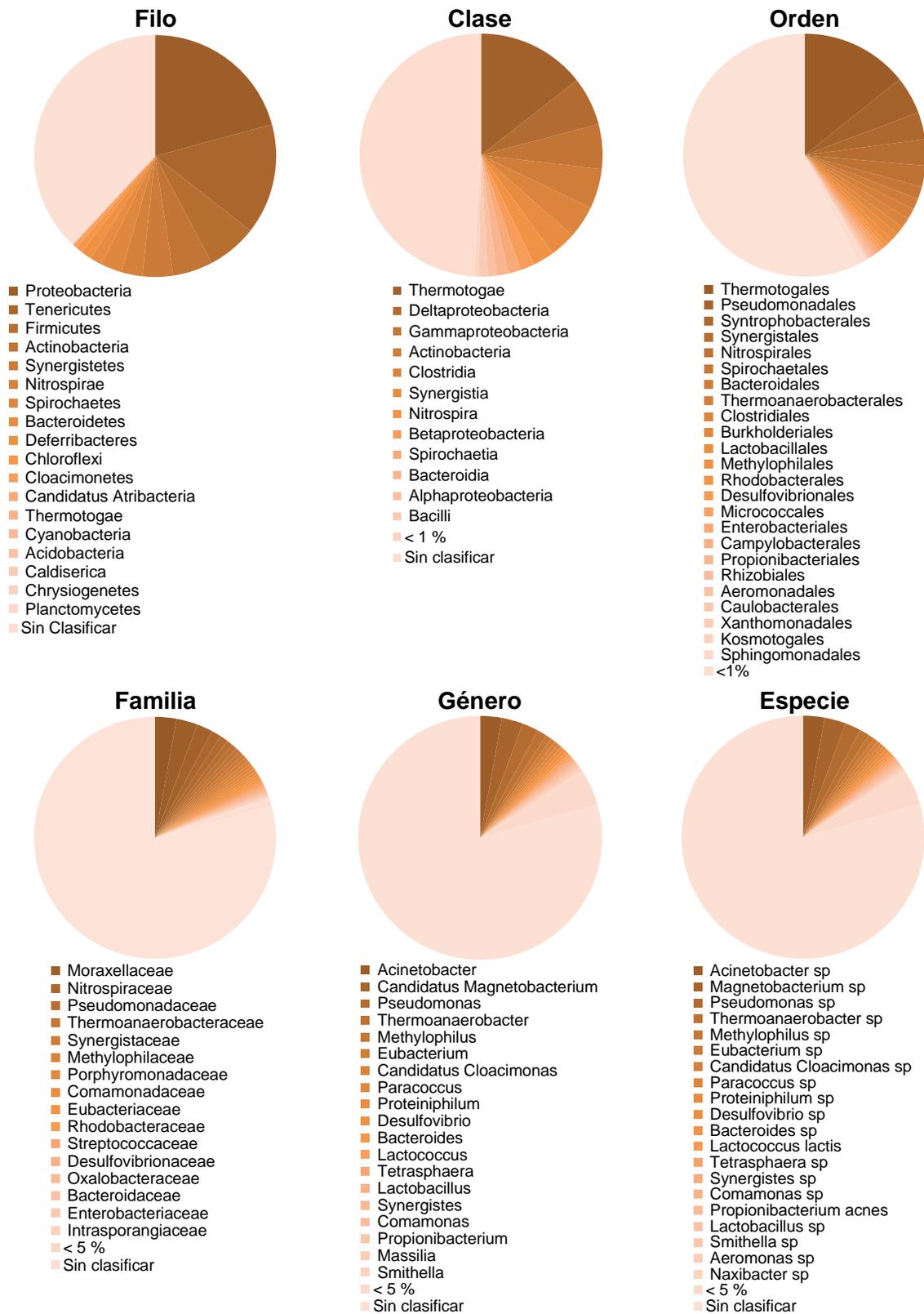


Figura 4.2 Estructura de la comunidad microbiana en el inóculo tratado térmicamente.

## **4.2. Ensayo de tolerancia a inhibidores**

Se realizó un ensayo para determinar la tolerancia del inóculo a compuestos furánicos derivados de la hidrólisis ácida de la BL, específicamente furfural (F), hidroximetilfurfural (H) y sus mezclas.

### **4.2.1. Medio de cultivo**

El medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Mizuno *et al.* (2000) con modificaciones realizadas por el Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA, por sus siglas en francés). Su composición por litro fue: 2.08 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.98 g ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES, por sus siglas en inglés), 0.10 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg KI, 0.40 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.40 mg  $\text{ZnCl}_2$ . El pH se ajustó a 7.

### **4.2.2. Diseño experimental y procedimiento**

Se definieron las concentraciones de furfural (F), hidroximetilfurfural (H) y sus mezclas de acuerdo a su concentración promedio reportada en hidrolizados ácidos de residuos agrícolas (Nissilä *et al.* 2014, Zheng *et al.* 2014), donde se encontró que existe una relación de H:F de 1:5 (ver Tabla 3.2). En base a lo anterior, se planteó un diseño de experimentos en el que se utilizó xilosa ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) como única fuente de carbono y el medio mineral señalado en el punto 4.2.1. Las concentraciones de F, H y sus mezclas (M) se variaron en tres niveles: alto (A), medio (M) y bajo (B). Se tuvieron dos controles: C1, control endógeno, y C el inóculo con medio de cultivo más xilosa pero sin la presencia de inhibidores (control positivo de la producción de hidrógeno). Cada tratamiento y controles se ensayaron por triplicado. En la Tabla 4.1, se señalan las concentraciones probadas en cada nivel.

**Tabla 4.1** Diseño experimental en el ensayo de tolerancia a inhibidores para la producción de hidrógeno.

Tratamiento	Furfural (g·L <sup>-1</sup> )	Hidroximetilfurfural (g·L <sup>-1</sup> )
FB	0.10	0.00
FM	0.50	0.00
FA	1.00	0.00
HB	0.00	0.02
HM	0.00	0.09
HA	0.00	0.19
MB	0.10	0.02
MM	0.50	0.09
MA	1.00	0.19
C1	0.00	0.00
C	0.00	0.00

Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 160 mL, donde se agregaron 100 mL de medio de cultivo sin esterilizar y 2 g del inóculo pretratado para tener una relación sustrato/inóculo de 1.12 g·gSV<sup>-1</sup>. Se mantuvo una relación espacio de cabeza:volumen de trabajo de 1:2. Las botellas serológicas se taparon y sellaron con arillos metálicos conteniendo aire en el espacio gaseoso que fue sustituido por nitrógeno gaseoso. Se incubaron a 37 °C con una agitación orbital de 150 rpm. Una hora después se purgó el gas que se expande debido al cambio de temperatura. Se midió el volumen y la composición del biogás cada 12 horas hasta que la producción de biogás no fue significativa (producción diaria menor al 1% de la producción acumulada) (Elbeshbishy *et al.*, 2012). Al término de la cinética de producción de hidrógeno se determinaron el pH, concentración final de xilosa, inhibidores, ácidos grasos volátiles, ácido 2-furoico, y furfural alcohol.

También se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la ecuación propuesta por Lin *et al.* (2015):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = 100 - \frac{\text{Rendimiento de H}_2 \text{ con xilosa e inhibidores}}{\text{Rendimiento de H}_2 \text{ con xilosa}} \times 100 \quad \dots(5)$$

Donde el rendimiento de hidrógeno se expresó en mLH<sub>2</sub>·gCarbohidratos Totales<sup>-1</sup>. El porcentaje de inhibición fue igual a cero cuando el rendimiento de hidrógeno con

inhibidores tuvo el mismo valor que sin estos; es mayor que cero cuando el rendimiento de hidrógeno con inhibidores fue menor que sin estos (el máximo porcentaje de inhibición es 100), y es menor que cero cuando el rendimiento de hidrógeno con inhibidores superó a la que no los tenía.

### **4.3. Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave**

El bagazo de agave es un subproducto derivado de la producción de tequila en México. El bagazo se obtiene después de la molienda, cocimiento y extrusión de las piñas del agave, conteniendo celulosa, hemicelulosa y lignina. Por su contenido de azúcares, el bagazo de agave tiene potencial para la producción de bioenergía (García, 2007; Valdez-Vazquez *et al.*, 2010; Rios & Kaltschmitt, 2013). El objetivo de esta fase experimental fue determinar la productividad de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave en ensayos en lote y en un reactor discontinuo secuencial (ASBR).

#### **4.3.1. Hidrolizados de bagazo de agave**

Para esta fase experimental, se obtuvo bagazo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, cultivado en Valle de Amatitán, Jalisco, México ubicado a 20° 42' 30" Latitud Norte, 103° 37' 40" Longitud Oeste, a 1260 msnm, en un tipo de suelo luvisol vértico y crómico. La composición del bagazo se determinó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad de Guadalajara teniendo 17.46% de extractivos, 52.92% de celulosa, 10.86% de hemicelulosa, 15.24% de lignina, y 3.52% de cenizas (Van Soest *et al.*, 1991).

El bagazo de agave se sometió a un pretratamiento ácido con HCl tomando como base lo reportado por Arreola *et al.* (2015). Se estudiaron dos variables independientes sobre la liberación de azúcares totales, mostradas en la Tabla 4.2. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado. Los hidrolizados se caracterizaron de acuerdo a su contenido de la demanda química de oxígeno (DQO), carbohidratos totales, azúcares reductores, furfural, hidroximetilfurfural, fenoles y ácido acético.

**Tabla 4.2** Condiciones probadas para pretratamiento ácido de bagazo de agave.

Factor	Condición 1	Condición 2
Temperatura (°C)	124 ± 0.5	124 ± 0.5
HCl (% p/p)	2.7	1.4
Tiempo de reacción (h)	1.3	2.1

Antes de llevar a cabo los ensayos de producción de hidrógeno, los hidrolizados se neutralizaron con NaOH 10N. Debido a la formación de precipitados después de la neutralización, los hidrolizados se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min para recuperar la fase líquida.

#### **4.3.2. Producción de hidrógeno en reactores en lote**

##### *4.3.2.1 Diseño de experimental y procedimiento*

Los tratamientos probados consistieron en diferentes concentraciones de hidrolizados de bagazo de agave a 18, 35 y 70% (v/v) que corresponden a 3, 6 y 12 g·L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales, respectivamente. Los ensayos con hidrolizados se realizaron sin la adición de nutrientes. Se tuvieron dos controles: C1, control endógeno, y C2 el inóculo con medio de cultivo más xilosa (control positivo de la producción de hidrógeno). Cada tratamiento y controles se ensayaron por triplicado.

Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 160 mL con un volumen de trabajo de 100 mL. Cada botella fue inoculada con 2 g de inóculo pretratado para tener una relación sustrato/inóculo de 1.12 g·gSV<sup>-1</sup>. Se mantuvo una relación espacio de cabeza:volumen de trabajo de 1:2. Las botellas serológicas se taparon y sellaron con arillos metálicos conteniendo aire en el espacio gaseoso que fue sustituido por nitrógeno gaseoso. Se incubaron a 37 °C con una agitación orbital de 150 rpm. Una hora después se purgó el gas que se expande debido al cambio de temperatura. Se midió el volumen y la composición del biogás cada 12 horas hasta que la producción de biogás no fue significativa (producción diaria menor al 1% de la producción acumulada) (Elbeshbishy *et al.*, 2012). Al término de la

cinética de producción de hidrógeno se determinaron el pH, concentración final de xilosa, inhibidores, ácidos grasos volátiles, ácido 2-furoico, y furfural alcohol.

#### 4.3.3. Producción de hidrógeno en reactor discontinuo secuencial (ASBR)

Se utilizó un reactor con un volumen total de 2 L con un volumen de trabajo de 1.5 L para conservar la relación de volumen de trabajo de 1:2. El reactor tuvo dos baffles en las paredes para asegurar una agitación homogénea. El reactor se equipó con un electrodo combinado BNC de marca Sensorex® para medir el pH, un controlador de pH 140 series marca EUTECH Instruments®, conectado a una bomba Master Flex® de 1100 rpm que alimentaba NaOH 1N para mantener el pH en 5.5. Se contó con tres puertos para la alimentación, salida del efluente y salida del biogás. Las bombas de alimentación y de salida fueron de la marca Master Flex®. La agitación se llevó a cabo con un agitador magnético de 4 cm de longitud en una parrilla de la marca Cole Palmer®. Estos tres últimos dispositivos mencionados fueron controlados con una plataforma del software Lab View, con una tarjeta de adquisición de datos National Instruments® en el que se fijaron los tiempos de reacción, sedimentación, vaciado y llenado, que se calcularon con las siguientes ecuaciones.

$$CO = \frac{S \times Q}{V_T} = \frac{S}{TRH} \quad \dots(6)$$

$$Q = V_{LL} \times N_C \quad \dots(7)$$

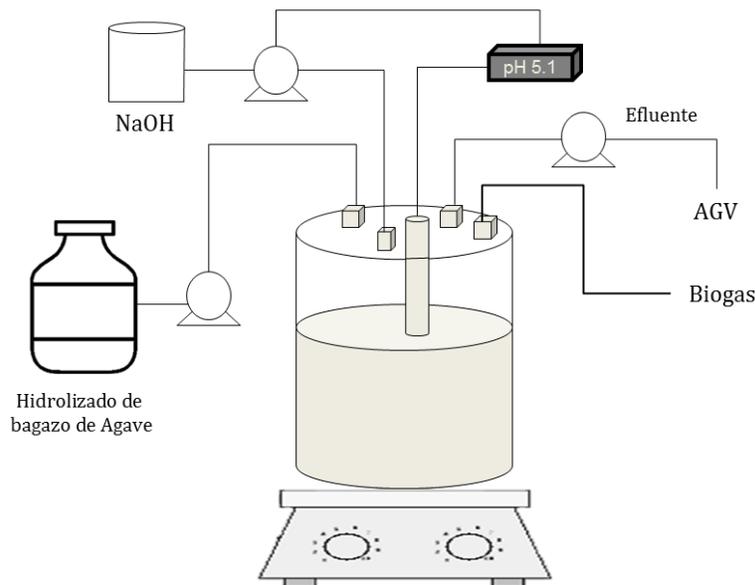
$$TRH = \frac{V_T}{Q} \quad \dots(8)$$

$$TRH = \frac{t_C \times V_T}{24 \times V_{LL}} \quad \dots(9)$$

Donde:

CO	= Carga orgánica [g·L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	S	= Concentración del sustrato, [g·L <sup>-1</sup> ]
V <sub>T</sub>	= Volumen total, [L]	Q	= Caudal [L·h <sup>-1</sup> ]
V <sub>LL</sub>	= Volumen de llenado [L]	N <sub>C</sub>	= Número de ciclos
T <sub>C</sub>	= Tiempo de cada ciclo o reacción [h]	24	= factor de conversión a días

En la Figura 4.3 se muestra el esquema general del reactor discontinuo secuencial.



**Figura 4.3** Esquema general de la configuración del reactor discontinuo secuencial.

#### 4.3.3.1 Arranque de reactor ASBR

El reactor fue inoculado con 30 g de lodo granular anaerobio tratado térmicamente para conservar una relación sustrato/inóculo de  $1.12 \text{ g}\cdot\text{gSV}^{-1}$ . De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo en lote, se arrancó el reactor con la dilución de hidrolizados con la cual se obtuvo la mayor productividad de  $\text{H}_2$ . Se dejó reaccionar en modo lote para activar el inóculo, encontrando que la producción de hidrógeno alcanzó la asíntota en 48 h.

#### 4.3.3.2 Operación del reactor ASBR

El modo de operación se realizó bajo la siguiente estrategia: tiempo de llenado de 6 min, tiempo de reacción de 24 h, tiempo de sedimentación de 60 min, tiempo de llenado de 8 min con una tasa de recambio de 50% (v/v). La temperatura se mantuvo controlada a  $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  con un serpentín alrededor del reactor conectado a un recirculador de agua. Se incrementó la carga orgánica de los hidrolizados de bagazo de agave de forma gradual una vez que se alcanzaron las condiciones de

estabilidad en términos de productividad de hidrógeno (coeficiente de variación menor al 10% del valor promedio).

#### **4.4. Métodos analíticos**

##### **4.4.1. Caracterización del bagazo de agave**

El bagazo de agave se caracterizó en cuanto a su contenido de humedad y cenizas (NREL, 2008).

##### **4.4.2. Volumen y composición del biogás**

El volumen de biogás se midió con la técnica de probeta invertida en una solución líquida ajustada a un pH igual o inferior a 2 para evitar la disolución del CO<sub>2</sub>. En esta técnica, se coloca una manguera en el fondo de una probeta de volumen adecuado y la probeta se invierte dentro del líquido. En el otro extremo de la manguera, se colocan dos llaves de tres vías, una jeringa y una aguja para succionar el aire que queda en el interior de la probeta y para la toma de muestra en la botella.

La composición del biogás se determinó en un cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas de acero inoxidable empacadas con sílica gel (1.83 m x 0.32 cm y columna de tamiz molecular 13x de 1.82 m x 3.175 mm). La temperatura de la columna fue de 40 °C por cuatro minutos, y una rampa de 20 °C cada minuto hasta alcanzar 110 °C. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 90 y 150 °C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 20 mL/min. Con este equipo se determina la presencia de hidrógeno, oxígeno, metano y dióxido de carbono.

El volumen de biogás fue normalizado a condiciones estándar de 273 °K y 1 atm de presión atmosférica.

#### **4.4.3. Ácidos grasos volátiles (AGV)**

La producción anaerobia de hidrógeno se acompaña por la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), como ácido acético, propiónico, ácido butírico, así como solventes incluyendo etanol. Los AGV se determinaron tomando 1 mL de muestra filtrada con nitrocelulosa con un tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$  y acidificada con HCl 0.02N para su conservación. La muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama (FID) marca Agilent Tech 6890N VARIAN 330 C, equipado con una columna capilar de sílice Zebram ZB-FFPA de 0.53 mm de diámetro, 15 metros de largo y 1  $\mu\text{m}$  de espesor de película. La temperatura inicial del horno se fijó a 55°C por tres minutos, y posteriormente se utilizó una rampa a 45°C/minuto hasta llegar a 135°C. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 190°C y 210°C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 9.5 mL/min.

#### **4.4.4. Concentración de azúcares, compuestos furánicos y sus derivados**

La concentración de azúcares, furfural, hidroximetilfurfural y ácido furóico se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en un equipo AGILLENT 1260 equipado con un detector de red de diodos (DAD) y de índice de refracción (RID) y acoplado una columna AMINEX HPX-87H. La fase eluente fue una solución 0.005 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a un flujo de 0.6 mL/min. La temperatura de las columnas fue de 50 °C con un tiempo de corrida de 55 minutos por cada muestra. El orden de los analitos observados fueron el ácido furoico, hidroximetilfurfural y furfural a 28.9, 32.0 y 40.8 min en el DAD. Mientras que la glucosa y xilosa se detectaron a 8.1 y 8.9 min en el RID.

También se determinaron los carbohidratos totales por el método fenol-ácido sulfúrico con una curva de calibración de glucosa con el método de Dubois *et al.*, 1956. Los azúcares reductores se determinaron con el método de Miller, 1959.

#### **4.4.5. Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

La DQO está definida como la cantidad de oxidantes específicos que reaccionan con la muestra bajo condiciones controladas. La cantidad de oxidante consumido es expresada en términos de equivalentes de oxígeno. El ion dicromato de potasio ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), al oxidar la materia orgánica cambia de cromo en estado hexavalente (VI) al estado trivalente (III). Estas especies adquieren un color y se absorben en la región visible del espectro, así que se leen a 600 nm en el espectrofotómetro para su determinación. Se digieren 200 mL de la muestra durante dos horas a una dilución conveniente en los tubos HACH®, que están preparados para muestras que contengan entre 1 y 15000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de DQO (APHA/AWWA/WEF, 2012).

#### **4.4.5. Fenoles**

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

#### **4.5. Estructura de la comunidad microbiana**

En el ensayo de tolerancia a los inhibidores, se tomó una muestra homogénea de 1 mL al inicio y al final del periodo de incubación en cada tratamiento y control. Para el reactor ASBR, se tomó una muestra de 1 mL del seno del líquido antes del vaciado cuando se observaron las condiciones de estabilidad en términos de productividad de hidrógeno. La muestra se congeló hasta su procesamiento. Para la extracción de los ácidos nucleicos totales se utilizó el kit comercial PoweLyzer® Power Soil® (MoBio Laboratories Inc, CA, USA) de acuerdo a la recomendaciones del fabricante. El contenido de ácidos nucleicos se cuantificó en un NanoDrop y se ajustó a 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Las muestras se enviaron a secuenciar con la plataforma Illumina utilizando los cebadores 28F (5'-GAGTTTGATCNTGGCTCAG-3', Handl *et al.*, 2011) y 388R (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', Francés *et al.*, 2004) para obtener amplicones de 250 pb de la región V4 del gen 16S ribosomal para eubacterias. El análisis y procesamiento de las secuencias se realizó de acuerdo con Valdez-Vazquez *et al.* (2017). Cada muestra se analizó por duplicado.

#### 4.6. Análisis cinético

La producción de hidrógeno acumulada en los ensayos en lote se ajustó al modelo modificado de Gompertz utilizando la ecuación 10.

$$H(t) = Hmax \times \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{2.71828Rmax}{Hmax} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \dots (10)$$

Donde:

H(t) = Cantidad total de hidrógeno producido por el cultivo en determinado tiempo (d) [mL]

Hmax = es la cantidad máxima acumulada de hidrógeno [mL]

Rmax = es la tasa máxima de producción de hidrógeno [mL·d<sup>-1</sup>]

$\lambda$  = es el tiempo de fase lag [h]

#### 4.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos en lote (ensayo de tolerancia y diferentes porcentajes de hidrolizado de bagazo de agave) se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de confianza del 95 %. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de diferencias significativas de Tuckey, con el fin de determinar entre pares si existe una diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

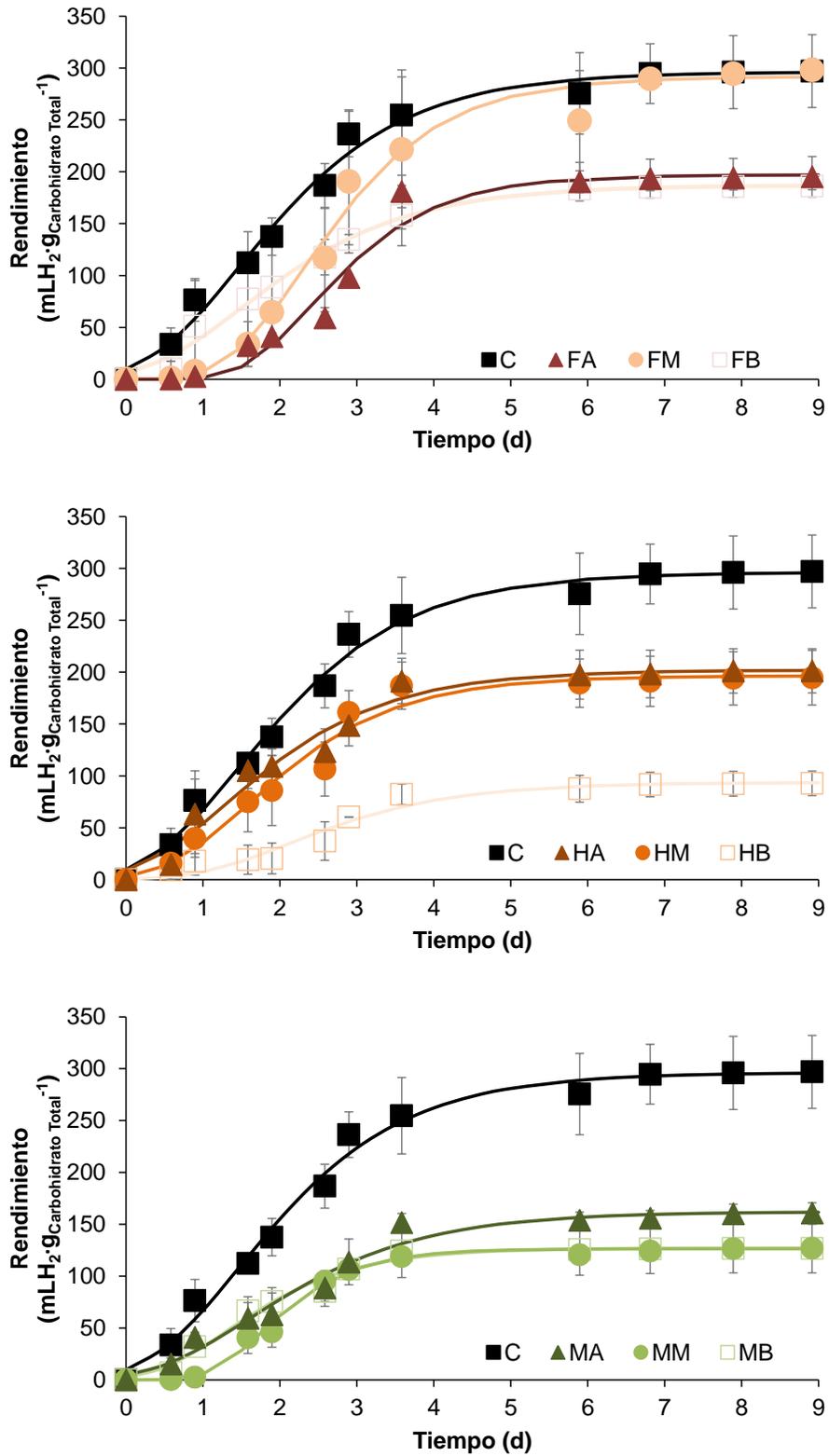
## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Ensayo de tolerancia a inhibidores durante la producción de H<sub>2</sub>

De acuerdo a la literatura, los compuestos furánicos inhiben fuertemente la producción de hidrógeno en comparación con los ácidos débiles o compuestos fenólicos (Haroun *et al.*, 2016). El efecto inhibitorio del furfural (F) e hidroximetilfurfural (H) dependen de su estructura, hidrofobicidad, concentración, relación sustrato/inóculo así como de la capacidad de adaptación de cada microorganismo (Akobi *et al.*, 2016; Haroun *et al.*, 2016). Aparentemente, la presencia de más de dos compuestos furánicos tiene un *efecto inhibitorio sinérgico* sobre la fermentación de hidrógeno (Monlau *et al.*, 2013), aunque esto no se ha demostrado. Se sabe que la toxicidad de un compuesto puede disminuir o aumentar por la exposición simultánea a un segundo agente (Chen *et al.*, 2008; Zeb *et al.*, 2014). Por tanto, el objetivo de esta fase de la investigación fue determinar la relación que existe entre la concentración del furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas con la productividad de H<sub>2</sub>.

La Figura 5.1 muestra las cinéticas de rendimiento de hidrógeno a partir de xilosa en ausencia y presencia de distintas concentraciones de furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas. Mientras que en la Tabla 5.1, se presentan los parámetros cinéticos experimentales y aquellos calculados con el modelo modificado de Gompertz. Los resultados se ajustaron correctamente al modelo ya que presentaron correlaciones mayores al 96% para todos los tratamientos.

El rendimiento máximo de hidrógeno en ausencia de estos compuestos fue de  $300 \pm 23 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$  con una velocidad máxima de  $120 \pm 1 \text{ mL H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$  y un rendimiento molar de  $1.98 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$ , que representa tan sólo el 50% del rendimiento teórico por la vía acetato (ver ecuación 3). Este control sirvió para determinar el efecto de los compuestos furánicos sobre la producción de hidrógeno, con el cálculo de porcentaje de inhibición (ecuación 5).



**Figura 5.1.** Cinéticas de rendimiento de H<sub>2</sub> (mL · g<sub>Carb.Total</sub><sup>-1</sup>) a partir de xilosa en presencia de furfural (F), hidroximetilfurfural (H) y sus mezclas por un cultivo mixto.

En los tratamientos con furfural, la fase lag<sup>1</sup> se caracterizó por un atraso conforme se incrementó la concentración del furfural, de 11 h en el control a 37 h a la mayor concentración de furfural ( $p < 0.05$ ). Para las velocidades de producción de hidrógeno (calculadas con el modelo modificado de Gompertz,  $R_{max}$ ), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ( $p > 0.05$ ). En cuanto al porcentaje de inhibición de la producción de hidrógeno, éste fue mayor a las concentraciones más baja y más alta de furfural con un valor promedio de 35%. Es importante resaltar, que a la concentración media de furfural ( $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), el porcentaje de inhibición fue de -1 % ( $p < 0.05$ ), es decir, produjo más que el control.

En los tratamientos con hidroximetilfurfural, la tendencia de la fase lag tuvo un comportamiento opuesto al observado con furfural. A la concentración más baja de hidroximetilfurfural, el periodo de adaptación del inóculo se incrementó de 11 h a 55 h con respecto al control. Contrario a esto, a las concentraciones media y alta de hidroximetilfurfural, se observaron periodos de adaptación cercanos o incluso más cortos que el control (Tabla 5.1). En cuanto a  $R_{max}$ , nuevamente no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y el control ( $p > 0.05$ ). El mayor porcentaje de inhibición se observó a la menor concentración de hidroximetilfurfural con 69 %, valor más alto que los observados para furfural ( $p < 0.05$ ). En lo que respecta a las concentraciones media y alta de hidroximetilfurfural, el porcentaje de inhibición disminuyó a un valor promedio de 31 % ( $p > 0.05$ ).

---

<sup>1</sup> periodo de adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales (Vargas, Millán-chiu, Arvizu-medrano, Loske, & Rodríguez, 2017)

**Tabla 5.1** Parámetros cinéticos y resultados experimentales en el ensayo de tolerancia.

Tratamiento	Parámetros a partir de datos experimentales							Parámetros de Gompertz			
	Rendimiento	Productividad	Rendimiento	pH	PI*	Degradación		Hmax	R <sub>max</sub>	λ	R <sup>2</sup>
	(mL·g <sub>CT</sub> <sup>-1</sup> )	(mL·(d·g <sub>CT</sub> ) <sup>-1</sup> )	(mol <sub>H<sub>2</sub></sub> ·mol <sub>CT</sub> <sup>-1</sup> )	final	(%)	F	H	(mL·g <sub>CT</sub> <sup>-1</sup> )	(mL·(d·g <sub>CT</sub> ) <sup>-1</sup> )	(h)	
FB	187 ± 3	70 ± 48	1.25	4.9 ± 0.6	37 ± 1	100	-	185 ± 0	79 ± 24	24 ± 12	0.963
FM	301 ± 13	75 ± 10	1.95	4.5 ± 0.1	-1 ± 4	100	-	301 ± 14	59 ± 6	31 ± 5	0.989
FA	199 ± 24	125 ± 26	1.32	4.6 ± 0.2	33 ± 8	98	-	197 ± 20	83 ± 19	37 ± 7	0.981
HB	93 ± 11	76 ± 56	0.63	4.6 ± 0.2	69 ± 4	-	0	93 ± 11	17 ± 7	29 ± 39	0.987
HM	198 ± 26	27 ± 14	1.32	4.6 ± 0.1	33 ± 9	-	65	197 ± 26	72 ± 13	14 ± 8	0.977
HA	203 ± 21	209 ± 32	1.43	4.7 ± 0.1	32 ± 7	-	83	200 ± 21	103 ± 11	3 ± 1	0.968
MB	127 ± 23	106 ± 24	0.97	4.6 ± 0.1	57 ± 8	89	46	127 ± 25	58 ± 15	11 ± 2	0.985
MM	188 ± 49	121 ± 33	0.86	4.8 ± 0.1	37 ± 16	100	2	187 ± 50	53 ± 13	4 ± 5	0.976
MA	163 ± 8	105 ± 18	1.09	4.7 ± 0.1	45 ± 3	100	50	162 ± 10	50 ± 5	10 ± 8	0.972
Control	297 ± 23	151 ± 26	1.98	4.8 ± 0	-	-	-	300 ± 23	120 ± 1	11 ± 3	0.982

\*PI = Porcentaje de inhibición

\*CT = Carbohidrato total

En el caso de las mezclas, la fase de adaptación no sufrió cambios respecto al control ( $p > 0.5$ ). La  $R_{max}$  también fue similar a la observada en el control ( $p > 0.05$ ). Cuando se probaron las mezclas de furfural e hidroximetilfurfural, se podían esperar diferentes respuestas de inhibición: a) un efecto antagonista, donde la inhibición de un compuesto es menor cuando está en presencia de otra sustancia; b) un efecto inhibitorio aditivo, donde la inhibición de la mezcla es igual a la suma de los efectos inhibitorios individuales; c) un efecto inhibitorio sinérgico, donde la inhibición es mayor que la esperada por la suma de los efectos individuales (Chen *et al.*, 2008; Zeb *et al.*, 2014).

En la mezcla con la concentración más baja de ambos compuestos, se esperaba un porcentaje de inhibición del 100% si la respuesta de inhibición fuera aditiva. Sin embargo, se observó que el porcentaje de inhibición fue de 57%, lo cual indica un posible efecto de inhibición antagónico. Con la mezcla de concentración media, se obtuvo un porcentaje de inhibición del 37% que corresponde a un efecto de inhibición aditivo dado sólo por la contribución inhibitoria del hidroximetilfurfural. Con la mezcla de concentración alta, se esperaba un porcentaje de inhibición del 60% si la respuesta de inhibición fuera aditiva. Sin embargo, se observó un porcentaje de inhibición de 45% lo que apunta nuevamente un efecto inhibitorio antagonista.

Por otra parte, en la Tabla 5.1 se tienen los rendimientos molares ( $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$ ) de los tratamientos con furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas donde se observó que tuvieron la misma tendencia que para el porcentaje de inhibición.

En las tres mezclas de furfural e hidroximetilfurfural, se observó el mismo fenómeno de una menor inhibición a la esperada que pudiera deberse a la presencia del ácido furóico, metabolito derivado de la biodegradación del furfural (Akobi *et al.*, 2016; Haroun *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2015). Su presencia incrementa la producción de hidrógeno, porque lo utiliza como una fuente adicional de carbono, como lo mostrado en el estudio de Yeo (2016), en donde se observó una mayor producción de hidrógeno con ácido furóico que con el control. También

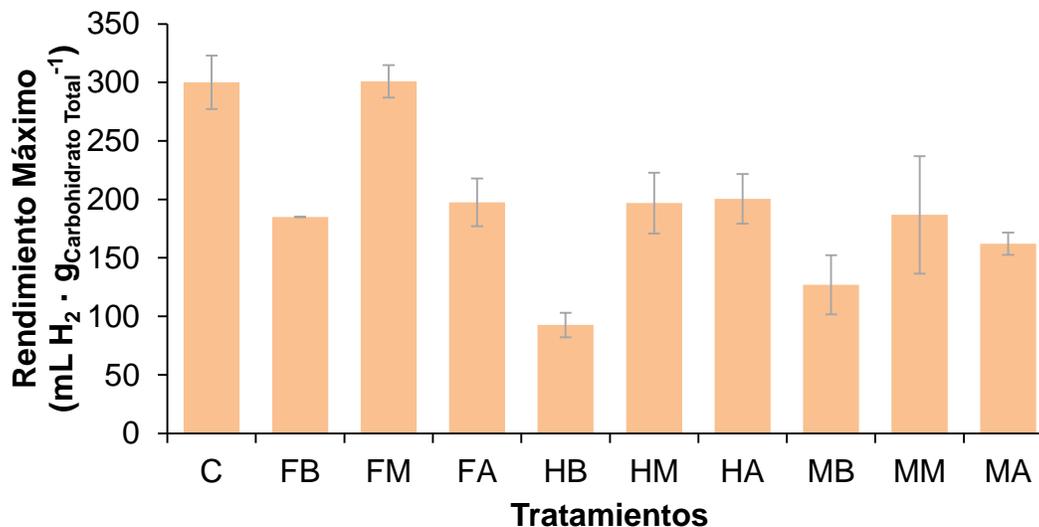
Haroun *et al.* (2016) destaca que el furfural a bajas concentraciones estimula la producción de hidrógeno.

Debido a que en el presente estudio el furfural fue consumido en su totalidad en los tratamientos probados (Tabla 5.1), se determinó la presencia de ácido furóico al final de las fermentaciones. Con esto se dedujo que los microorganismos degradaron el furfural a ácido furóico, el cual fue utilizado como una fuente adicional de carbono para producir hidrógeno, enmascarando el efecto inhibitorio del hidroximetilfurfural, en el caso de las mezclas.

Por otra parte, se tienen estudios donde se señala que bacterias sulfato-reductoras como *Desulfovibrio sp.* o *D. furfuralis* producen de 1 a 2 moles de acetato por cada mol de furfural con la producción de etanol o hidrógeno, (Boopathy & Daniels, 1991; Haroun *et al.*, 2016). Sin embargo, se debe prestar atención a las condiciones de inhibición particulares del furfural ya que de acuerdo con Yeo (2016) y Akobi *et al.* (2016), existe un umbral de inhibición, porque en concentraciones medias se produce más que el control.

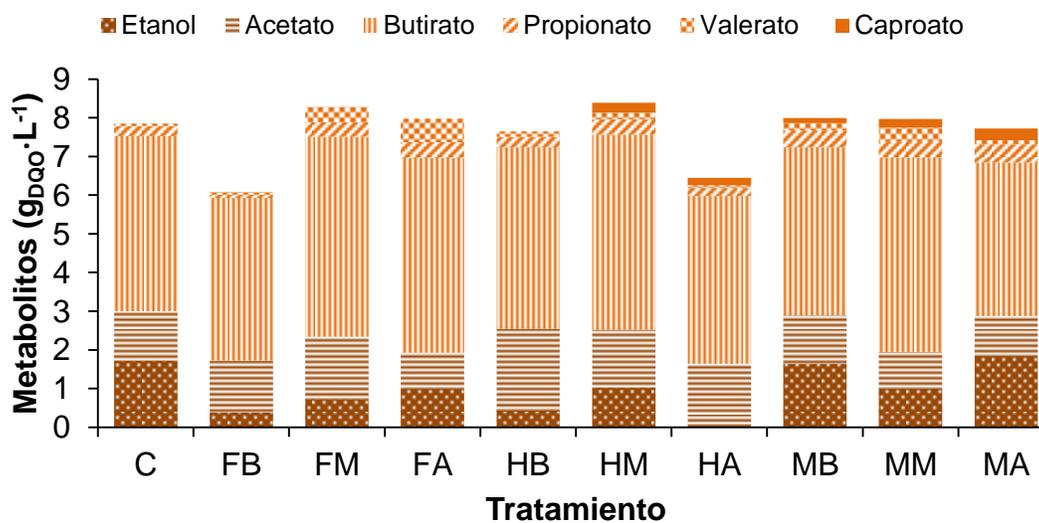
En cuanto al hidroximetilfurfural, se encontró que los microorganismos en el inóculo no fueron capaces de metabolizarlo completamente en ninguno de los tratamientos individuales o en las mezclas. Por tanto, la presencia del hidroximetilfurfural tuvo un efecto negativo sobre la producción de H<sub>2</sub>.

También se presenta en la Figura 5.2, un análisis del rendimiento máximo calculado en base a la producción de hidrógeno (mL) y la concentración de sustrato consumido (g<sub>Carb.Total</sub>). Se observa que el menor rendimiento fue presentado con la concentración de hidroximetilfurfural de 0.02 g·L<sup>-1</sup> (p<0.05). Además de que el rendimiento máximo fue igual para control y de furfural a 0.5 g·L<sup>-1</sup> (p>0.05).



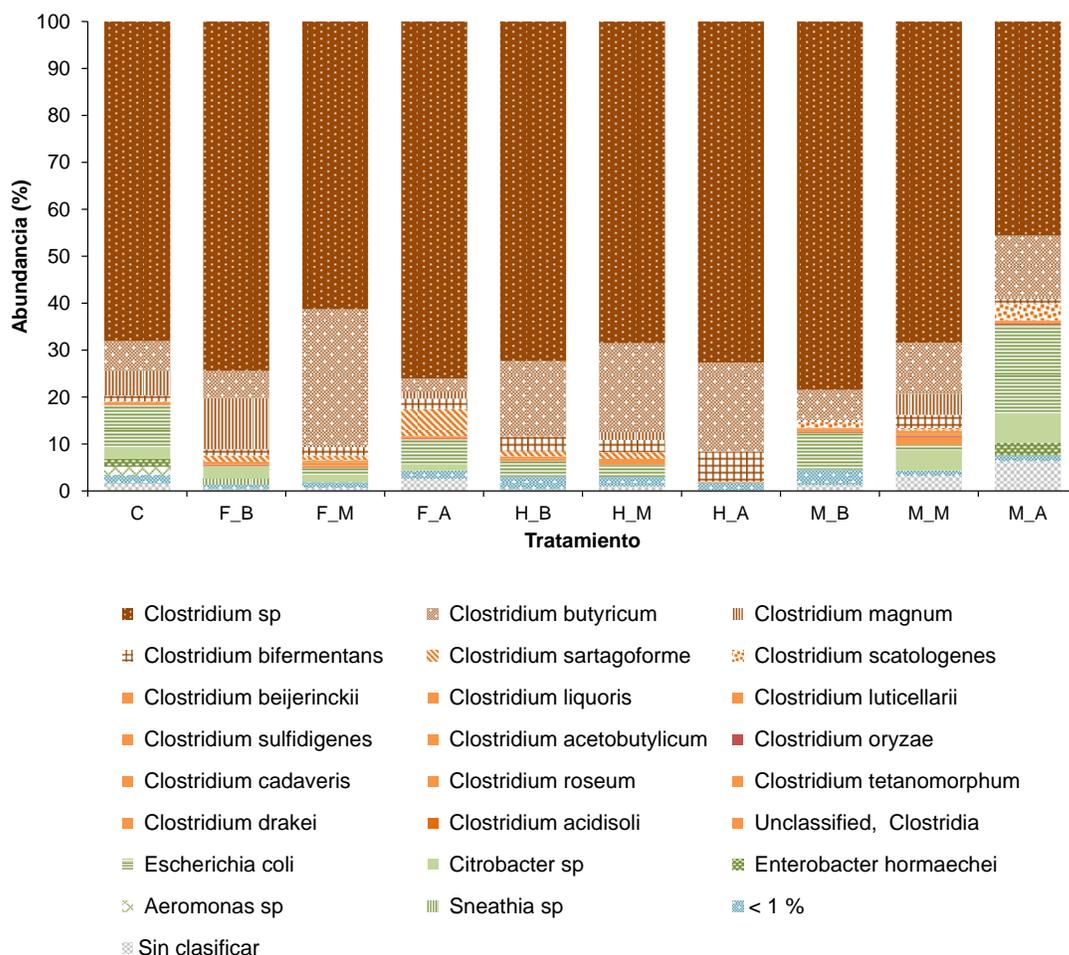
**Figura 5.2.** Rendimiento máximo de hidrógeno en función de la concentración de inhibidores

La Figura 5.3 muestra los metabolitos solubles formados al final de la fermentación. En el tratamiento control, los principales metabolitos fueron el butirato, acetato seguido del etanol que comprenden el 95% de todos los metabolitos. La producción de etanol indica que la fuente de carbono (xilosa) se consumió mediante una ruta que no está ligada a la producción de H<sub>2</sub>.



**Figura 5.3** Metabolitos solubles formados en el ensayo de tolerancia a furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas durante la producción de hidrógeno.

La Figura 5.4 presenta la estructura de la comunidad microbiana al final de las fermentaciones. Es importante destacar que en promedio 99.3% de las secuencias de todos los tratamientos fueron clasificadas taxonómicamente. Las especies de *Clostridium sp.* dominaron en todos los tratamientos con un valor promedio de  $83 \pm 12\%$ . Sólo se observó una abundancia de especies de *Clostridium* diferente para la mezcla con concentraciones altas con un valor del  $59 \pm 8\%$ , el más bajo de todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ). En este tratamiento, *Escherichia coli* tuvo la mayor abundancia de todos los tratamientos con el  $21 \pm 5\%$ . La abundancia de esta especie puede estar relacionada con la baja  $R_{max}$  observada en este tratamiento (Tabla 5.1).



**Figura 5.4** Estructura microbiana al final del ensayo de tolerancia a furfural, hidroximetilfurfural y sus mezclas durante la producción de hidrógeno.

En la Tabla 5.2 se muestra una comparación de estudios de producción de hidrógeno a partir de xilosa en presencia de furfural o hidroximetilfurfural.

**Tabla 5.2** Comparación de estudios de producción de hidrógeno a partir de xilosa en presencia de inhibidores.

Inóculo	Xilosa (g·L <sup>-1</sup> )	F;H (g·L <sup>-1</sup> )	Rendimiento (mLH <sub>2</sub> ·g <sup>-1</sup> )	Velocidad de producción (mLH <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Porcentaje de inhibición (%)	Referencia
<i>Thermoanaeroba cterium thermosaccharoly ticum</i> w16	10	0	330	2,743	0	Cao <i>et al.</i> , 2010
		0.5; 0.5	312	2,155	5	
		0.8; 0.8	328	1,244	0.7	
Lodo de digestión anaerobia pretratado (90 °C, 10 min)	5	0	274	43	0	Quéméneur <i>et al.</i> , 2012
		1.0; 0.0	78	86	72	
		0.0; 1.0	61	28	78	
Lodo de digestión anaerobia pretratado (70 °C, 30 min)	8.8	0	159	170	0	Akobi <i>et al.</i> , 2016
		0.5; 0.0	175	166	-10	
		1.0; 0.0	157	134	1	
		2.0; 0.0	145	151	9	
		4.0; 0.0	95	74	54	
Lodo granular anaerobio pretratado (110 °C, 24 h)	10	0	151	2,289	0	Este estudio
		0.1; 0.0	70	2,312	37	
		0.5; 0.0	236	2,222	-1	
		1.0; 0.0	125	2,362	33	
		0.0; 0.02	76	1,141	69	
		0.0; 0.09	175	2,441	33	
		0.0; 0.19	209	2,536	32	
		0.1; 0.02	106	1,834	57	
		0.5; 0.09	121	1,534	37	
		1.0; 0.19	105	1,981	45	

F, furfural; H, hidroximetilfurfural.

En comparación con otros estudios, los resultados presentados por Cao *et al.* (2017) indican que el inóculo tuvo porcentajes de inhibición de tan sólo 5% en presencia de mezclas de furfural e hidroximetilfurfural, a diferencia de este estudio donde los porcentajes de inhibición oscilaron entre 37% y 57%. Sin embargo, las velocidades de producción de hidrógeno reportadas por Cao *et al.* (2017), si muestran una disminución considerable del 21% al 55% en comparación con el control, cuando las concentraciones de las mezclas incrementan.

Por otra parte, el inóculo utilizado en este ensayo resultó más tolerante al furfural e hidroximetilfurfural en comparación con otros cultivos mixtos como el utilizado por Quémenéur *et al.* (2012). Estos autores reportaron inhibiciones de la producción de hidrógeno de 72% y 78% a concentraciones de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. Mientras que las velocidades de producción fueron hasta 20 veces menores que las encontradas en este estudio.

En otros casos, como el estudio de Akobi *et al.* (2016), se analizó el impacto del furfural sobre la velocidad y el rendimiento de hidrógeno en función de la relación inicial de sustrato(S)/microorganismo(X) de 4.0, 2.0, 1.0 y 0.5  $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{g}_{\text{SSV}}$  y en función de las concentraciones de furfural de 0.5, 1.0, 2.0, y 4.0. Se encontró que la producción de hidrógeno fue más alta a una relación S/X de 4  $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{g}_{\text{SSV}}$  con las concentraciones más bajas de furfural (0.5 y  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Es decir, la inhibición es menor cuando se agrega más sustrato. Otro punto importante del estudio de Akobi *et al.* (2016), es que la concentración más baja de furfural ( $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), incrementó la producción de hidrógeno, fenómeno también observado en este estudio a la misma concentración de furfural (Tabla 5.2). No obstante, cuando se rebasó cierto umbral ( $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de furfural), se observó su efecto inhibitorio. También es importante destacar, que las velocidades de producción de hidrógeno que reporta Akobi *et al.* (2016), son 10 veces menores que las encontradas en este estudio.

## **5.2. Producción de H<sub>2</sub> a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de agave**

La producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica tiene como uno de sus principales retos enfrentar la formación de subproductos derivados de la descomposición de los azúcares como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, entre otros, que causan inhibición del bioproceso (Akobi *et al.*, 2016; Gonzales *et al.*, 2016; Haroun *et al.*, 2016; Nissilä *et al.*, 2014). En este trabajo se propone utilizar el bagazo de agave como sustrato debido a que su generación en México asciende a las 700 ton/año (Consejo Regulador del Tequila, 2017), además, existen pocos estudios que hayan utilizado hidrolizados ácidos de bagazo de agave para producir hidrógeno, algunos de los reportes disponibles utilizaron reactores en lote con hidrolizados ácidos o enzimáticos (Arreola-Vargas *et al.*, 2016), o bien, reactores en continuo utilizando hidrolizados enzimáticos (Contreras-Dávila *et al.*, 2017).

### **5.2.1. Hidrolizados ácido de bagazo de agave**

Para la obtención del hidrolizado de bagazo de agave se varió la concentración de HCl (2.7 y 1.4 % p/p) y tiempo de reacción (1.3 y 2.1 h) a una temperatura de 125 °C. Los hidrolizados se caracterizaron en función de su contenido de carbohidratos totales variando de  $16.1 \pm 0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $18.7 \pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La condición que generó una mayor cantidad de carbohidratos totales fue con 1.4 % p/p de HCl y 2.1 h de reacción. La composición química de estos hidrolizados fue  $18.9 \pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de DQO,  $18.7 \pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales,  $11.9 \pm 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de azúcares reductores,  $10.3 \pm 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenoles,  $6.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético,  $37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de furfural y  $27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de hidroximetilfurfural.

Estos hidrolizados fueron utilizados para los ensayos en reactores en lote, y para el arranque del reactor anaerobio discontinuo secuencial.

### 5.2.2. Producción de hidrógeno en reactores en lote

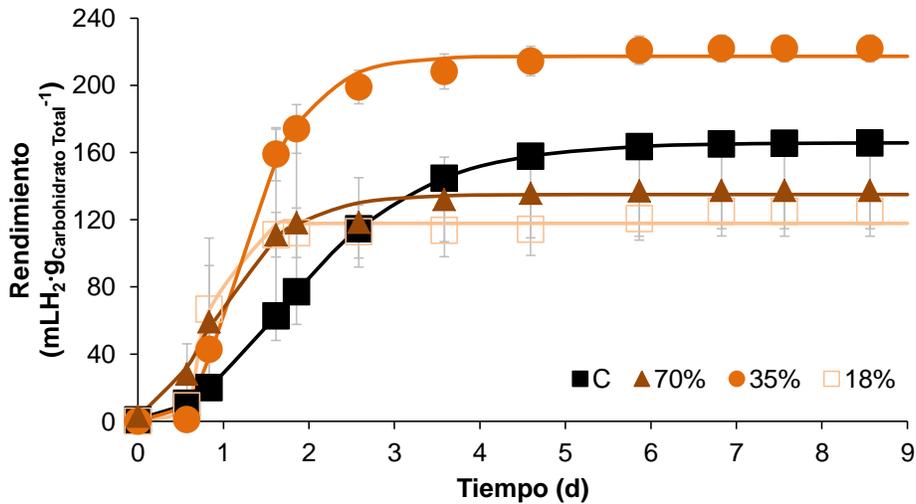
Estudios previos han demostrado que los hidrolizados ácidos de biomasa lignocelulósica (bagazo de agave, bagazo de caña de azúcar y tallos de girasol) deben diluirse por la presencia de compuestos inhibitorios, y así incrementar las velocidades de producción de hidrógeno (Fankum *et al.*, 2011b; Monlau *et al.*, 2013; Arreola-Vargas *et al.*, 2016).

En este ensayo, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de hidrolizados ácidos de bagazo de agave sobre la producción de hidrógeno, comparando con un control, con xilosa como fuente de carbono. La Figura 5.5 muestra los resultados de las cinéticas de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados diluidos al 18, 35 y 70%. Mientras que la Tabla 5.3 muestra los parámetros experimentales y calculados con el modelo modificado de Gompertz ( $R^2 > 98\%$ ). De la misma forma que en el ensayo de tolerancia, se calcularon los porcentajes de inhibición para cada dilución de hidrolizado de acuerdo a la ecuación 5.

La producción de hidrógeno en los reactores en lote tuvo una duración de 9 días. El control tuvo un rendimiento de  $166 \pm 2 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$  con una velocidad máxima de  $61 \pm 0 \text{ mLH}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$  y un rendimiento molar de  $1.0 \pm 0.2 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}_{\text{Carb.Total}}^{-1}$ .

El tratamiento con hidrolizados al 35%, tuvo el mayor potencial de producción de hidrógeno respecto al control y las otras diluciones de hidrolizados probadas ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la  $R_{\text{max}}$ , el tratamiento con hidrolizados al 35% superó casi al triple la velocidad de producción del control (Tabla 5.3).

Los tratamientos con hidrolizados al 18% y 70% presentaron porcentajes de inhibición del  $25 \pm 5 \%$  en promedio, sin diferencia significativa entre ellos para el rendimiento y la  $R_{\text{max}}$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 5.5** Cinética de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de agave.

De lo anterior se destaca que la dilución de hidrolizados al 35% fue la que presentó la mayor producción de hidrógeno, incluso produjo 35% más que el control. Esta dilución corresponde a  $6.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales.

En lo que respecta al rendimiento molar, en la tabla 5.3 se observa la misma tendencia que la presentada por el rendimiento por gramo de carbohidratos consumidos, ya que se obtuvo un mayor rendimiento en el tratamiento con hidrolizado al 35%, mientras que para el control y las otras diluciones no hubo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

De lo que se observó en este experimento se destaca que con el tratamiento de hidrolizados al 18% y 70% no hubo diferencias significativas entre los parámetros calculados y los obtenidos a través del modelo de Gompertz. La baja producción de hidrógeno con los hidrolizados al 18% fue posiblemente debido a la baja disponibilidad de azúcares, mientras que en el tratamiento con hidrolizados al 70% hubo un decaimiento de la producción de hidrógeno posiblemente debido a la presencia de compuestos inhibitorios. La baja producción de hidrógeno en el control puede ser debido a la disminución del pH, lo que quiere decir que ocurrió una solventogénesis debido a producción de etanol.

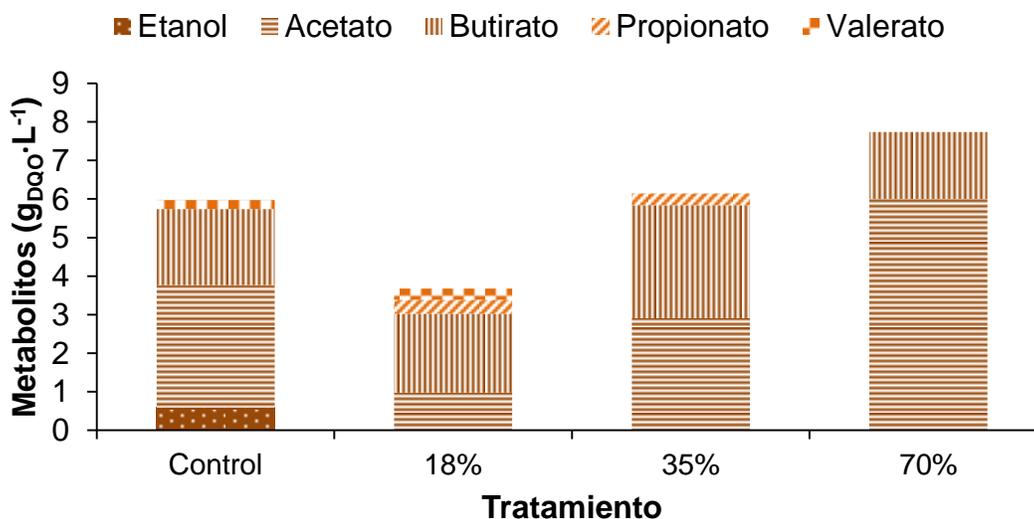
**Tabla 5.3** Parámetros cinéticos y resultados experimentales en ensayo con hidrolizados

Tratamiento	Parámetros a partir de datos experimentales				Parámetros de Gompertz			
	Rendimiento (mL·g <sub>CT</sub> <sup>-1</sup> )	Productividad (mL·g <sub>CT</sub> <sup>-1</sup> )	Rendimiento mol <sub>H<sub>2</sub></sub> ·mol <sub>CT</sub> <sup>-1</sup>	PI* (%)	Rendimiento mL·g <sub>CT</sub> <sup>-1</sup>	R <sub>max</sub> mL·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	λ (h)	R <sup>2</sup>
18%	125 ± 10	144 ± 10	0.84 ± 0.1	25 ± 6	118 ± 12	158 ± 37	14 ± 0	1.000
35%	222 ± 8	160 ± 27	1.49 ± 0.1	-34 ± 5	217 ± 8	167 ± 20	15 ± 0	0.983
70%	137 ± 27	89 ± 27	0.93 ± 0.2	26 ± 5	117 ± 9	151 ± 40	7 ± 7	0.996
Control	166 ± 2	60 ± 1	1.00 ± 0.2	-	166 ± 2	61 ± 0	14 ± 1	1.000

\*PI = Porcentaje de inhibición

CT = Carbohidrato Total

Con el fin de entender el comportamiento de la producción de hidrógeno con diferente concentración de hidrolizados, se determinaron los metabolitos solubles al final de la fermentación. En la Figura 5.6 se muestra su distribución expresada en g<sub>DQO-equivalente</sub>·L<sup>-1</sup>. Se determinó que el metabolito en mayor concentración fue el acetato, contrario a los ensayos con las mezcla sintéticas.



**Figura 5.6** Metabolitos al final de la fermentación de hidrolizados

En la Tabla 5.4 se muestra una comparación de estudios de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de bagazo de biomasa lignocelulósica.

**Tabla 5.4** Comparación de estudios de producción de hidrógeno en lote a partir hidrolizados de biomasa lignocelulósica.

Hidrolizado	Pretratamiento	CT* g·L <sup>-1</sup>	F; H* g·L <sup>-1</sup>	Rmax mLH <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	Referencia
Bagazo de caña de azúcar	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%, 121 °C, 60 min	10	0.22; ND	110	Fangkum & Reungsang ( 2011b)
Tallos de girasol	HCl 4%, 170 °C, 60 min	3	1.15; 0.13	1.81	Monlau <i>et al.</i> (2013)
Fruto de palma vacía		10	4.43; 2.92	2090	
Cáscara de arroz	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%, 121 °C, 60 min	10	2.93; 2.09	3340	Gonzáles <i>et al.</i> (2016)
Madera de pino		10	4.05; 2.60	2533	
Bagazo de agave	HCl 1.4%, 124 °C, 126 min	7	0.095; 0.031	2400	Arreola-Vargas <i>et al.</i> (2016)
Bagazo de agave	HCl 1.4%, 124 °C, 126 min	6	0.013; 0.010	778	Este estudio

CT = Carbohidratos totales; F = Furfural; H = Hidroximetil furfural; ND = No determinado.

En confrontación con estudios anteriores a este, Fangkum & Reungsang (2011a) utilizaron como inóculo heces fecales de elefante y produjeron hidrógeno en lote a partir de hidrolizados ácidos de bagazo de caña de azúcar, donde identificaron que obtenían una mayor producción de hidrógeno al diluir el hidrolizado en un 20% (10 g·L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales), produciendo 110 mLH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, una séptima parte de lo obtenido en este estudio y con la presencia de 0.22 g·L<sup>-1</sup> de furfural.

En otro caso, se tiene que para un ensayo con 3.75% de hidrolizados ácidos de tallos de girasol obtuvieron tan sólo una velocidad de producción de 1.81 mLH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Esta baja velocidad de producción puede deberse a una mayor concentración de compuestos inhibitorios a la encontrada en este estudio, además de que la cantidad carbohidratos en el ensayo también fue menor. Un aspecto

importante que concluye Monlau *et al.* (2013) es que al incrementar el porcentaje de hidrolizados se generaron condiciones de estrés a las bacterias productoras de hidrógeno pertenecientes al género de *Clostridium*, lo que provocó un cambio en las rutas metabólicas hacia la solventogénesis. También se provocó un cambio en la estructura microbiana con el incremento en la abundancia de bacterias de ácido láctico como *Sporolactobacillus*.

Por su parte Gonzales *et al.* (2016), estudiaron la concentración de sustrato óptima de tres hidrolizados ácidos diluidos obtenidos de residuos de palma aceitera, cáscara de arroz y madera de pino para maximizar la producción de hidrógeno. Encontraron que al diluir estos hidrolizados a una concentración de 10 g·L<sup>-1</sup> de carbohidratos, se obtuvo una mayor productividad de hidrógeno, mientras que en las pruebas con 20 g·L<sup>-1</sup> se disminuía a una tercera parte la productividad. En este estudio se obtuvo una productividad tres veces menor que la reportada por González *et al.* (2016).

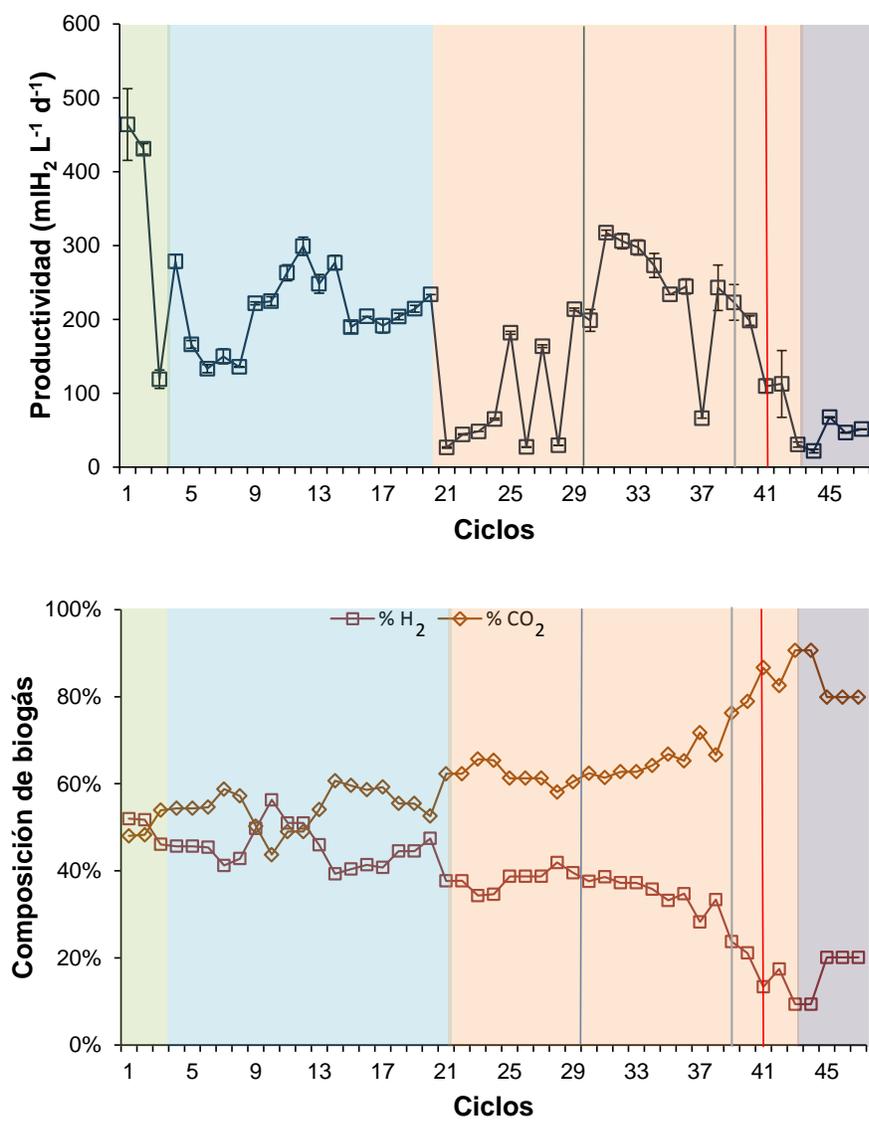
En el caso de Arreola *et al.*, (2016), encontraron que los hidrolizados ácidos de bagazo de agave diluidos al 20% (3.5 g·L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales) se obtuvo la mayor tasa de producción de hidrógeno que corresponde a 2,400 mLH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, tres veces superior a la encontrada en este estudio.

### 5.2.3. Producción de hidrógeno en ASBR

De los resultados con los reactores en lote, se encontró que los hidrolizados ácidos de bagazo de agave tienen potencial para producir hidrógeno. Sin embargo, éstos se deben diluir a una DQO de alrededor de  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales para disminuir la concentración de los inhibidores y aún mantener una concentración de azúcares adecuada para obtener altas velocidades de producción de hidrógeno. En esta sección del trabajo experimental, se propuso utilizar un reactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR, por sus siglas en inglés), que se ha utilizado en otros trabajos para aclimatar el inóculo, y con ello soportar mayores cargas orgánicas o mayores concentraciones de compuestos inhibitorios como los encontrados en la vinazas (Buitrón & Carvajal, 2010). El objetivo fue aclimatar el inóculo para producir  $\text{H}_2$  sin necesidad de diluir los hidrolizados.

Se arrancó el reactor en modo lote a una concentración de hidrolizados de  $6.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales, con  $8,909 \text{ mgSV}\cdot\text{L}^{-1}$  de lodo granular anaerobio pre-tratado térmicamente para mantener la relación sustrato:inóculo de  $1.12 \text{ g}\cdot\text{gSV}^{-1}$  utilizada en el ensayo en lote. El reactor se incubó hasta que la curva de producción de hidrógeno se volvió asíntota. Así, se fijó un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 48 h y se operó con un porcentaje de recambio del 50%. En la Figura 5.7 se muestran los gráficos correspondientes a la productividad y composición del biogás del reactor.

Una vez que se inició la operación del reactor en modo discontinuo secuencial a una concentración de carbohidratos totales de  $6.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se mantuvo esta condición hasta que se presentaran condiciones de estabilidad en cuanto a la productividad de hidrógeno (coeficiente de variación  $< 10 \%$ ). En el periodo estable (ciclos 14 al 19), la productividad de hidrógeno promedio fue de  $201 \pm 10 \text{ mLH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  con  $6.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales.



Carbohidratos Totales en cada ciclo (g·L<sup>-1</sup>):

- 6.3 (arranque)
- 6.3
- 9
- 11.4
- Alimentación con Lote 2 de hidrolizados
- Alimentación con Lote 3 de hidrolizados
- Adición de vitaminas

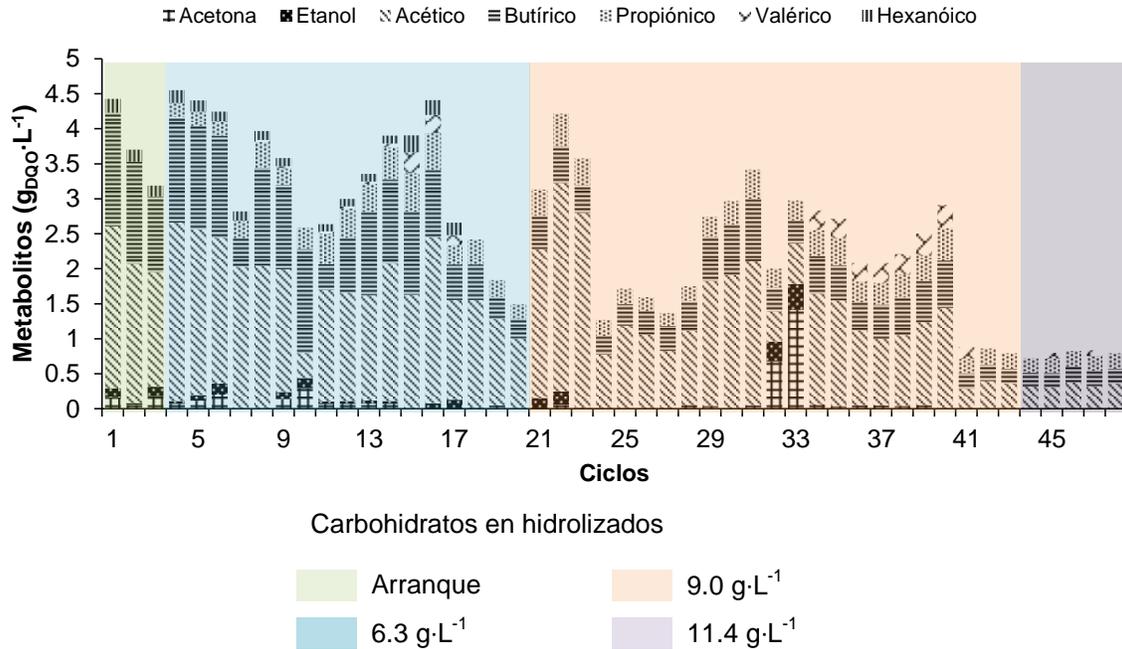
**Figura 5.7** Productividad de H<sub>2</sub> y composición de biogás en reactor ASBR

Después, se incrementó la concentración de hidrolizados hasta 9.0 g·L<sup>-1</sup> de carbohidratos totales. Se observa en la Figura 5.7 que al inicio de esta condición hubo un decaimiento en la productividad de H<sub>2</sub>, aunque en los 8 ciclos posteriores se observó un incremento gradual hasta llegar a 206 ± 11 mLH<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en los ciclos 29 y 30. En el ciclo 31, se hizo un cambio en el lote de hidrolizados los

cuales se alimentaron a la misma concentración de  $9.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbohidratos totales. Se observa que a partir del ciclo 31 al 40 hubo una tendencia a la disminución de la productividad de hidrógeno. En el ciclo 39 hubo nuevamente un cambio de lote de hidrolizados. En el ciclo 42 se decidió agregar vitaminas al hidrolizado esperando encontrar un incremento en la productividad de hidrógeno, aunque la adición de nutrientes tuvo un efecto contrario pasando de una productividad de  $112 \pm 9$  a  $31 \pm 3 \text{ mLH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , lo que pudo deberse a una inhibición por nutrientes, ya que se ha comprobado que el fierro o iones de magnesio pueden inducir en los cambios de las rutas metabólicas y afectar el crecimiento y la producción de hidrógeno (Wang *et al.*, 2007). Por último, se incrementó la concentración de carbohidratos ( $11.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y se obtuvo un valor promedio de productividad de  $55 \pm 11 \text{ mLH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ .

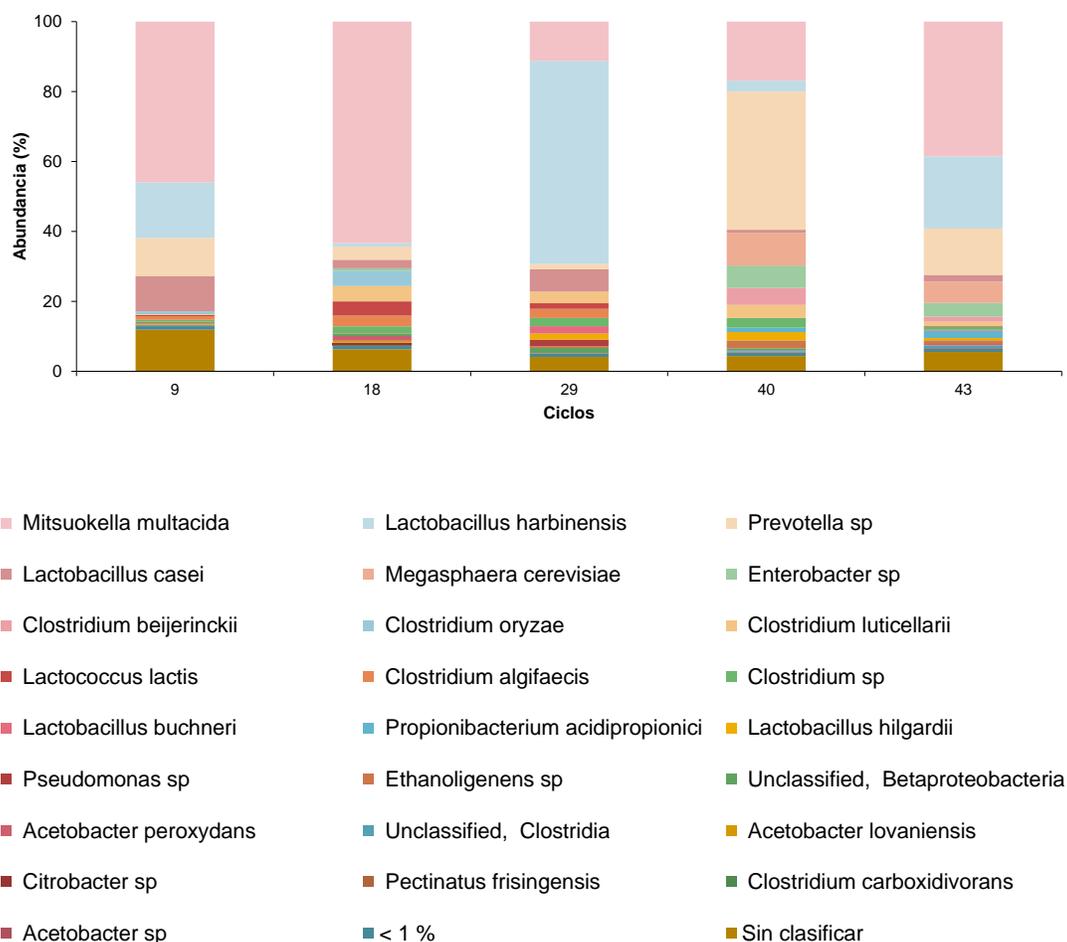
El porcentaje de hidrógeno en el biogás se mantuvo constante en la primera condición probada ( $45 \pm 5\%$ ), disminuyó gradualmente conforme incrementó la concentración de los hidrolizados en la entrada a  $38 \pm 2\%$  y  $22 \pm 9\%$ . El incremento de la fracción de  $\text{CO}_2$  se puede asociar a la presencia de bacterias que propician la homoacetogénesis, es decir asimilación de hidrógeno y  $\text{CO}_2$  como sustrato para generar ácido acético. Otro aspecto a considerar es la formación de acetona y etanol en los ciclos 32 y 33 (ver Figura 5.7), ya que de acuerdo con Sakai *et al.* (2004), las bacterias consumen  $\text{H}_2$  en mayor proporción que el  $\text{CO}_2$  para generar estos alcoholes.

En ninguna de las muestras de biogás analizadas se encontró metano ( $\text{CH}_4$ ), lo que quiere decir que no se alcanzó la digestión anaerobia por completo, lo cual es favorable para la hidrogénesis además de comprobar la efectividad del pretatamiento térmico del inóculo. En la Figura 5.8 muestra el perfil de metabolitos en el efluente del reactor durante todo el proceso de operación. Se observa que la producción de metabolitos disminuyó cuando disminuyó la productividad de  $\text{H}_2$ . De la misma forma que en el ensayo en lote con hidrolizados, se obtuvieron mayores porcentajes de acetato, es decir que fue la ruta favorecida para la producción de hidrógeno.



**Figura 5.8** Metabolitos solubles en ASBR.

La Figura 5.9 se muestra la estructura de la comunidad microbiana en muestras tomadas en diferentes ciclos de operación del ASBR. A diferencia de los resultados en el ensayo de tolerancia, se observa que en los ciclos 9, 18 y 43 predominó la bacteria *Mitsuokella multacida*, que de acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés), es anteriormente conocida como *Bacteroides multiacidus*, esta bacteria ha sido aislada de heces fecales humanas, y pertenece a la comunidad del intestino humano. Es una bacteria Gram Negativa, de forma bacili, sin motilidad, su ambiente es anaerobio y en condiciones mesofílicas. Se tiene registro la bacteria *Mitsuokella multacida* en un estudio de producción de hidrógeno (Jung *et al.*, 2010a), donde se describe un método para reducir el periodo de arranque en un reactor UASB productor de hidrógeno, en el que usaron como inóculo el lodo de un digester anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales.



**Figura 5.9** Estructura de la comunidad microbiana en diferentes ciclos del ASBR

De acuerdo con este autor, se detectaron *Megasphaera cerevisiae* (número de registro L37040), *Megasphaera elsdenii* (AF283705) y *Mitsuokella multacida* (X81878) con 98%, 98% y 90% de similitud, respectivamente. La presencia de esta bacteria en este estudio se asocia a una alta producción de hidrógeno, sin considerar la última fase experimental del ASBR.

En cuanto a la abundancia de especies del género *Clostridium*, se tiene el 3 % en el ciclo 9, 14 % en el ciclo 18, 9 % en el ciclo 29, 14 % en el ciclo 40 y 5 % en el ciclo 43. Se observa que existe una mayor productividad de hidrógeno cuando hay una mayor abundancia de estas especies, y su incremento se debe a la evolución selectiva del inóculo, ya que se favorecen las condiciones para su crecimiento.

Sin embargo, la disminución de la proporción de bacterias clostridiales se explica con la predominancia de las especies *Lactobacillus harbinenses*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus hilgardi*, que pertenecen al género *Lactobacillus*, de las que se ha reportado que disminuyen la producción de hidrógeno en los cultivos mixtos por sus efectos inhibitorios en las especies de *Clostridium* causados por la excreción de bacteriocinas (Noike *et al.*, 2002).

Otras especies que predominan en las muestras corresponden a *Prevotella sp.*, *Megasphaera cerevisiae*, y *Enterobacter sp.*, de las que se tiene evidencia en otros estudios que están relacionadas con la producción de hidrógeno cuando se utilizan cultivos mixtos (Marques dos Reis *et al.*, 2015), la presencia de estas bacterias en los ciclos señalados confirma este hecho.

En la Tabla 5.5 se tienen investigaciones recientes acerca de la producción de hidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica con un ASBR. Arreola *et al.* (2013), estudiaron el efecto de hidrolizados ácidos de paja de avena en un ASBR con una concentración de alimentación de  $5 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Se arrancó con un sustrato modelo de glucosa + xilosa en el que se alcanzó una productividad de  $18 \text{ mlH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , este sustrato fue sustituido gradualmente por hidrolizados ácidos en el que se alcanzaron productividades de  $2 \text{ mlH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  debido a la producción de metano.

En el estudio de Zheng *et al.* (2014) probaron hidrolizados de tallos de maíz por un proceso biológico (hongos). Su variable independiente fue el TRH que se varió en 6, 12, 18 y 24 h. La máxima productividad de hidrógeno se obtuvo con un TRH de 12 h con el que se obtuvieron  $215 \text{ mlH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ .

**Tabla 5.5** Comparación de estudios de producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de biomasa lignocelulósica con ASBR

Hidrolizados	Condiciones de operación	Sustrato, (CH*) g·L <sup>-1</sup>	Productividad mLH <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	Referencia
Paja de avena	TRH 24 h, pH 5.5, glucosa + hidrolizado	5	18	Arreola-Vargas <i>et al.</i> (2013)
			2	
Tallos de maíz	TRH 6, 12, 18 y 24 h	8	215	Zhao <i>et al.</i> (2014)
Bagazo de agave	TRH 48 h, pH 5.5	6	201	Este estudio
		9	298	
		12	55	

\*CH = Carbohidratos

## 6. Conclusiones

La concentración y el tipo de inhibidores influyeron sobre la producción de H<sub>2</sub>, ya que con el inóculo probado, biomasa suspendida derivada de un lodo anaerobio granular pre-tratado térmicamente, se determinó que:

- El inóculo presentó un umbral de tolerancia al furfural con respecto a la producción de hidrógeno, ya que a las concentraciones baja y alta experimentadas, se encontraron porcentajes de inhibición de hidrógeno del 35 %, mientras que a la concentración media (0.5 g·L<sup>-1</sup>) no se observó inhibición. Se encontró que el inóculo fue capaz de metabolizar el 100% del furfural adicionado.
- El hidroximetilfurfural tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre la producción de H<sub>2</sub> en comparación con el furfural. El inóculo metabolizó parcialmente el HMF.
- Se esperaba que con los compuestos en mezcla hubiera un efecto sinérgico; sin embargo, se observó que el furfural al ser metabolizado en ácido furóico tuvo un efecto inhibitorio antagónico, reduciendo la inhibición del H<sub>2</sub>.
- Se observó que las especies de *Clostridium* fueron altamente resistentes a la presencia de ambos compuestos inhibitorios.

Se obtuvieron hidrolizados de bagazo de agave, con una concentración de carbohidratos totales de 18.7 g·L<sup>-1</sup>, 37 mg·L<sup>-1</sup> de furfural y 27 mg·L<sup>-1</sup> de hidroximetilfurfural.

Se demostró que es posible producir H<sub>2</sub> a partir de hidrolizados de bagazo de agave en lote:

- La mayor producción de hidrógeno se alcanzó con hidrolizados diluidos al 35%.
- Se observó que con el tratamiento de hidrolizados al 18% se tuvo la menor producción de hidrógeno debido a la baja disponibilidad de azúcares, mientras que en el tratamiento al 70% hubo un decaimiento de la

producción de hidrógeno debido a la presencia de compuestos inhibitorios en mayor concentración.

- Las rutas metabólicas de los microorganismos son sensibles a la composición de hidrolizados de bagazo de agave ya que la producción de metabolitos asociados a la producción de hidrógeno fue diferente con cada tratamiento de hidrolizado experimentado.

De la producción de H<sub>2</sub> a partir de hidrolizados de bagazo de agave en un reactor discontinuo secuencial,

- Con la estrategia de ASBR se logró que la biomasa suspendida se aclimatara a mayores concentraciones de hidrolizados ácidos de bagazo de agave.
- La evolución de la comunidad microbiana a mayores concentraciones de hidrolizados ácidos derivó en el establecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*, que desplazaron las especies productoras de H<sub>2</sub> del género *Clostridium*.

## **Anexo. Productividad derivada de la tesis**

Participación en el Congresos Nacionales:

- Alvarado-Michi E.L., Carrillo-Reyes J., Buitrón G., Valdez-Vazquez I. (2016). Efecto del furfural e hidroximetilfurfural sobre la producción de hidrógeno a partir de la fermentación de la xilosa. Congreso Regional de Energías Renovables. Presentación de cartel. 9 al 11 de noviembre de 2016, Aguascalientes, Aguascalientes.
- Alvarado-Michi E.L., Muñoz-Páez K. M., Buitrón G., Valdez-Vazquez I. (2017). Hydrogen production from agave bagasse hydrolysates using a mixed culture. IWA-México 5<sup>th</sup> Young Water Professionals Conference. Presentación oral. 24 a 26 de mayo, Morelia, Michoacán.
- Alvarado-Michi E.L., Muñoz-Páez K. M., Buitrón G., Valdez-Vazquez I. (2017). Aclimatación de un cultivo mixto productor de hidrógeno utilizando hidrolizados de bagazo de agave. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25 al 30 de junio, Puerto Vallarta, Jalisco.

Publicación de artículo (en revisión, 13 de octubre de 2017)

- Muñoz-Páez K. M, Alvarado-Michi E.L., Buitrón G., Valdez-Vazquez I. (2017). Inhibitory effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on hydrogen production from xylose using a mixed culture enriched with *Clostridium* spp. International Journal of Hydrogen Energy.

## Referencias

- Akobi, C., Hafez, H., & Nakhla, G. (2016). The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology*, 221, 598–606.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.067>
- Alonso M., S., & Rigal, L. (1997). Caracterización y valorización del bagazo de Agave tequilana Weber de la industria del tequila. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 3(2), 31–39.
- APHA/AWWA/WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, 541.  
<http://doi.org/ISBN 9780875532356>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(2), 897–904.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R. I., Alatríste-Mondragón, F., & Méndez-Acosta, H. O. (2015). Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresource Technology*, 181, 191–199.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>
- Biofuel.org.uk. (2015). Biofuels - Third Generation Biofuels. Retrieved from <http://biofuel.org.uk/third-generation-biofuels.html>
- Boopathy, R., & Daniels, L. (1991). Isolation and Characterization of a Furfural Degrading Sulfate-Reducing Bacterium from an Anaerobic Digester. *Current Microbiology*, 23, 327–332.
- Bowen, S., & Zapata, A. V. (2009). Geographical indications, terroir, and socioeconomic and ecological sustainability: The case of tequila. *Journal of Rural Studies*, 25(1), 108–119.  
<http://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2008.07.003>
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101, 9071–9077.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>

- Cao, G. L., Ren, N. Q., Wang, A. J., Guo, W. Q., Xu, J. F., & Liu, B. F. (2010). Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13475–13480. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.127>
- Caspeta, L., Caro-Bermudez, M. A., Ponce-Noyola, T., & Martinez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99, 4044–4064. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Cheng, C. L., Lo, Y. C., Lee, K. S., Lee, D. J., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2011). Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*, 102(18), 8514–8523. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.059>
- Consejo Regulador del Tequila. (2017). Consumo de agave para Tequila y Tequila 100% de agave. Retrieved from <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Contreras-Dávila, C. A., Garcia, L. A., & Alatraste-Mondragón, F. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate ..., (October). <http://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Crespo González, M. R. (2011). *Proceso de compostaje de bagazo de agave tequilero a gran escala y uso de la composta para el cultivo de Agave Tequilana en contenedor*. Universidad de Guadalajara.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources , biofuel policy , biofuel economy and global biofuel projections, 49, 2106–2116. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.02.020>
- Dubois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <http://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elbeshbishy, E., Nakhla, G., & Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential ( BMP ) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresource Technology*, 110, 18–25. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.025>
- Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H., & Ponce-Noyola, M. T. (2011). Producción de hidrógeno y metano como biocombustibles bajo el esquema de biorrefinería. *Concyteg*, 6(71), 526–539.

- Fangkum, A., & Reungsang, A. (2011a). Biohydrogen production from mixed xylose/arabinose at thermophilic temperature by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13928–13938. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.098>
- Fangkum, A., & Reungsang, A. (2011b). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8687–8696. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.119>
- Francés, R., Benloch, S., Zapater, P., González, J., Lozano, B., Muñoz, C., ... Such, J. (2004). A Sequential Study of Serum Bacterial DNA in Patients With Advanced Cirrhosis and Ascites. *Hepatology*, 39(2), 484–491. <http://doi.org/10.1002/hep.20055>
- Garcia, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23.
- Garcia, A. (2012, 18 de febrero). México País de Magueyes. *La Jornada Del Campo*. Tomado de: <http://www.jornada.unam.mx/2012/02/18/cam-pais.html>
- Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P., Parthiban, A., & Kim, S. H. (2016). Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 22–27. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.016>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2011). Massive parallel 16SrRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol*, 76, 301–310. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x>
- Haroun, B. M., Nakhla, G., Hafez, H., & Nasr, F. A. (2016). Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. *Renewable Energy*, 93, 302–311. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.072>
- Haroun, B. M., Nakhla, G., Hafez, H., Velayutham, P., Levin, D. B., Derakhshani, H., Khafipour, E. Nasr, F. A. (2016). Significance of acclimatization for biohydrogen production from synthetic lignocellulose hydrolysate in continuous-flow systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(32), 14003–14014. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.289>

- Holladay, J. D., Hu, J., King, D. L., & Wang, Y. (2009). An overview of hydrogen production technologies, *139*, 244–260.  
<http://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.08.039>
- Íñiguez, G., Parra, J., & Velasco, P. A. (2006). Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 8. Evolución de algunos constituyentes de la mezcla de biosólidos-bagazo de agave durante el compostaje. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, *22*(2), 83–93.
- Íñiguez-Covarrubias, G., Lange, S. E., & Rowell, R. M. (2001). Utilization of byproducts from the tequila industry: Part 1: Agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology*, *77*(1), 25–32.  
[http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00137-1](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00137-1)
- Jung, K., Kim, D., & Shin, H. (2010a). A simple method to reduce the start-up period in a H<sub>2</sub>-producing UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(2), 1466–1473.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.095>
- Jung, K., Kim, D., & Shin, H. (2010b). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(24), 13370–13378.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.120>
- Kestur G., S., Flores-Sahagun, T. H. S., Dos Santos, L. P., Dos Santos, J., Mazzaro, I., & Mikowski, A. (2013). Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *45*, 153–161.  
<http://doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.09.001>
- Kongjan, P., Min, B., & Angelidaki, I. (2009). Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures ( 70 8 C ) by mixed culture fermentation. *Water Research*, *43*(5), 1414–1424.  
<http://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.016>
- Lin, R., Cheng, J., Ding, L., Song, W., Zhou, J., & Cen, K. (2015). Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, *196*, 250–255.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.097>
- Lynd, L. R., Wyman, C., Laser, M., & College, D. (2005). Strategic Biorefinery Analysis: Analysis of Biorefineries, (October), 40.
- Marques dos Reis, C., Carosia, M. F., Sakamoto, I. K., Amâncio Varesche, M. B., & Edson, L. S. (2015). Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor ScienceDirect. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(July), 8498–8509.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.136>

- Michelin, M., Ruiz, H., Basu, D., Silva, D., Ruzene, D., Teixeira, J., & Polizeli, M. (2015). *Cellulose from lignocellulosic waste. Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*.  
<http://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.  
<http://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73, 59–65.
- Moncada, J., Cardona, C. A., & Rincón, L. E. (2015). Design and analysis of a second and third generation biorefinery: The case of castorbean and microalgae. *Bioresource Technology*, 198, 836–843.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.077>
- Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(28), 12273–12282.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.018>
- 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.  
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Nahafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol , a comprehensive review with a focus on pretreatment, 27, 77–93.  
<http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Murillo-Alvarado, P. E., Ponce-Ortega, J. M., Castro-Montoya, A. J., Serna-González, M., & El-Halwagi, M. M. (2014). *Biofuels from residues of the tequila industry of Mexico. Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 33). Elsevier.  
<http://doi.org/10.1016/B978-0-444-63455-9.50010-6>
- Nissilä, M. E., Lay, C. H., & Puhakka, J. A. (2014). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. *Biomass and Bioenergy*, 67, 145–159.  
<http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035>
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1367–1371.

- NREL. (2008). *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 21–39.  
<http://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol*, 18(95), 312–331. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00157-3](http://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00157-3)
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 25–33. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates I: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33.
- Pedersen, M., & Meyer, A. S. (2010). Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, 27(6), 739–750.  
<http://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.05.003>
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J., Carrère, H., Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 3150–3159.
- Raman, S., Mohr, A., Helliwell, R., Ribeiro, B., Shortall, O., Smith, R., & Millar, K. (2014). Integrating social and value dimensions into sustainability assessment of lignocellulosic biofuels. *Biomass and Bioenergy*, 82, 49–62.  
<http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.04.022>
- Reginatto, V., & Antônio, R. V. (2015). Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 46(2), 323–35.  
<http://doi.org/10.1590/S1517-838246220140111>
- Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J., & Gao, L. (2009). Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances*, 27(6), 1051–1060.  
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.007>
- Rios, M., & Kaltschmitt, M. (2013). Bioenergy potential in Mexico — status and perspectives on a high spatial distribution, 239–254.  
<http://doi.org/10.1007/s13399-013-0085-3>
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira,

- J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35–51  
<http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>
- Ruiz, H. A., Ruzene, D. S., Silva, D. P., Quintas, M. A. C., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011). Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw – effect of particle size and process conditions, (May 2010), 88–94.  
<http://doi.org/10.1002/jctb.2518>
- Sakai, S., Nakashimada, Y., Yoshimoto, H., Watanabe, S., Okada, H., & Nishio, N. (2004). Ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by a newly isolated thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1. *Biotechnology Letters*, 26, 1607–1612.
- Sukhbaatar, B., Hassan, E. B., Kim, M., Steele, P., & Ingram, L. (2014). Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 196–202.  
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.027>
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benitez, J. A., & Hernandez-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147–2153.  
<http://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.034>
- Valdez-Vazquez, I., Morales, A. L., & Escalante, A. E. (2017). History of adaptation determines short-term shifts in performance and community structure of hydrogen-producing microbial communities degrading wheat straw. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1569–1580.  
<http://doi.org/10.1111/1751-7915.12678>
- Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., & Amaya-Delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*, 159, 214–222.  
<http://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.052>
- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), 1000–1013.  
<http://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480.  
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>

- Van Soest, P., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3583–3597.  
[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vargas, S., Millán-chiu, B. E., Arvizu-medrano, S. M., Loske, A. M., & Rodríguez, R. (2017). Dynamic light scattering: A fast and reliable method to analyze bacterial growth during the lag phase. *Journal of Microbiological Methods*, *137*(April), 34–39.  
<http://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.04.004>
- Wang, X. J., Ren, N. Q., Xiang, W. S., & Guo, W. Q. (2007). Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. *International Journal of Hydrogen Energy*, *32*, 748–754.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.003>
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S., & Wyman, C. E. (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, *2*(4), 421–450.  
<http://doi.org/10.4155/bfs.11.116>
- Yeo, H. (2016). *The Effects of Furfural on Biological Hydrogen Production in Batch and Microbial Electrolysis Cell. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 4209*. The University of Western Ontario.
- Zeb, B. S., Mahmood, Q., Ping, Z., Lin, Q., Lu, H.-F., Tingtin, C., & Abbas, G. (2014). Assessment of toxicity of volatile fatty acids to *Photobacterium phosphoreum*. *Microbiology*, *83*(5), 510–515.  
<http://doi.org/10.1134/S0026261714050294>
- Zhao, Y., Zhang, S., & Chen, J. (2015). Mechanisms of sequential dissolution and hydrolysis for lignocellulosic waste using a multilevel hydrothermal process. *Chemical Engineering Journal*, *273*, 37–45.  
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.042>
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, *42*(1), 35–53. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>