



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL-AGUA

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DE UN PROCESO
DE BIORREFINERÍA

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

PRESENTA:
MARTÍN DARÍO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

TUTOR
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ
UNIDAD ACADÉMICA JURQUILLA-INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez
Secretario: Dr. Juan Manuel Morgan Sagastume
1^{er} Vocal: Dr. Hernández Mendoza Christian Eduardo
2^{do} Vocal: Dra. Idania Valdéz Vázquez
3^{er} Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis: Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México

Este proyecto se realizó bajo el apoyo financiero del Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT a través del proyecto 249564 Clúster de Biocombustibles Líquidos para el Autotransporte.

TUTOR DE TESIS:
Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA



Índice

1. Introducción.....	7
2. Antecedentes.....	8
2.1. Energía.....	8
2.2. Bioenergía.....	10
2.3. Generación de residuos en el proceso de producción de bioetanol lignocelulósico.....	11
2.4. Digestión anaerobia.....	14
2.4.1. Configuraciones de la digestión anaerobia.....	17
2.4.2. Inhibición en la digestión anaerobia.....	19
2.5. Digestión anaerobia en termofilia e hipertermofilia.....	21
3. Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	22
3.1. Justificación.....	22
3.2. Hipótesis.....	22
3.3. Objetivos.....	23
3.3.1. General.....	23
3.3.2. Particular.....	23
4. Metodología.....	23
4.1. Estrategia Experimental.....	23
4.2. Residuos Lignocelulósicos.....	24
4.3. Fase acidogénica.....	26
4.4. Determinación del tiempo de operación.....	28
4.5. Evaluación de inhibición por furfural.....	28
4.6. Arranque planta piloto.....	30
5. Análisis y discusión de resultados.....	32
5.1. Caracterización.....	32
5.2. Toxicidad de furfural en el proceso de digestión anaerobia.....	34
5.3. Pruebas de potencial bioquímico de metano de los distintos residuos lignocelulósicos.....	36
5.3.1. Pruebas de potencial bioquímico de metano en mesofilia y termofilia 40	
5.4. Estudio de la Etapa Acidogénica escala laboratorio.....	43
5.4.1. Condición termófila.....	45
5.4.2. Estudio de la Etapa Acidogénica en hipertermofilia.....	47
5.5. Puesta en Marcha de la Planta Piloto.....	52
6. Conclusiones.....	55
7. Referencias.....	56



Índice de Figuras, Gráficas y Tablas

Figura 2.1.1 Estimación de producción de energía a nivel global en 2018.....	9
Figura 2.1.2 Producción de energía primaria en México 2016.....	9
Figura 2.3.1 Proceso y residuos generados de la producción de etanol 2G.....	12
Figura 2.4.1 Etapas de la digestión anaerobia.....	15
Figura 2.4.1.1 Separación en dos etapas de la digestión anaerobia.....	18
Figura 4.2.1 Material lignocelulósico de estudio.....	24
Figura 4.3.1 Reactor CSTR InforsHT 13L utilizado para la aclimatación de microorganismos nativos del efluente vitivinícola blanco a condiciones hipertermófilas.....	25
Figura 4.5.1 Sistema automático de pruebas de potencial bioquímico de metano (AMPTS II) Bioprocess Control.....	27
Figura 4.5.1 Diagrama de flujo e instrumentación de planta piloto.....	29
Figura 4.5.2 Planta piloto reactor acidogénico CSTR, tanque de igualación y reactor metanogénico UASB.....	30
Figura 5.2.1 Prueba de inhibición con furfural en lodo granular anaerobio mesófilo.....	33
Figura 5.3.1 Resultados experimentales de los cuatro materiales lignocelulósicos (A) bagazo de agave, (B) bagazo de caña, (C) paja de trigo y (D) rastrojo de maíz en distintas fracciones dos sólidas (sólido y sólido lavado) y líquida (lixiviado).....	39
Figura 5.3.1.1 Resultados experimentales de pruebas de potencial bioquímico de metano en mesofilia (A) y termofilia (B) para bagazo de caña.....	42
Figura 5.4.1 Esquema de rutas metabólicas acidogénicas.....	45
Figura 5.4.1.1 Producción de ácidos grasos volátiles en condiciones de 45°C.....	46
Figura 5.4.1.2 Producción de ácidos grasos volátiles en condiciones de 55°C.....	47
Figura 5.4.2.1 Producción de solventes a distintos tiempos de operación	48
Figura 5.4.2.2 Producción de ácido acético a distintos tiempos de operación.....	49
Figura 5.4.2.3 Producción de ácidos grasos volátiles a distintos tiempos de operación.....	49
Figura 5.4.2.4 Producción de solventes empleando distintos sustratos a 1d de tiempo de operación.....	50
Figura 5.4.2.5 Producción de ácido acético empleando distintos sustratos a 1d de tiempo de operación.....	51
Figura 5.4.2.6 Producción de ácidos grasos volátiles empleando distintos sustratos a 1d de tiempo de operación.....	51
Figura 5.5.1 Generación de ácidos grasos volátiles en reactor piloto CSTR.....	53
Figura 5.5.3 Degradación de materia orgánica en DQOs en el reactor piloto metanogénico UASB.....	54



Figura 5.5.2 Producción de biogas producido en el reactor piloto metanogénico UASB.....54

Tabla 2.4.2.1 Impacto del furfural sobre la digestión anaerobia.....20

Tabla 4.3.1 Condiciones de operación de fase acidogénica.....25

Tabla 4.3.2 Descripción del medio anaerobio utilizado.....26

Tabla 5.1.1 Caracterización de los cuatro materiales lignocelulósicos empleados.31

Tabla 5.1.2 Caracterización de efluentes vitivinícolas.....32

Tabla 5.2.1 Resultados de estudio de inhibición de furfural.....34

Tabla 5.3.1 Rendimientos experimentales de los cuatro materiales lignocelulósicos en sus fracciones sólidas y líquida.....40

Tabla 5.3.1.1 Rendimiento de producción de metano en mesofilia y termofilia....43

Tabla 5.3.1.2 Velocidad de flujo máxima de producción de metano en bagazo de caña en mesofilia y termofilia.....43

Tabla 5.5.1 Resultados de mediciones operacionales del reactor piloto metanogénico UASB.....55

Ecuación 4.5.1 Rendimiento de Metano..... 29

Ecuación 4.5.2 Determinación de porcentaje de inhibición o estimulación 29

Ecuación 4.6.1 Determinación del parámetro alfa.....31



AGRADACIMIENTOS

Por este medio quisiera extender mi más honesto agradecimiento a mi familia, mi papá, mi mamá y mi hermano por el continuo apoyo y el coraje que ellos me brindaron hacia mi preparación académica y por hacer esta meta posible. A mi pareja que su compañía, sus visitas y su admiración que me hicieron ser un estudiante dedicado y disciplinado para poder vencer cualquier adversidad presente en el transcurso de este proyecto.

También quiero agradecer a mi tutor Dr. Germán Buitrón Méndez, por su asesoría, su guía y compañía en el transcurso de mi preparación para la obtención del grado de maestría en la Unidad Académica Juriquilla, así como su motivación y apoyo que me brindo ante los problemas que se presentaron académicamente y personalmente.

Otras personas con las que estoy agradecido es la Dra. Ivonne Figueroa y el Dr. Juan Carlos por el apoyo en la experimentación, la guía y enseñanza de los estudios analíticos realizados en este proyecto.

A mis amigos y amigas, por las salidas, la escucha y la asistencia en mis estudios, así como los ánimos de seguir adelante, mis compañeros de generación y compañeros de la Unidad Académica Juriquilla por la convivencia y distracciones permitiéndome conocerlos y aprender de ellos además de ampliar mi círculo social, de igual forma mis compañeros del Instituto de Ingeniería en campus Ciudad Universitaria.

Un agradecimiento al apoyo otorgado del Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT a través del proyecto 249564 Clúster de Biocombustibles Líquidos para el Autotransporte, así como también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría.

Finalmente, a la maestra Gloria Moreno, al maestro Jaime Pérez y al Licenciado Ángel Hernández por su asistencia técnica en el laboratorio y cómputo, así como todos los comentarios de apoyo durante los momentos de incertidumbre.



1. Introducción

La digestión anaerobia es un proceso biotecnológico sustentable, que nos permite la producción de biogás, a partir de residuos que contienen materia orgánica, como las aguas residuales industriales, desechos alimenticios, estiércol de animal, lodos de depuración, la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales, entre otros.

Este proceso es una alternativa para la producción de energía proveniente de fuentes renovables, contribuyendo a la disminución del uso de energía derivada de fuentes no-renovables, debido a la limitación del recurso, a la reducción de los gases de efecto invernadero y afectaciones al medio ambiente. Otra contribución importante del proceso de digestión anaerobia es sumar bioenergía al aumento en la demanda energética relacionada directamente con el incremento de la riqueza y la población a nivel mundial.

La digestión anaerobia se basa en la descomposición del material biodegradable mediante un consorcio de microorganismos; principalmente de bacterias y arqueas, que en ausencia de oxígeno y produciendo biogás, puede ser utilizado después de su purificación para la generación combinada de calor y electricidad, combustible de transporte o como suministro a una red de gas natural.

Este proceso puede llevarse a cabo en distintas configuraciones (una o dos etapas). Se ha encontrado que en el proceso existe un mayor control y estabilidad del proceso ayudando a una mayor producción de metano debido a que la relación que existe entre la producción y el consumo de ácidos grasos volátiles. Además de las configuraciones, un parámetro que se puede variar es la temperatura del proceso, mesofilia (35-47 °C), termofilia (48-57 °C) e hipertermofilia (65-90 °C), esta variación nos permite aumentar la velocidad de reacción y la disminución del tiempo de retención hidráulico.

Hoy en día, los procesos de una y dos etapas a distintas condiciones de temperatura han sido estudiadas para realizar la digestión anaerobia. Sin embargo, el aumento de temperatura nos permitirá una mayor solubilidad y degradación de los componentes sólidos presentes en los residuos a tratar a demás de haber pocos estudios realizados a temperaturas extremas. La intención de este trabajo es realizar un estudio del proceso de digestión anaerobia en dos etapas en condiciones extremas de temperatura, hipertermofilia (70 °C) en la etapa acidogénica y termofilia (55°C) para la etapa metanogénica a partir de residuos generados del proceso de producción de bioetanol con residuos lignocelulósicos.

Los subprocesos se realizaron en dos biorreactores distintos, permitiéndonos separar y acondicionar los distintos consorcios de microorganismos involucrados en los subprocesos, y así determinar los tiempos de retención hidráulicas, y verificar el aumento en la velocidad de conversión de la materia orgánica a metano.



2. Antecedentes.

2.1. Energía.

Actualmente, los combustibles fósiles son la principal fuente de energía a nivel mundial. La fuerte dependencia global de este recurso tiene efectos adversos en el ambiente y en los seres humanos, y disminuye la seguridad energética: genera altas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y otras emisiones contaminantes por la combustión de gas natural, carbón y derivados del petróleo, además de accidentes y derrames de petróleo durante su extracción, transporte o refinación, entre otros problemas.

El problema del cambio climático ha llegado a tal magnitud que los gobiernos han propuesto como estrategia global la eliminación del uso de los combustibles fósiles a finales del siglo XXI. Esto implica una transición energética radical, donde una parte crucial corresponde a las fuentes renovables de energía, y dentro de ellas, a la bioenergía (García-Bustamante y Masera-Cerutti, 2016).

A pesar de la rápida expansión en la producción y capacidad de energía renovable, particularmente en energía solar fotovoltaica y energía eólica, los combustibles fósiles continúan conformando el principal energético primario a nivel mundial.

A partir de 2016, las energías renovables modernas representan aproximadamente el 10.4 %, la mayor proporción de las energías renovables modernas es la producción de electricidad con 5.4 %, de esta producción la mayoría es generada mediante energía hidroeléctrica con el 3.7 % seguido por la energía térmica con un estimado del 4.1 % y finalmente los biocombustibles de transporte con 0.9 %. El uso tradicional de la biomasa, es principalmente para la cocción y calentamiento en países en desarrollo, proporcionando un 7.8 % adicional (REN21, 2018).

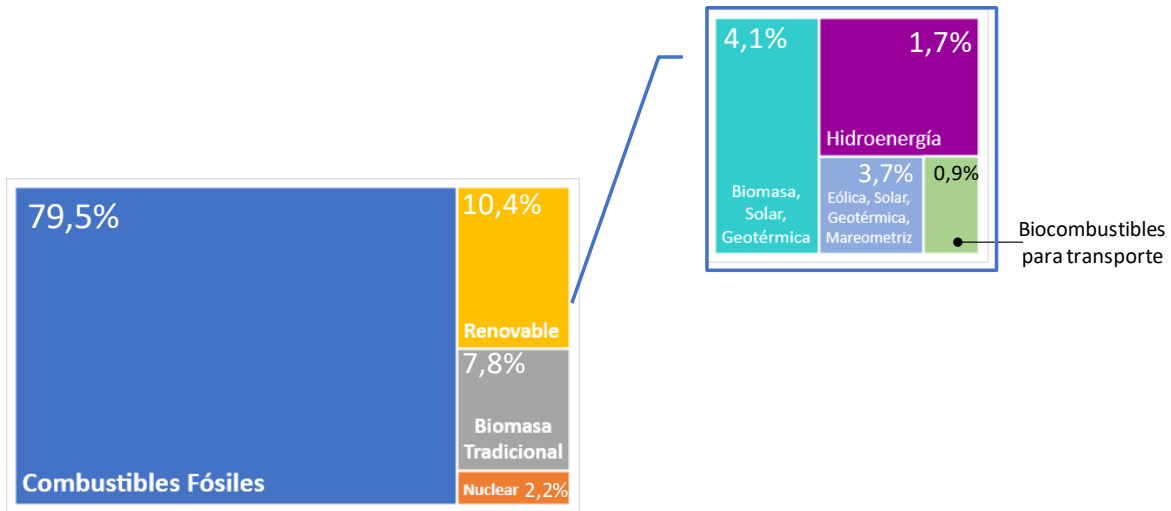


Figura 2.1.1 Estimación de producción de energía a nivel global en 2018.

En México, la producción de energía primaria tiene como principal energético primario el petróleo con un 62.6 %, seguido por el gas natural 23.1 %, las fuentes renovables 8.4%, el carbón 3.3 % y finalmente la nuclear y los condensados con 1.4 % y 1.1 %.

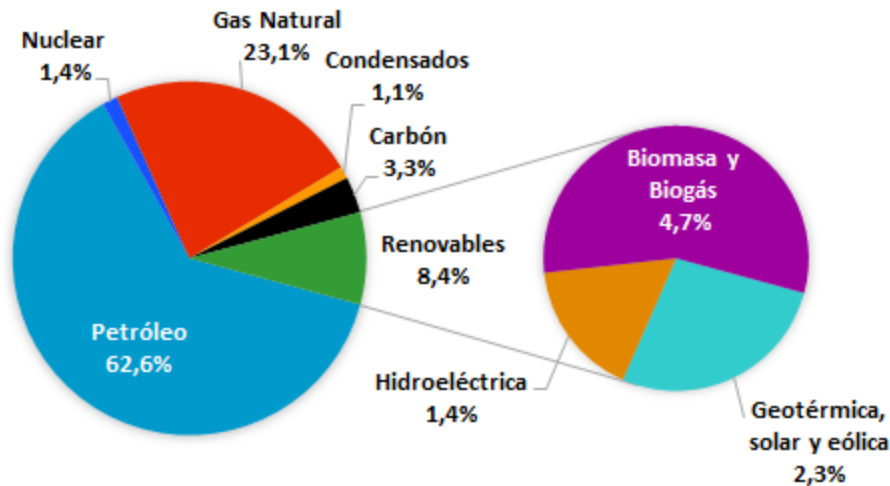


Figura 2.1.2 Producción de energía primaria en México 2016.

Dentro de las fuentes renovables los bioenergéticos; la producción de biogás y la biomasa, que está integrada por bagazo de caña y leña, mostraron un incremento de 2.4 % y 0.51 % respecto al año 2015. La biomasa tiene como principal uso generación de calor y electricidad en el caso de bagazo de caña de azúcar, dentro de los propios ingenios azucareros, mientras que la leña se utiliza de forma directa en el sector residencial para la cocción de alimentos y calefacción.



El biogás producido de la digestión anaerobia proviene del gas de relleno sanitario, de lodos de alcantarillado y estiércol de animal (SENER, 2016).

Para lograr transitar a un sistema energético que no dependa de los combustibles fósiles se requieren distintas acciones coordinadas que incluyen cambiar los patrones de los usos finales de la energía, aumentar la eficiencia energética, cambiar los hábitos de consumo, y utilizar fuentes de energía renovable como la solar, eólica, geotérmica, mareomotriz y la bioenergía (Chu & Majumdar, 2012)

2.2. Bioenergía.

Biomasa -material biológico vivo y desechos de animales- han sido utilizados desde la historia temprana para cocinar y calentar espacios donde los seres humanos viven y trabajan. Hoy en día, la biomasa tiene un rol más amplio en el consumo de energía global. La bioenergía -energía producida a partir de la biomasa- es una solución prometedora para los desafíos ambientales y un impulsor del desarrollo económico desde los niveles locales hasta los globales (Coleman y Stanfurt, 2006; Kleinschmidt, 2007).

La bioenergía es una forma de energía renovable porque la energía contenida en la biomasa es energía del sol capturada a través de un proceso natural como la fotosíntesis. Siempre la cantidad de biomasa utilizada requiere ser igual o menor a la cantidad que puede volver a crecer. Las formas de bioenergía incluyen energía de biomasa, calor y combustibles sólidos, líquidos y gaseosos. De estas formas de bioenergía sus posibles usos son aplicaciones industriales, residenciales y comerciales.

La energía de biomasa puede ser empleada para la generación de electricidad a partir de su combustión, ya sea sola o en combinación con carbón, gas natural u otro combustible. La mayoría de las plantas de energía de biomasa son sistemas de combustión directa donde las materias primas de biomasa se queman en una caldera para producir vapor a alta presión que sirven para operar turbinas conectadas a generadores eléctricos.

El calentamiento y la refrigeración, (energía térmica) también pueden ser originadas mediante el uso final de la energía de biomasa y de los procesos de conversión del biocombustible en forma de calor y energía. La combinación de calor y energía, también conocida como cogeneración, es la producción simultánea de electricidad y calor a partir de una única fuente de combustible.



Los biocombustibles, en el caso de los sólidos se usan generalmente para calentar espacios a través de la combustión. Los combustibles líquidos y gaseosos se producen por fermentación, gasificación, pirólisis y torrefacción (Williams, et. al., 2015).

El bioetanol y el biodiesel son los combustibles líquidos de mayor interés dentro de los biocombustibles líquidos. Los biocombustibles producidos a partir de aceites, azúcares y almidones provenientes de cultivos alimenticios se conocen como *biocombustibles de primera generación*. Los biocombustibles producidos a partir de cultivos no alimenticios, como hierbas perennes, material leñoso, residuos agrícola y forestal se denominan *biocombustibles de segunda generación*. Los biocombustibles provenientes de las algas son llamadas *biocombustibles de tercera generación* (Goh y Lee, 2010; Lee y Lavoie, 2013).

El biogás y el biohidrógeno son los biocombustibles gaseosos de principal importancia, el biogás es producido a partir de residuos líquidos, sólidos y biomasa, mediante la digestión anaerobia y puede ser utilizado para la producción de energía eléctrica y calor, después de su purificación como combustible automotriz y sustituto del gas natural (Weiland, 2010). La composición del biogás depende del tipo de material que se lleve al proceso de digestión anaerobia y del método de conducción del proceso, por lo general es como sigue: Metano (50-75 %), dióxido de carbono (25-45 %), sulfuro de hidrógeno (0-1 %), hidrógeno (0-1 %), monóxido de carbono (0-2 %) y agua (2-7 %) (Graaf y Fendler, 2010). Por otro lado, la tecnología para la producción de biohidrógeno a partir de los mismos sustratos se encuentra aún en etapa de desarrollo.

2.3. Generación de residuos en el proceso de producción de bioetanol lignocelulósico.

Si bien el almidón del maíz y el azúcar de caña son las principales materias primas para la producción de bioetanol, el uso de estos cultivos para la producción de biocombustibles se ve limitado por la disponibilidad de tierras agrícolas, recursos hídricos y seguridad alimentaria (Takara, et. al., 2012).

El uso de material lignocelulósico para la producción de etanol incluye biomasa herbácea (césped, hierba) y leñosa (madera de conífera o madera de árboles), como también desechos agroindustriales (bagazos, vainas, y/o cáscara de arroz, paja de trigo), los biocombustibles lignocelulósicos presentan un mejor rendimiento energético que los biocombustibles producidos a partir de cultivos basados en alimentos (Taylor, 2008). Además de haber una mayor disponibilidad de biomasa lignocelulósica lo que permite la producción a gran escala de etanol, teniendo el potencial de remplazar en mayor cantidad la importación de combustibles fósiles.

Además, cuando las eficiencias de producción son altas y la producción y uso de etanol como combustible provienen de biomasa nos permiten la reducción de gases de efecto invernadero (Wilkie, et. al., 2000).

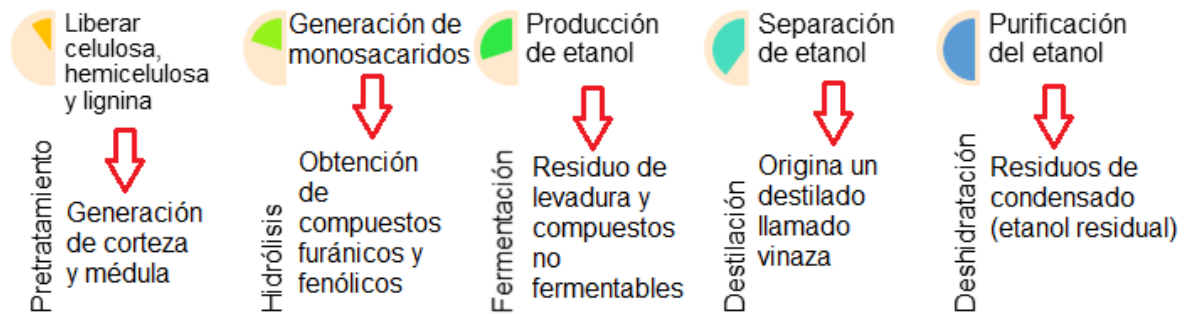


Figura 2.3.1 Proceso y Residuos generados de la producción de etanol 2G

El etanol puede ser utilizado como elevador de octanaje y combustible líquido. Estas aplicaciones han recibido gran atención como resultado de recientes investigaciones del éter metil ter-butílico (**MTBE**) como contaminante en abastecimientos de agua potable, como el **MBTE** es un aditivo de las gasolinas este puede ser completamente sustituido por etanol (Torry-Smith, et. al., 2003), pero la producción de etanol lleva consigo la generación de residuos provenientes de los distintos procesos utilizados (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) los cuales pueden ser considerados como contaminantes potenciales (Callander, et. al., 1986; Sheehan y Greenfield, 1980). Uno de los contaminantes de mayor volumen es la vinaza ya que arriba de 20 L de este residuo puede ser generado por cada litro de etanol producido (van Haadel y Catunda, 1994), por lo tanto, para poder calificar la producción de etanol como un proceso de **energía limpia** debe considerarse la utilización y tratamiento de los residuos producidos.

La biomasa lignocelulósica tiene una estructura y compuestos químicos complejos, haciéndola difícil de romper a azúcares fermentables de cinco y seis carbonos. El pretratamiento puede incluir un proceso mecánico (molienda o trituración) seguido de un proceso como explosión de vapor (Bouchard, et. al., 1990; Heitz, et. al., 1991), explosión de vapor en presencia de ácido (Clark y Mackie, 1987; Clark, et. al., 1989), explosión supercrítica mediante dióxido de carbono (Zheng, et. al., 1988), explosión de amonio congelado (AFEX), deslignificación por solventes como etanol butanol o ácido acético, y procesos térmico-mecánicos (Wyman y Goodman, 1993; von Sivers y Zacchi, 1996). El proceso de pretratamiento es requerido para liberar celulosa y hemicelulosa además de incrementar la vulnerabilidad de la biomasa pretratada a una hidrólisis enzimática.



La hidrólisis del material lignocelulósico es alcanzada mediante reacciones de hidrólisis enzimática, con ácido concentrado (Goldstein y Easter, 1992), con ácido diluido, o combinación de estas (Grethlein y Dill, 1993). En la hidrólisis enzimática, se extrae las enzimas celulasas obtenidas de organismos celulolíticos y son añadidas a la materia prima. En la hidrólisis ácida, el material lignocelulósico es expuesto a ácidos concentrados o diluido (normalmente ácido sulfúrico) a elevadas temperaturas y presiones por un periodo de tiempo específico para liberar la celulosa y la lignina e hidrolizar la celulosa a glucosa (Mackie, et. al., 1983). Las consecuencias del uso de enzimas es el costo comparado con los ácidos, pero tiene como ventaja evitar las reacciones laterales y por lo tanto ausencia de monosacáridos no fermentables, al contrario de la hidrólisis ácida debido a una pérdida de glucosa a compuestos furánicos como hidroximetil furfural y xilosa a furfural (Wyman y Goodman, 1993).

La fracción de lignina de la biomasa no se ve afectada durante la mayoría de los pretratamientos bioquímicos, excepto en los tratamientos alcalinos y oxidantes, ya que, en los pretratamientos alcalinos, la mayoría de la lignina se solubiliza y se remueve antes de la fermentación. En algunos casos, los pretratamientos a altas temperaturas, la lignina es degradada a compuestos fenólicos libres afectando su incorporación a las otras operaciones unitarias (Takara et al., 2012) y puede recuperarse después de la separación de líquidos seguida de la fermentación.

En un proceso de fermentación en lote convencional, un inóculo, como un cultivo de levadura a menudo cerca de 10 % del volumen del fermentador se le agrega los carbohidratos de la hidrólisis y se deja fermentar hasta completarse la producción de etanol, **generalmente en menos dos días** (ASTM, 1997). El volumen de vinaza obtenido es inversamente proporcional a la concentración final de etanol en la fermentación, uno de los obstáculos significativos en el proceso de fermentación es el efecto inhibitorio de los compuestos derivados de la lignina y carbohidratos formados durante el pretratamiento del material lignocelulósico. Los inhibidores formados a partir de la destrucción de la lignina constituyen una amplia variedad de compuestos aromáticos y poli-aromáticos con una amplia gama de sustituyentes. Los otros compuestos típicos encontrados en los hidrolizados lignocelulósicos son los furfurales a partir de la degradación de azúcares.

Después de la fermentación, el efluente contiene etanol que es bombeado a un proceso de destilación continuo donde el vapor es utilizado para calentar el efluente a su punto de ebullición en la columna de stripper (ASTM, 1997). El vapor de etanol enriquecido pasa a través de la columna de rectificación condensando y removiendo de la cima del rectificador alrededor del 95% de etanol. El destilado conocido como vinaza cae al **fondo de columna stripper** y es bombeado a un tanque de almacenamiento, con una destilación eficiente, la vinaza contiene menos de 0.1-0.2 % de etanol.



Para poder mezclar el alcohol con gasolina, el contenido de agua debe ser reducido a menor del 1 % volumen debido a que mayores cantidades de agua mezcladas con la gasolina, pueden causar un mal funcionamiento en la ignición cuando el tanque de combustible se vacía, para lograr este objetivo la remoción del agua a menos del 5 % se utiliza un proceso llamado deshidratación o secado, desafortunadamente, la separación del etanol en el agua por destilación es limitado a una pureza alrededor del 96 % debido a las propiedades azeotrópicas de la mezcla.

Juntando todos los residuos obtenidos de cada proceso un efluente típico de una biorrefinería es caracterizado por altas concentraciones de demanda química de oxígeno (DQO) entre 80-100 g/L, una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en concentraciones de 40-50 g/L, además de valores bajos de pH 3.5-5, olor fuerte y color café oscuro, el alto contenido de material orgánico, el agua residual del proceso de destilación también contiene nutrientes en forma de nitrógeno en concentraciones entre 1.66-4.2 g/L, fósforo en concentraciones entre 0.225-3.04 g/L y potasio entre 9.6-17.475 g/L lo que puede conducir a la eutrofización de cuerpos de agua (España-Gamboa et al., 2011).

2.4. Digestión anaerobia.

El proceso biotecnológico para la producción de biogás normalmente se refiere a la digestión de una variedad de residuos orgánicos, alimentos, aguas residuales, lodo de agua residual, excremento de animales o fracción orgánica de residuos municipales.

La digestión anaerobia es un bioproceso implementado para la conversión de materia orgánica a biogás en ausencia de oxígeno. Un consorcio de varios grupos de microorganismos principalmente bacterias hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas y arqueas metanogénicas que cooperan o compiten por llevar a cabo las reacciones bioquímicas en el cual pueden dividirse en cinco sucesivos y distintivos pasos (Figura 2.4.1), esto va acompañado que un proceso de mineralización parcial o completa y humificación de sustancias orgánicas (Lyberatos y Skiadas, 1999).

El metano y el dióxido de carbono son los principales productos gaseosos generados de este bioproceso, el cual denominamos biogás, pero existen otros compuestos dentro de la mezcla que varían dependiendo del material a digerirse en la siguiente composición: metano (46-65 %), dióxido de carbono (30-40 %), sulfuro de hidrógeno (0.3-3 %), amoniaco (0-1 %), humedad (0-10 %), nitrógeno (0-5 %), oxígeno (0-2 %) e hidrógeno (0-1 %) (Gould, 2015).

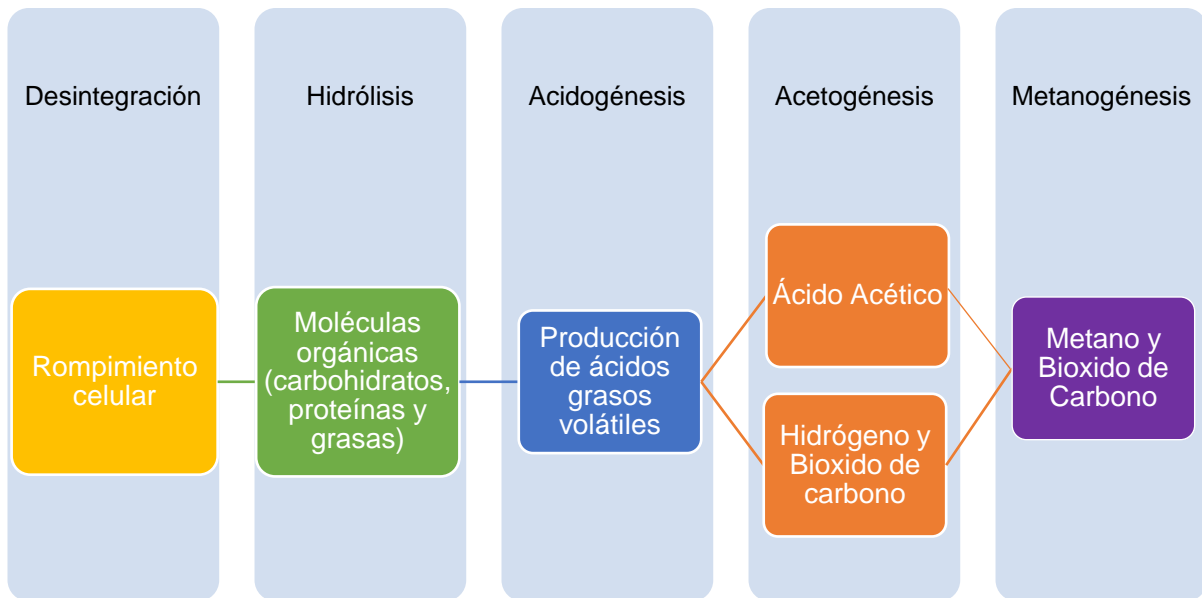


Figura 2.4.1 Etapas de la digestión anaerobia

- **Desintegración:** Involucra el rompimiento celular, el no decaimiento enzimático, separación de fases, quebrado físico por el esfuerzo cortante.
- **Hidrólisis:** Durante esta etapa, las macromoléculas de compuestos orgánicos insolubles, es decir, carbohidratos, proteínas y grasas son fraccionadas a monómeros solubles y dímeros, esto es, monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos. Esta etapa de la digestión anaerobia ocurre a través de un grupo de enzimas hidrolíticas, (amilasas, proteasas y lipasas) producidas por cepas apropiadas de bacterias hidrolíticas. La hidrólisis de polímeros difícilmente fraccionables como son celulosa y fibras de algodón, pueden ser consideradas la etapa limitante de la digestión anaerobia. Durante la digestión de residuos solo el 50 % de los compuestos orgánicos son polímeros biodegradables a sus monómeros por enzimas extracelulares, la parte restante de los compuestos, permanecen en la primera etapa mientras siguen siendo las enzimas las que participan en la biodegradación (Conrad, 1999; Parawira, et. al., 2008).

La rapidez de la etapa de hidrólisis depende de muchos parámetros: tamaño de partícula, pH, producción de enzimas, difusión y adsorción de enzimas en las partículas de los desechos sujetos a los procesos de degradación. La hidrólisis se lleva a cabo por un grupo de bacterias facultativas (*Streptococcus enterobacterium*) (Bryant, 1979; Smith, 1966).



- **Acidogénesis:** Durante esta etapa, las bacterias acidificantes convierten las sustancias químicas solubles, incluyendo los productos de la hidrólisis a ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, propiónico, butírico, pentanóico), alcoholes (metanol, etanol), aldehídos, dióxido de carbono e hidrógeno. A partir de la descomposición de proteínas, surgen aminoácidos y péptidos, que pueden ser una fuente de energía para los microorganismos anaerobios.

La acidogénesis puede ser dividida en dos tipos:

- **Hidrogenación.** La ruta básica de transformación ocurre a través de ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, mientras que otros productos acidogénicos juegan un papel poco significativo. Como resultado de estas transformaciones, metanógenos pueden consumir directamente los nuevos productos como sustrato y fuente de energía.
- **Deshidrogenación.** Una acumulación de electrones por compuestos como ácido láctico, etanol, ácido propiónico, ácido butírico y ácidos grasos volátiles más largos es la respuesta de las bacterias a un incremento de la concentración de hidrógeno en la solución. Los nuevos productos no pueden ser consumidos directamente por las bacterias metanogénicas y deben ser convertidas por bacterias obligadas a producir hidrogeno en el proceso de acetogénesis.

Las bacterias en la fase ácida pertenecen a anaerobias facultativas usado el oxígeno introducido accidentalmente dentro del proceso, creando las condiciones favorables para el desarrollo de anaerobias estrictas de los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mirococcus* o *Flavobacterium* (Ziemiński & Fraç, 2012).

- **Acetogénesis:** En esta etapa, las bacterias acetogénicas que incluyen el género *Syntrophomonas* y *Syntrophobacter* convierten los productos de la fase ácida en ácido acético e hidrógeno, los cuales pueden ser utilizados por las bacterias metanogénicas (Schink, 1997). Las bacterias *Methanobacterium Suboxydans* puede descomponer ácido pentanóico a ácido propiónico, donde *Methanobacterium Propionicum* puede descomponer el ácido propiónico a ácido acético. Como resultado de la acetogénesis, liberando hidrógeno, el cual puede presentar efecto tóxico en los microorganismos presentes en el proceso. Por ello es necesaria una simbiosis entre bacterias acetogénicas con bacterias metanoautotróficas usando hidrógeno como sustrato (Schink, 1997; De Bok, et. al., 2005).
- **Metanogénesis:** Esta etapa consiste en la producción de metano por bacterias y arqueas metanogénicas. El metano en esta etapa de proceso es producido a partir de sustratos de las etapas previas, como ácido acético, hidrógeno, dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilamina o dimetil

sulfuro. La mayoría de metano proviene del ácido acético y solamente el 30% proviene de la reducción del dióxido de carbono y la oxidación del hidrógeno (Ziemiński & Frąç, 2012).

2.4.1. Configuraciones de la digestión anaerobia

Debido a que el proceso de digestión anaerobia nos permite la reducción de residuos y la producción de energía renovable, se ha logrado la digestión a partir de desechos orgánicos provenientes de distintos orígenes, como fracciones de desechos municipales (De Gioannis, et. al., 2013) celulosa (Ratti, et. al., 2013), agua residual doméstica (Van Ginkel, et. al., 2005), lípidos extraídos de microalga (Yang, et. al., 2011) y agua residual de lácteas (Jo, et. al., 2008). La variedad en composición y las características del material en desechos orgánicos y aguas residuales son un reto en la investigación por que una variedad de sustratos pueden ser utilizados por diferentes especies de microorganismos (Whang, et. al., 2006; Rafrafi, et. al., 2013), de acuerdo con los datos de la literatura, la configuración en dos etapas de la digestión anaerobia parece ser más efectiva para desechos de la industria alimentaria (Malina y Pohland, 1992; McDougall, et. al., 1993), y una de las desventajas del tratamiento de aguas residuales mediante el proceso de digestión anaerobia en un etapa es el requerimiento de un gran tamaño de biorreactor debido a las bajas tasas de producción, por lo tanto, una opción técnica interesante para mejorar la producción de bigas a partir de agua residual es el uso de un proceso en dos etapas (Intanoo, et. al., 2014).

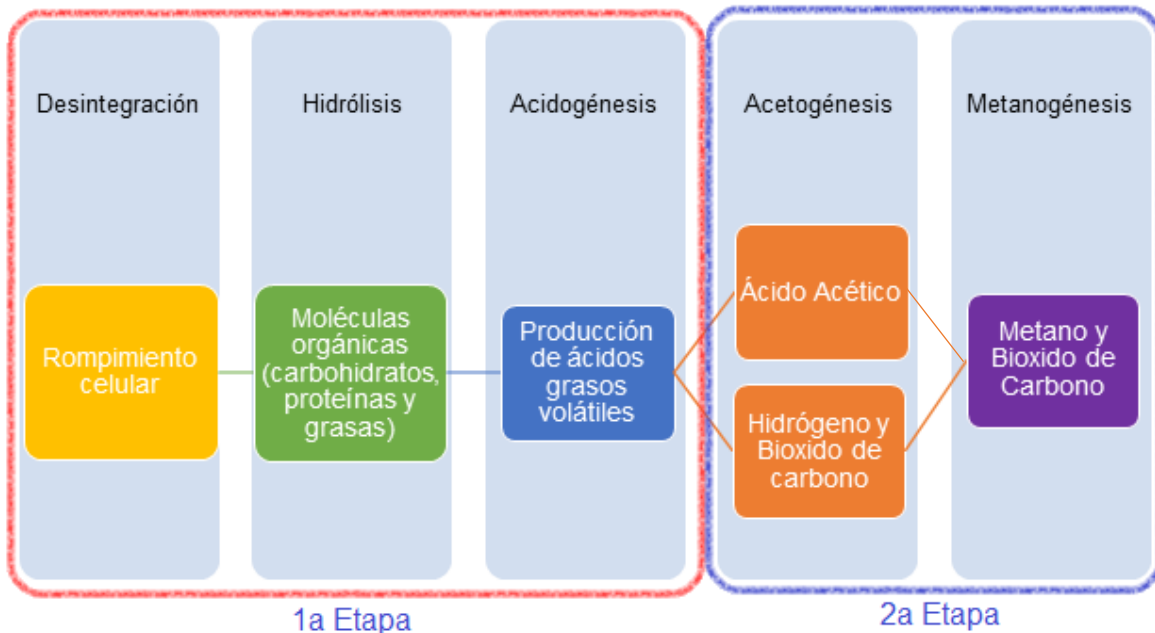


Figura 2.4.1.1 Separación en dos etapas de la digestión anaerobia

La separación en etapas permite la selección de condiciones óptimas incluyendo la selección y enriquecimiento de los distintos microorganismos (Zhang y Noike, 1991), para ambos procesos hidrólisis/acidogénesis y acetogénesis/metanogénesis (Figura 2.4.1.1). Ya que medida, que la fermentación hidrolítica/acidogénica avanza a una velocidad mucho mayor que la acetogénesis/metanogénesis, aumentando la eficiencia global de degradación que en un fermentador de una sola etapa (Kubler y Schertler, 1994) y ya que la primera etapa se lleva a cabo en condiciones ácidas en un reactor separado, nos beneficia en la reducción de los efectos de cambio de pH (Anderson, et. al., 1994). Sin embargo, la producción en exceso de ácidos grasos volátiles, especialmente de ácido acético, puede causar disturbios en la operación normal del reactor y los iones hidronio producidos por la biomasa deben ser unidos a los iones carbonato, liberando agua y bióxido de carbono CO_2 (Blonskaja, et. al., 2003).

Una de las ventajas de la separación de etapa es que los microorganismos metanogénicos son más activos que los sistemas con configuración de una sola etapa (Cohen, et. al., 1980; Lettinga, et. al., 1993), otra ventaja del proceso en dos etapas es una mayor tasa y rendimiento en la producción de metano debido a un mejor balance entre la rapidez de consumo y producción de ácidos grasos volátiles comparados con las de una sola etapa (Intanoo et al., 2014).

Sin embargo, el principal punto de interés está en la optimización de los reactores de hidrógeno y metano individualmente (Antonopoulou, et. al., 2008; Venetsaneas,



et. al., 2009), por lo que se requiere optimizar el sistema completo para una mayor producción energética, además de investigar los mecanismos involucrados en el proceso en dos etapas y las estructuras de las comunidades microbianas (Luo, et. al., 2011).

2.4.2. Inhibición en la digestión anaerobia

La producción de biocombustibles a partir de la conversión de sustratos lignocelulósicos ha tomado alta consideración debido a su alta composición en carbohidratos, su abundancia y su regeneración, además de no entrar en competencia con los alimentos. Entre los biocombustibles renovables, la producción de biohidrógeno y metano a partir de la fermentación oscura y digestión anaerobia cuando son operadas con cultivos mixtos, representan rutas prometedoras para la valoración de la biomasa lignocelulósica (Monlau, et al., 2014).

Uno de los retos en el uso de biomasa lignocelulósica es su estructura natural recalcitrante debido a barreras fisicoquímicas las cuales inherentemente proveen resistencia y protección contra pesticidas y patógenos, pero también confiere resistencia a la hidrólisis para una mayor conversión mediante bacterias fermentativas anaerobias (Molau, et. al., 2012; Vancov, et. al., 2012)

La composición de lignina y su contenido, así como el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, la estructura de la hemicelulosa, el contenido de pectina, la accesibilidad del área superficial y volumen del poro han sido identificados como los principales parámetros que influyen en la biodegradabilidad (Molau, et. al., 2012; Molau, et. al., 2013; Taherzadeh y Karimi, 2008).

Los compuestos fenólicos y furánicos fueron reportados como inhibidores de la hidrólisis enzimática de varias bacterias fermentativas en bioprocesos de cultivos puros operados para la producción de etanol, biohidrógeno, xilitol, butanol y lípidos (Cao, et. al., 2009; Delgenes, et. al., 1996; Ezeji, et. al., 2007; Ho, et. al., 2010; Kelly, et. al., 2008; Ximenes, et. al., 2010). El efecto de los ácidos débiles principalmente el ácido acético derivado del grupo aceto de la hemicelulosa, al ser un metabolito intermediario en la digestión anaerobia altas concentraciones de este ácido generado en los hidrolizados lignocelulósicos pueden ser fácilmente consumidas por el consorcio anaerobio.

Los compuestos furánicos son conocidos por tener un efecto perjudicial sobre los microorganismos mediante la inhibición del comportamiento celular, induciendo un daño en el ADN e inhibir varias enzimas de la glucólisis. Distintos microorganismos tienen la habilidad de adaptar y crecer en presencia de compuestos tóxicos y pueden usar diferentes mecanismos de adaptación para evitar o reparar daños causados por los compuestos tóxicos.



La degradación del furfural se produce a través del ácido 2-furóico, que se metaboliza al intermediario 2-oxoglutarato. Bajo condiciones anaerobias, algunas bacterias pueden convertir el furfural y el 5-hidroximetil furfural a compuestos menos inhibitorios como furfural alcohol y alcoholes. Los compuestos furánicos y fenólicos pueden afectar selectivamente el crecimiento de especies individuales dentro del consorcio microbiano. Como consecuencia, pueden influir en las rutas metabólicas y en la dinámica poblacional de las bacterias.

Tabla 2.4.2.1 Impacto del furfural sobre la digestión anaerobia

Inóculo	Operación del Sistema	Sustrato	Concentración de furfural	Resultados Y_{CH_4}	Referencia
Planta de tratamiento de Aguas Residuales	Lote, 37 °C, 25 d, 6 g SV/L	Celulosa	0 g/L	352 mL/gSV	(Badshah, 2012)
			1 g/L	345 mL/gSV	
			2 g/L	384 mL/gSV	
			4 g/L	338 mL/gSV	
Lodo Granular	Lote, 37°C, 42d, 5g SV/d	-	2 g/L	430 mL/gSV $\lambda=4$ d	(Barakat, et. al., 2012)
Lodo Granular	Lote, 37 °C, 20 d, 5 g SV/L	Xilosa	0 g/L 1 g/L	300 mL/gSV 300 mL/gSV $\lambda=1$ d	
Planta de tratamiento de excreta de porcino y residuos de comida	Lote, 37 °C, 18 d, 6 gSV/L	Hidrolizado de Bagazo de Caña de Azúcar (2g H ₂ SO ₄ /100gST, 121°C, 15min)	1.31g/L	233mL/gSV	(Badshah, et. al., 2012)



2.5. Digestión anaerobia en termofilia e hipertermofilia

La población metanogénica degradadora de glucosa fue investigada a condiciones de hipertermofilia (65-80 °C) (Tang, et. al., 2008). El metano fue producido a temperaturas arriba de 77.5 °C, mientras que la concentración de microorganismos y la producción de biogás decreció con el aumento escalado de la temperatura. A las temperaturas de 70 °C y superiores, la producción de metano a través de la ruta acetoclástica se detuvo, predominó la producción de ácido acético, por lo tanto, una fermentación en dos etapas conteniendo acidogénesis y metanogénesis por separado a distintas temperaturas es sugerido como una condición óptima para tratamiento anaerobio de aguas residuales termófilas (Evans, et, al., 2011). Otros estudios reportan, los beneficios de usar la hipertermofilia en digestión anaerobia para incrementar la producción de hidrógeno, incrementar la degradación de poliláctidos con residuos orgánicos y mejora la estabilización de la co-digestión de residuos de comida y lodo (Assawamongkholisiri, et. al., 2013; Cappelletti, et. al., 2012; Lee, et. al., 2009; Wang, et. al., 2014). Sin embargo, uno de los inconvenientes del sistema en dos etapas es su complejidad de operación y el aumento de los costos de inversión cuando se trata de sustratos fácilmente biodegradables.

La digestión anaerobia de aguas residuales de destilado de distintas materias primas como jugo de caña de azúcar, melazas de la caña de azúcar, melazas de azúcares de betabel, vino o maíz se han llevado a cabo en sistemas de una sola etapa. Sin embargo, también se han empleado procesos en dos etapas separando la hidrólisis y la acidogénesis de la acetogénesis y metanogénesis, además de las ventajas del proceso en dos etapas, el aumento de la temperatura por arriba de las condiciones mesófilas, nos sirve para una mejor desactivación de los patógenos en los procesos en dos etapas, sobre todo, cuando se combina, con una etapa hidrolítica de bajo tiempo de retención bajo temperaturas termófilas o hipertermófilas y la metanogénesis bajo condiciones termófilas o mesófilas.

La condición termófila en aguas de destilado es una opción ya que la destilación se lleva a cabo a 60-70 °C para separar el alcohol de la mezcla de fermentación, por lo tanto la vinaza será producida a esas temperaturas, y tomar ventaja del calor disponible del residuo nos permite operar el digestor anaerobio en termofilia (Tian, 2011).



3. Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1. Justificación

El proceso de producción de etanol a partir de material lignocelulósico comprende de varias etapas e inicia con la reducción de tamaño del material, un pretratamiento, hidrólisis, sacarificación y desintoxicación, fermentación, destilación y finalmente un secado. Cada una de estas operaciones generan un residuo que deben ser tratados, existen distintos tratamientos que pueden ser utilizados, pero con la intención de hacer un proceso sustentable y reducir el costo del proceso se pretende estudiar un tratamiento que nos permita la generación de un producto de valor añadido (biogás).

En este trabajo se propone el tratamiento asociado a la producción del biocombustible gaseoso (metano), mediante el proceso de digestión anaerobia en un sistema de dos etapas en condiciones extremas de temperatura: acidogénesis en hipertermofilia (70 °C) y metanogénesis en termofilia (55 °C) de los residuos generados en la etapa de reducción de tamaño y pretratamiento del material lignocelulósico, la selección de las temperaturas y la separación en dos etapas nos va a permitir una mayor solubilidad de los componentes sólidos presentes y un aumento en la velocidad de reacción en las distintas etapas, así como un mayor control del proceso evitando los problemas de acidificación y permitiéndonos también tener una mayor cantidad de materia orgánica a tratar.

La novedad de este trabajo es determinar si a las elevadas temperaturas es posible llevar a cabo el proceso acidogénico predominando la producción de ácido acético, empleando microbiota endógena de un efluente vitivinícola blanco, así como en la etapa metanogénica determinar el potenciales bioquímicos de metano de los residuo lignocelulósico (bagazo de caña) en mesofilia y termofilia para poder determinar el tiempo de operación y la velocidad de producción de metano en cada caso, así como saber si el compuesto inhibitorio furfural a las concentraciones presentes en los residuos presenta un efecto en el proceso de digestión anaerobia en mesofilia.

3.2. Hipótesis

El empleo de un proceso de digestión anaerobia en dos etapas una acidogénica hipertermófila (70 °C) van a tener una distribución de ácidos grasos volátiles en la que predomine el ácido acético en un menor tiempo de retención hidráulica que en las condiciones termófilas.



Mientras que en la etapa metanogénica a condiciones mesofílicas (35°C) el proceso va a ser afectado en un porcentaje de inhibición o estimulación en la producción de metano, en la etapa metanogénica en condiciones de termófila (55 °C) con el residuo de biorrefinería va a tener un aumento en la velocidad de producción de metano y una disminución del tiempo de operación del reactor comparado con mesofilia.

3.3. Objetivos

3.3.1. General

Determinar las condiciones de operación de un proceso de digestión anaerobia en un sistema a dos etapas acidogénica (hipertermófila) y metanogénica (termófila) a partir de los residuos generados de una biorrefinería productora de bioetanol 2G.

3.3.2. Particular

- Adaptar un consorcio microbiano nativo en un reactor tanque agitado completamente a condiciones hipertermófilas.
- Determinar los potenciales bioquímicos de metano empleando lodo granular mesófilo y termófilo con residuos de la biorrefinería.
- Evaluar la influencia del furfural sobre el proceso de digestión anaerobia.
- Poner en Marcha el proceso de digestión anaerobia en dos etapas a nivel planta piloto.

4. Metodología

4.1. Estrategia Experimental

La estrategia experimental que se siguió para llevar a cabo esta investigación inició con la caracterización de los residuos lignocelulósicos a estudiar paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña y bagazo de agave proveniente de un proceso hidrotérmico y un molino para la disminución del tamaño, para realizar la caracterización se inició con un proceso de extracción líquido-sólido, obteniendo las tres fracciones a estudiar el residuo sólido, el sólido lavado y el lixiviado.

Una vez obtenida la caracterización y sabiendo la cantidad de materia orgánica y la concentración de furfural presente se llevaron a cabo las pruebas de potencial bioquímico de metano evaluando el efecto inhibitorio o estimulante, así como el consumo del compuesto inhibitorio furfural empleando un rango de concentraciones



y finalmente el estudio metanogénico en los residuos lignocelulósicos en las tres fracciones obtenidas después del proceso de extracción.

Posteriormente se inició una aclimatación de microbiota endógena de efluente vitivinícola blanco a condiciones hipertermófilas mediante un proceso de pasos iniciando de 45 °C seguido de 55 °C y finalmente a 70 °C, por último se realizó un estudio preliminar sobre el tiempo de retención hidráulica en botellas serológicas a la temperatura de 70°C identificando el tiempo en el que se produce la mayor cantidad de ácido acético y finalmente con el tiempo de retención hidráulica obtenida se procedió a una prueba con los lixiviados de los residuos lignocelulósicos mencionados anteriormente.

Finalmente se llevó a cabo el arranque de una planta piloto empleando como inóculo en el reactor acidogénico la microbiota nativa durante un mes de operación identificando la distribución de los ácidos grasos y el escalamiento del sistema, mientras que para el caso del reactor metanogénico fue inoculado con lodo granular anaerobio y se procedió con distintas concentraciones de materia orgánica, analizando el parámetro α , la producción de biogás y composición de metano presente, ambos reactores en condiciones de mesofilia 35 °C, se procedió a la temperatura de mesofilia debido a que para que un inóculo sea considerado aclimatado debe de estar en esas condiciones al menos un año.

4.2. Residuos Lignocelulósicos

La fuente de los materiales lignocelulósicos, paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña y bagazo de agave provienen de un proceso que consiste en tres pasos:

- 1) Molienda con molino de cuchilla y martillos (Azteca® ET-MC1)
- 2) Cribado con una criba de ½ " de diámetro,
- 3) Pretratamiento hidrotérmico en un reactor tubular continuo con una presión a 150 psi y 180 °C, usando diferentes tiempos de residencia de 16, 34 y 54 min.

Estas operaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Futuros en Bioenergía del CIVESTAV, Guadalajara (Sanchez, y otros, 2018). El residuo procesado hidrotérmicamente (Figura 3.2.1) se caracterizó y fue empleado para el tratamiento mediante digestión anaerobia en condiciones de temperatura hipertermófila en hidrólisis-acidogénesis y producción de metano en mesofilia y termofilia,

Para los experimentos realizados en este trabajo, se inició con la caracterización de los residuos de biorrefinería. Para separar la paja, rastrojo y bagazo de los azúcares y compuestos solubles en agua se realizó un proceso de extracción sólido-líquido. Se pesaron 5 kg de cada material lignocelulósico (bagazo de agave, bagazo de

caña, rastrojo de maíz y paja de trigo) y se sumergió en 10 L agua por 24 hr en una malla posteriormente se exprimió el residuo para extraer el líquido.



Figura 3.2.1 Material Lignocelulósico de Estudio

Los residuos se caracterizaron midiendo carbohidratos (Deubois, et. al., 1956), ácidos grasos volátiles mediante cromatografía de gases (Agilent Technologies 7890B acoplado a un muestreador automático de líquidos 7693A) que nos permite la identificación y la cuantificación de los ácidos grasos de cadena de 2 a 6 carbonos, además de los solventes etanol, butanol y acetona. La cuantificación de inhibidores como furfural y 5-hidroximetil furfural se midió mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (Agilent Technologies 1260 Infinity), la glucosa y xilosa fue medida con un Analizador Bioquímico YSI 2900. La demanda química de oxígeno se determinó mediante metodología HACH con el uso de un espectrofotómetro DR2010 y sólidos volátiles y totales utilizando la metodología APHA (APHA, 2005).



4.3. Fase acidogénica

La investigación para el estudio de la etapa acidogénica se realizó en un reactor CSTR Figura en el cual se adaptó el consorcio nativo a condiciones hipertermofilia, empleando como sustrato e inóculo efluente vitivinícola blanco, los parámetros de estudio que fueron controlados son el pH mediante soluciones de HCL 3 M y NaOH 5 M a un valor de 5.5, la velocidad de agitación a 250 RPM y el calentamiento mediante una chaqueta y un termopar accesorios incluidos en el reactor.

Para mantener la alcalinidad una vez al mes se agregó 3 g/L de bicarbonato de sodio para amortiguar el medio y tener constante el valor de pH a 5.5, se agregó también los nutrientes en la alimentación en un medio mineral anaerobio sugerido por (Angelidaki et al., 2009), la cual consistió en cuatro soluciones con la composición mostrada en la Tabla distintas mezcladas en 975 mL de agua desionizada.

Tabla 4.3.2 Condiciones de fase acidogénica

Temperatura (°C)	45	50	70
pH	5.5	5.5	5.5
Agitación (RPM)	250	250	100
Inóculo	Efluente Vitivinícola Blanco		
DQOalimentada (g/L) por semana	40	35	N/A
Sistema	Reactor CSTR		Botellas

Figura 4.3.1 Reactor CSTR InforsHT 13L utilizado para la aclimatación de microorganismos nativos del efluente vitivinícola blanco a condiciones hipertermófilas (70°C)

Tabla 4.3.2 Descripción del medio anaeróbico utilizado

Solución	Composición (g/L)	Cantidad (mL)
A	NH ₄ Cl 100 NaCl 10 MgCl ₂ 6H ₂ O 10 CaCl ₂ 2H ₂ O 5	10
B	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O 200	2
D	FeCl ₂ 4H ₂ O 2 H ₃ BO ₃ 0.05 ZnCl ₂ 0.05 CuCl ₂ 2H ₂ O 0.0038 MnCl ₂ 4H ₂ O 0.05 (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O 0.05 AlCl ₃ 0.05 CoCl ₂ 6H ₂ O 0.05 NiCl ₂ 6H ₂ O 0.092 Etilendiaminetetraacetato 0.05 HCl concentrado 1mL Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O 0.1	1
E*	Biotina 2 Ácido fólico 2 Ácido pirodoxina 10 Ridoflavina 5 Hidrocloruro de tiamina 5 Cianocobalamina 0.1 Ácido nicotínico 5 Ácido p-aminobenzóico 5 Ácido lipóico 5 DL-ácido pantoténico	1

*Componentes en concentración de mg/L

La inoculación del reactor se realizó con la microbiota nativa de un efluente de vino blanco. La operación inició a una de temperatura de 45 °C, se alimentó el reactor una vez por semana con el fluente vitivinícola intercambiando semanalmente 100 mL del mismo efluente, al alcanzar el estado estacionario respecto a la producción de los ácidos grasos volátiles, se cambió la temperatura a 55 °C mediante el mismo procedimiento de alimentación.

4.4. Determinación del tiempo de operación

Se realizó un estudio preliminar para determinar la influencia del tiempo de retención hidráulico, se analizaron tres distintos tiempos 1, 3 y 5 días a la temperatura de 55°C bajo las mismas condiciones que en el estudio de la fase acidogénica, empleando botellas serológicas de 200 mL. Se utilizó como alimentación efluente vitivinícola, se utilizó 25 mL de inóculo y 150 mL de efluente vitivinícola. Una vez encontrado el tiempo de retención que produjo la mayor cantidad de ácidos grasos volátiles se elevó la temperatura a 70 °C y se realizó la prueba de fermentación en el reactor acidogénico a escala laboratorio y finalmente se realizó un estudio de la producción de ácidos grasos volátiles a los distintos sustratos lignocelulósicos.

4.5. Evaluación de inhibición por furfural

Para el estudio de inhibición por furfural y la etapa metanogénica se empleó un sistema automático de pruebas de potencial bioquímico de metano (AMPTS II) por sus siglas en inglés (Figura), con el fin de determinar la efectividad del proceso de digestión anaerobia y la biodegradabilidad del sustrato.



Figura 4.5.1 Sistema automático de pruebas de potencial bioquímico de metano (AMPTS II) Bioprocess Control.

Los ensayos de prueba de potencial bioquímico de metano de los residuos del pretratamiento se realizaron a condiciones óptimas del consorcio microbiano (Angelidaki et al., 2009) (Owen, et. al., 1979) se realizaron por triplicado, empleado



botellas de 500mL con un volumen de trabajo de 365mL. Se utilizó lodo granular anaerobio proveniente de una planta de tratamiento de aguas de cervecera. Las pruebas se llevaron a cabo condiciones de mesofilia 37 °C y el mismo lodo granular fue aclimatado a condiciones termófilas durante un año a 55 °C, para los experimentos realizados a esas condiciones.

El experimento contó con un control positivo para el caso de inhibición, una solución de carboximetilcelulosa 5 g DQO/L y en el caso del estudio de la metanogénesis una solución de glucosa 5 g DQO/L. Ambos estudios con un control endógeno, que consiste en cada frasco la concentración de lodo de 10 g ST para el estudio metanogénico y para el estudio de inhibición. Todos los experimentos se realizaron con una relación $X_0/S_0=2$, para lo cual X_0 tuvo un valor de 10 g ST en cada botella y $S_0= 5$ g DQO o ST, también se empleó la solución de nutrientes que fue preparada de acuerdo a (Angelidaki et al., 2009).

Para el estudio del efecto inhibitorio se utilizaron tres concentraciones del compuesto furfural 100 mg/L, 500 mg/L y 1 g/L y se cuantificó el rendimiento de metano, restando el metano producido por el control endógeno, Se evaluó el porcentaje de inhibición o estimulación mediante la Ecuación 4.5.1 y Ecuación 4.5.2.

Para el estudio de la etapa metanogénica se realizó empleando tres fracciones de los distintos residuos utilizados en condiciones de mesofilia mientras que en condiciones de termofilia se evaluó el residuo de bagazo de caña, la fracción sólida, el sólido lavado y la fase líquida, para el cual la fracción sólida y el sólido lavado se pesaron la cantidad de 5gST y la fase líquida una concentración de 5gDQO/L para lo cual se cuantificó el rendimiento de metano para las condiciones mesofílicas, mientras que para la termófila se determinó la velocidad máxima de producción de metano mediante la metodología desarrollada por nuestro grupo de investigación (Martinez-Valdez, Ojeda, & Buitrón, 2018).

Ecuación 4.5.1 Rendimiento de metano

$$Y_{CH_4} = \frac{mL \text{ de } CH_4 \text{ producidos} - mL \text{ de } CH_4 \text{ endógeno}}{Sólido \text{ Volátil}_{alimentado}}$$

Ecuación 4.5.2 Determinación de porcentaje de inhibición o estimulación

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{Y_{CH_4} \text{ con inhibidor}}{Y_{CH_4} \text{ sin inhibidor}} \times 100$$

4.6. Arranque planta piloto

La planta piloto que se utilizó para realizar los experimentos se configuro con un reactor CSRT para la etapa acidogénica y un reactor UASB para la etapa metanogénica además de contar con un tanque de igualación, con un sistema de control lógico programable para los sensores de nivel, temperatura y control pH como se muestra en la Figura 4.5., en el reactor metanogénico se le adicionó un accesorio de trampa de biogás para evitar el sulfuro de hidrógeno y la humedad.

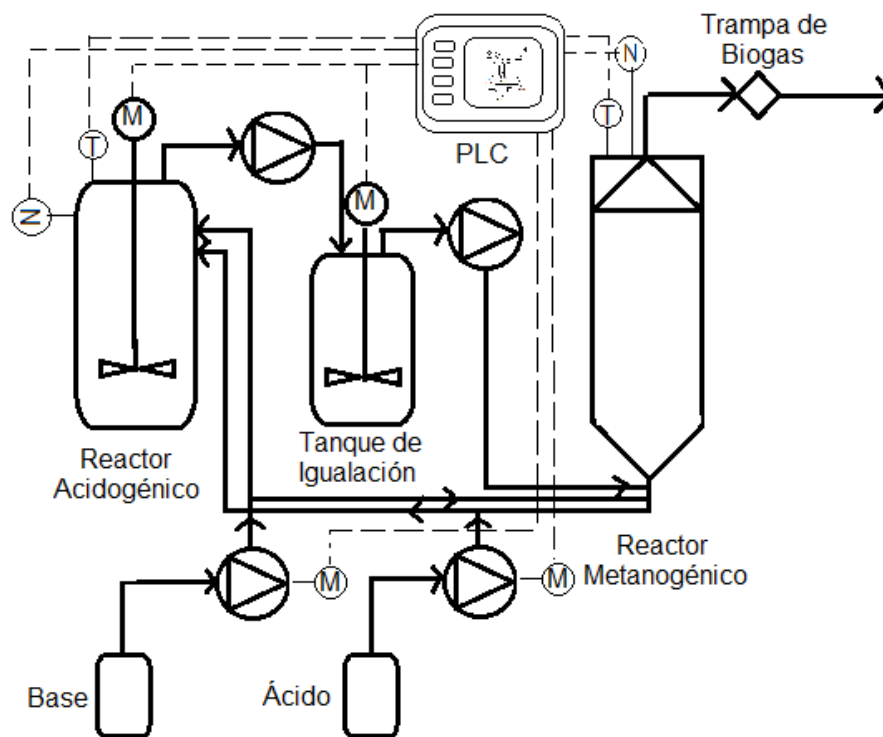


Figura 4.5.1 Diagrama de flujo e instrumentación de planta piloto

Se procedió el arranque de la planta de piloto (Figura) iniciando con la etapa acidogénica la cual consiste de un reactor tipo CSTR de acero inoxidable con un diámetro de tanque de 30cm y una altura del líquido de 50cm, cuenta con un agitador SM Hyponic ½ HP con dos propelas tipo rushtone separadas 25cm sobre el eje a una velocidad de 100RPM, este reactor tiene un volumen de 35L, cuenta con sensores de pH y ORP (Sensorex) y sensor de nivel ultrasónico (Flowline), puerto de salida de gas con un medidor de volumen µFlow (Bioprocess Control), dos bombas de diafragma (Roytronic Excel) de 0.79L/h para alimentación de ácido clorhídrico 3 M e hidróxido de sodio 5M, puertos de entrada para ácido clorhídrico 3 M e hidróxido de sodio 5 M, cuenta con dos puertos de muestreo para la cuantificación de ácidos grasos volátiles. Este reactor fue puesto en marcha con se

realizó el estudio de la etapa hidrolítica-acidogénica, por lo que para iniciar el experimento emplearon 3 L de inóculo acidogénico (efluente vitivinícola blanco) y 27 L de efluente vitivinícola tinto como sustrato (=). El volumen de operación fue de 30 L contando con el espacio de cabeza de 5 L para la liberación del gas. La razón para el empleo de efluente vitivinícola tinto fue que en el momento solo se disponía de este sustrato.



Figura 4.5.2 Planta piloto: reactor acidogénico CSTR, tanque de igualación y reactor metanogénico UASB.

El reactor metanogénico consistió de un reactor tipo UASB con un diámetro interno de 27cm, y una altura de líquido de 55cm, este reactor cuenta con un agitador SM Hyponic de 1/2HP con una propela perforada de 13cm a una velocidad de 80RPM, contando con un volumen de 35L, también cuenta con un sensor de ORP y pH (Sensorex) y sensor de nivel ultrasónico (Flowline), puertos de entrada para ácido



clorhídrico 3M e hidróxido de sodio 5M utilizando las mismas bombas que en el reactor CSTR, una salida de gas, además de 3 puertos de muestreo.

Como inóculo se utilizaron 3L de lodo granular anaerobio mesófilo, y efluente vitivinícola tinto a cuatro diferentes concentraciones 19, 17, 12 y 10g DQO/L operado en lote para la evaluación del tiempo de retención hidráulica se empleó esquema de tiempos fijos de operación de 5 y 10 días, Este procedimiento consistió en la cuantificación del volumen de biogás producido previo a su medición, el biogás se condujo a través de una trampa de óxido de hierro y gel de sílice para disminuir la concentración de sulfuro de hidrógeno y humedad del biogás que se produce. Posteriormente el biogás se cuantificaba mediante un medidor de flujo TG 05 Modelo 5 (Ritter), del biogás producido se tomó una muestra para analizar el contenido de metano mediante cromatografía de gases (Analizador Múltiple de Gases #5 RSI Instruments), Se cuantificó el parámetro α por medio de valoración mediante la Ecuación , esperando obtener el valor deseable de 0.5 y la demanda química de oxígeno inicial y final mediante las técnicas HACH (Perez & Torres, 2008).

Ecuación 4.5.1 Determinación de parámetro alfa

$$\alpha = \frac{V_1}{V_1 + V_2}$$

V_1 = Volumen valorado correspondiente a un pH de 5.75

V_2 = Volumen valorado correspondiente a un pH de 4.3

5. Análisis y discusión de resultados.

5.1. Caracterización

Las características que se determinaron de los residuos que se trataron se enlistan en la Tabla , en la cual incluyen los parámetros sólidos totales y volátiles, carbohidratos, DQO total y soluble, DQO de fibras, glucosa, xilosa, inhibidores como furfural e hidroximetil furfural y finalmente solventes y ácidos grasos volátiles. El bagazo de caña tiene la más alta cantidad de sólidos totales y volátiles, la mayor concentración de carbohidratos, DQO, inhibidores y ácido acético.



Tabla 5.1.1 Caracterización de los cuatro materiales lignocelulósicos empleados

Parámetro Residuo	Rastrojo de Maíz	Bagazo de Agave	Paja de Trigo	Bagazo de Caña
pH	4.0	4.3	4.1	3.5
Sólidos Totales	89.48±1.12	78.91±1.12	45.15±0.39	140.1±0.33
Sólidos Volátiles	24.18±0.83	25.4 ±0.1	12.17±0.13	30.96±0.1
Carbohidratos Totales [g/L]	18.17±0.26	5.445±0.28	16.85±0.24	24.54±0.1
Carbohidratos Solubles [g/L]	16.21±0.78	4.165±0.1	14.26±1.7	23.81±0.65
DQO total [g/L]	28.9±0.42	10.55±0.5	26.8±1.3	43.8±0.71
DQO soluble [g/L]	24.4±0.71	7.55±0.5	26.05±0.21	41.85±0.21
DQO fibras [g/L]	491.47±7.1	194.92±7.1	520.0±28.3	495.0±35.3
Glucosa [mg/L]	437±41	40±7	604±11	974±6
Xilosa [mg/L]	842±63	77±3	1855±21	327±33
Hidroximetil furfural (HMF) [mg/L]	140±6	45±2	103±6	107±5
Furfural [mg/L]	240±10	48±3	158±7	410±17
Ác. Acético [mg/L]	1814±61	789±26	1270±42	2432±80
Etanol [mg/L]	67.6	81.2	71.5	136.9
Butanol [mg/L]	18.6	18	13.2	13.2
Acetona [mg/L]		56.6		
Ác. Propiónico	31.9	20.2	16.6	21
Ác. Isobutírico		10.6		
Ác. Butírico		151.9		

Para el arranque de la planta piloto los efluentes vitivinícolas que se utilizaron fueron caracterizados por nuestro grupo de trabajo se enlista en seguida:



Tabla 5.1.2 Caracterización de efluentes vitivinícolas

Parámetro	Residuo	Efluente Vitivinícola Blanco	Efluente Vitivinícola Tinto
pH		3.57	3.5
Sólidos Totales		132.19±0.24	153.94±2.01
Sólidos Volátiles		27.72±0.19	24.31±0.67
Carbohidratos Totales [g/L]		57.67±1.44	49.69±3.62
DQO total [g/L]		374.5±1.41	220.63±0.18
Fenoles [mg/L]		20.16±1.31	83±0.7

Como se puede observar en la Tabla el efluente vitivinícola blanco presenta una mayor concentración de carbohidratos, DQO total, y Sólidos Volátiles. La cantidad de sólidos volátiles pueden ser un indicador del contenido de material orgánico de los residuos crudos y también proporcionan una medida de la población microbiana activa en los procesos biológicos (Henry & Heinke, 1999). Por este motivo se procedió a la selección de este efluente como inóculo acidogénico, y en cuanto al efluente vitivinícola tinto se empleó como sustrato modelo para el arranque de la planta piloto debido a similitudes en cuanto al pH, sólidos totales y volátiles con el bagazo de caña y similitud en el proceso estrujado en la producción de vino.

5.2. Toxicidad de furfural en el proceso de digestión anaerobia

La caracterización de la fase líquida obtenida de la extracción líquido-sólido presentó una concentración de furfural en el rango de 50-420 mg/L. Se ha demostrado que este compuesto inhibe en el crecimiento bacteriano. Se realizaron los experimentos de inhibición por furfural en el rango de 100-1000 mg/L midiendo la producción de metano mediante un cultivo mixto metanogénico. Como se observa en la Figura el perfil de producción de metano normalizado nos indica una biotransformación de los compuestos carboximetil celulosa y furfural a metano y con la concentración inicial y final mostrados en la Tabla podemos confirmar el consumo del compuesto mediante el consorcio mixto metanogénico en el reactor en lote a un tiempo de operación de 6 días metabolizando más del 97% del compuesto furfural.

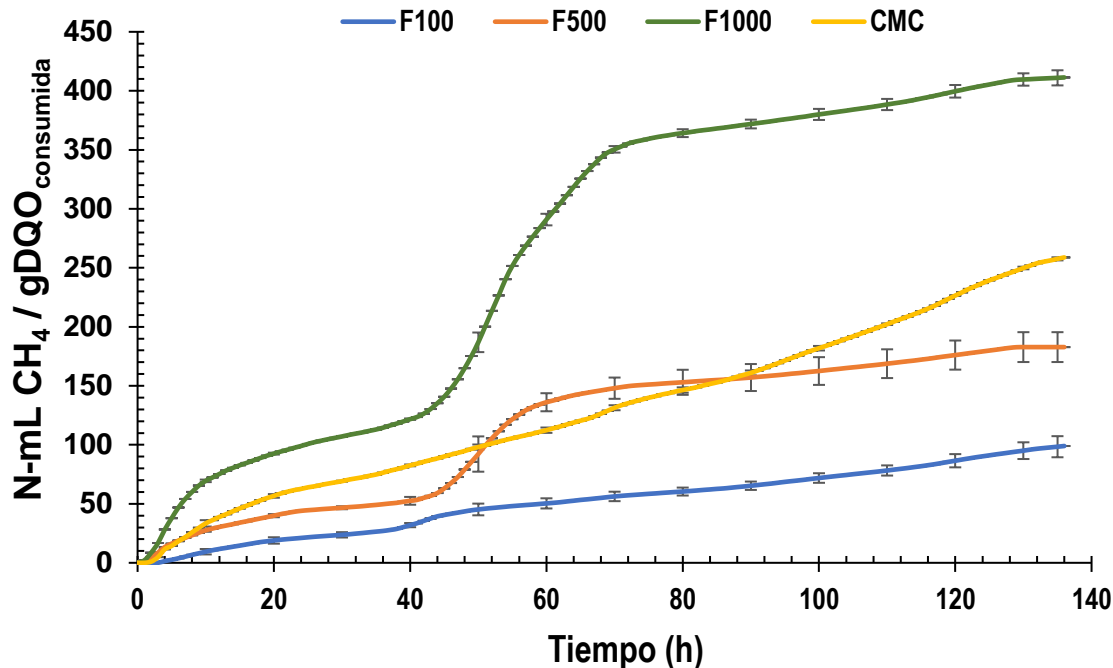


Figura 5.2.1 Prueba de Inhibición con Furfural en lodo granular mesófilo

Tabla 5.2.1 Resultados de estudio de inhibición de furfural

Muestra	C _i Furfural [mg/L]	C _f Furfural [mg/L]	Y NmLCH ₄ /gDQO _{consum}	%Inhibición o estimulación
F100	143.92	5.06	99±9	62
F500	470.19	7.05	183±15	29
F1000	991.72	3.10	411±8	159
Control +	-	-	259±3	-

La degradación del compuesto furfural no presenta un periodo de latencia en ninguna de las concentraciones probadas aunque la degradación del furfural es poco conocida existen distintos microorganismos capaces de convertir el furfural por ejemplo las levaduras que transforman al anillo furano en alcohol furfúrico (Morimoto, et. al., 1968), las varias bacterias como *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Bacillus* utilizan una ruta metabólica en la cual convierten al anillo a 2-ácido furóico (Holcenberg & Stadtman, 1969) y finalmente a metano por cultivos anaerobios metanogénicos (Rivard, et. al., 1986; McCarty, et. al., 1977), implicando que el inhibidor puede ser utilizado como sustrato para un consorcio mixto metanogénico. También ha habido estudios sobre distintas poblaciones microbianas como sulfato-reductoras (Brune, et. al., 1983) capaces de biotransformar el anillo a acetato y mediante una arquea metanogénica convertir el acetato a metano y bióxido de



carbono, las bacterias nitrato reductoras y metanogénicas (Knight, et. al., 1990) también fueron capaces de degradar el furfural siendo a niveles bajos de concentración lo que estos estudios nos permiten saber que existen una variedad de ambientes anaerobios capaces de realizar esta conversión.

Se observó que con la concentración de 1 g/L de furfural se presenta un efecto positivo en la conversión del compuesto furfural a metano. Un estudio similar indicó que la biotransformación de furfural en un cultivo metanogénico favoreció el crecimiento de los microorganismos *Methanococcus* sp. cepa B (Boopathy, 2009).

La ruta de biotransformación fue a través de la formación del alcohol furfúrico haciendo uso de este alcohol como un aceptor de electrones para los microorganismos (Boopathy, 2009). De igual forma se observó que en un cultivo mixto el número relativo de metanógenos aumento con la adición de furfural y alcohol furfúrico sobre los resultados del digestor control. Este aumento en los metanógenos fue en las dos rutas metabólicas acetoclásticas e hidrogenoclástica (Rivard & Grohmann, 1991).

5.3. Pruebas de potencial bioquímico de metano de los distintos residuos lignocelulósicos

La influencia de los cuatro materiales lignocelulósicos y sus fracciones sólidas y líquidas fueron estudiados en términos de la producción de metano, considerando el rendimiento de metano, calculado con la Ecuación 4.5.1 en términos de gas de metano normalizado entre gramo de sólido volátil.

La Figura presenta las curvas de producción de metano acumuladas trabajando con las dos fracciones sólidas, el residuo y el sólido lavado, y la fracción líquida, el lixiviado de cada material lignocelulósico, bagazo de agave, bagazo de caña, paja de trigo y rastrojo de maíz; los resultados se muestran juntos para poder hacer una comparación.

Para realizar una comparación de los valores obtenidos en las pruebas de potencial bioquímico de metano se consideró un rendimiento teórico de 449 mL CH₄/g SV para la paja de trigo sin pretratamiento considerando un 48% de sólidos volátiles transformados a metano. Este resultado es semejante al que se obtuvo con el estudio de la paja de trigo con un 51% obtenido (Ferreira, et. al., 2013) mientras que el de bagazo de caña sin pretratamiento el valor teórico es de 420 mL CH₄/gSV considerando la conversión estequiométrica de la materia orgánica (Badshah, et. al., 2012).



Los mayores rendimientos de metano para los sustratos utilizados fue la fracción líquida. El comportamiento de los sustratos presenta una forma comparable durante el proceso de digestión anaerobia.

Hay estudios en los cuales tratan los residuos lignocelulósicos después de haber sido pretratados con un tratamiento térmico en los cuales estos experimentos realizados con un pretratamiento térmico incrementaron la producción de metano alcanzando una buena biodegradabilidad anaerobia 58% (Bolado-Rodríguez, et. al., 2016), al igual al efecto hidrotérmico presentando el mejor potencial bioquímico de metano de $197 \text{ mL CH}_4/\text{g}_{\text{sustrato}}$ (Costa, et. al., 2014).

El uso de la digestión anaerobia para la degradación de los compuestos inhibitorios y residuales presentes en los sustratos fue beneficioso al inóculo usado, debido al aumento en la biodegradabilidad de la biomasa y al consumo de los compuestos lo que conduce a una mejora en la producción de metano, como vimos en el capítulo anterior el compuesto furfural no presentó un efecto inhibitorio sino un estimulador del crecimiento microbiano metanogénico. Como se puede observar en la gráfica 5.3.1 en la forma de la curva B y D es típica para la degradación de dos sustratos diferentes, los compuestos inhibitorios y los carbohidratos residuales, sin un periodo de latencia, en cualquier caso.

En el caso de la fracción líquida el lixiviado de los residuos lignocelulósicos de bagazo de caña y rastrojo de maíz presentan un comportamiento de degradación de dos sustratos distintos en este caso compuestos inhibitorios y residuales del pretratamiento (los azúcares presentes en el líquido). Existe una variación en el tiempo de retardo respectivo de cada material lignocelulósico, alcanzando un potencial bioquímico de metano de 150 ± 5 y $80 \pm 7 \text{ N-mL CH}_4/\text{gSV}$ para bagazo de caña y rastrojo de maíz antes del reinicio del proceso de digestión anaerobia alcanzando valores 377 y 205 $\text{N-mL CH}_4/\text{gSV}$, pudiendo ser a la estimulación de los compuestos inhibitorios como sucedió en el estudio de inhibición realizado en este trabajo y otros estudios realizados como el de (Costa, et. al., 2014) en el cual obtuvo bajas concentraciones de compuestos inhibitorios alcanzando un potencial bioquímico de metano de $122.2 \text{ L CH}_4/\text{kg}_{\text{sustrato}}$ y el caso de (Badshah, et. al., 2012) obteniendo un rendimiento de $173 \text{ L CH}_4/\text{kg SV}$ lo cual muestra un incremento en el potencial bioquímico de metano comparado con la caña de azúcar sin pretratamiento, probablemente debido a la baja concentración de furfural liberada en estos experimentos.



El objetivo de utilizar los residuos sólidos completos de los materiales pretratados es aprovechar el líquido residual del pretratamiento evitando un proceso de separación, aunque al realizar la separación se obtuvo un mejor rendimiento de metano para la fracción líquida que la sólida, por lo tanto el uso de la fracción líquida fue benéfico para el proceso de digestión anaerobia de los cuatro sustratos probados, debido al aumento de la biodegradabilidad de la biomasa y las bajas concentraciones de compuestos inhibitorios iniciales, lo que lleva un aumento en la producción de metano.

En el caso de las fracciones sólidas, existen autores que informan que no hay diferencia en la producción de metano entre la muestra pretratada y sin tratar, este experimento consistió de un tratamiento hidrotérmico (100°C, 0.5h) con paja de trigo (Sambusiti, et. al., 2013), como se observa en las fracciones de este estudio con el comportamiento de la curva es de una típica de digestión de un solo sustrato, pero con periodo de latencia largo quizá al proceso de hidrólisis que deben realizar los microorganismos y siendo el residuo sólido con mayor potencial bioquímico de metano que el sólido lavado debido a que el residuo sólido presenta un efecto de dilución y solubilización de la fase líquida presente. Este efecto de dilución de los compuestos inhibitorios y compuestos residuales en las fracciones sólidas permite la aclimatación del microorganismo después de un periodo de latencia de 100hrs aproximadamente en todos los residuos, mientras que en el sólido lavado al ya haberse extraído la fracción líquida, lo recalcitrante de la fracción única sólida está presente.

El tiempo de duración del proceso de digestión anaerobia para todos los sustratos finaliza en un tiempo similar los 15 días.

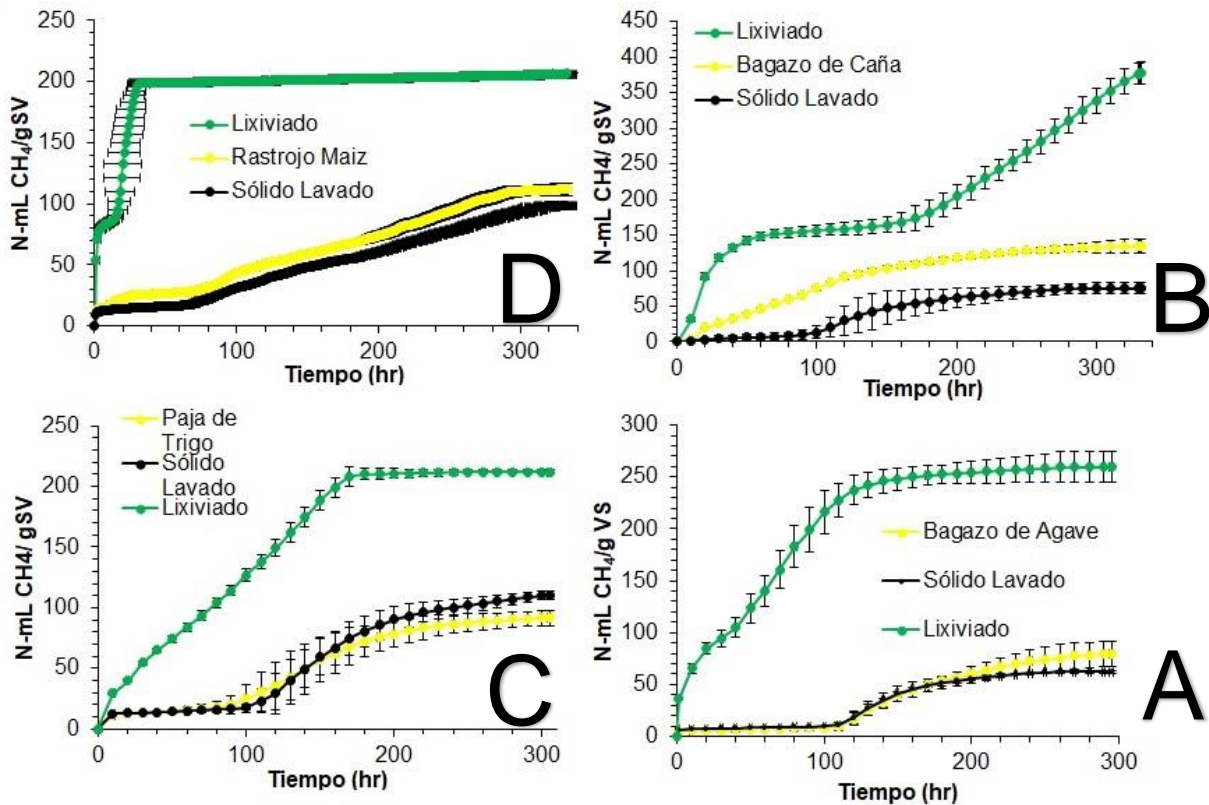


Figura 5.3.1 Resultados experimentales de los cuatro materiales lignocelulósicos (A) bagazo de Agave, (B) bagazo de caña, (C) paja de trigo y (D) rastrojo de maíz en distintas sus distintas fracciones dos sólidas (sólido y sólido lavado) y líquida (lixiviado) en condiciones mesófilas

Como se puede observar en la Tabla 5.3.1 los rendimientos de las distintas fracciones y materiales lignocelulósicos, la fracción líquida presenta el mayor potencial bioquímico de metano en todos los residuos lignocelulósicos.

Como se mencionó en el párrafo 5 la fracción líquida de cada residuo lignocelulósico presenta un aumento en el rendimiento de metano en comparación con su fracción sólida del material sin la extracción, en el caso del bagazo de agave 6.3 veces mayor, seguido del bagazo de caña con 4.32 veces y rastrojo de maíz 1.98.

Mientras que el sólido lavado presenta una disminución en el rendimiento a comparación de la fracción sólida del residuo lignocelulósico, con una relación de 0.8 veces el residuo de Bagazo de Agave, posteriormente el Rastrojo de Maíz con 0.87 y finalmente el Bagazo de Caña 0.65 esto debido a que el sólido lavado es



únicamente la fracción sólida con la extracción de líquido y de los azúcares, mientras que la excepción de la paja de trigo en el residuo sólido presenta mayor potencial bioquímico de metano que el sólido lavado siendo menor 0.58 veces y el lixiviado 0.72 veces,

Tabla 5.3.1 Rendimientos experimentales de los cuatro materiales lignocelulósicos en sus fracciones sólidas y líquida

Residuo	Fracción	Y NmLCH ₄ /gSV
Bagazo de Agave	Sólida Residuo	79.6±12
	Sólida-Lavado	62.1±7
	Líquida-Lixiviado	259.6±22
Bagazo de Caña	Sólida Residuo	134.3±10
	Sólida-Lavado	75.1±25
	Líquida-Lixiviado	377±19
Paja de Trigo	Sólida-Residuo	110.3±22
	Sólida-Lavado	91.3±17
	Líquida-Lixiviado	212.1±8
Rastrojo de Maíz	Sólida-Residuo	98.7±6
	Sólida-Lavado	111.7±11
	Líquida-Lixiviado	205.8±15

5.3.1. Pruebas de potencial bioquímico de metano en mesofilia y termofilia

Con el fin de realizar un estudio del efecto de la temperatura en el tratamiento de los residuos del material lignocelulósico de bagazo de caña se realizaron las pruebas de potencial bioquímico de metano en condiciones de termofilia a 55°C y mesofilia 37°C, se evaluaron dos parámetros el rendimiento de metano como volumen de metano normalizado entre gramos de DQO consumida, así como la velocidad máxima de producción de metano.

Como se muestra en la Figura 5 las curvas de producción de metano acumulado el material lignocelulósico bagazo de caña en condiciones mesófilas y termófilas son comparadas. Como se puede observar en las condiciones mesofílicas el comportamiento de la degradación de la fracción líquida presenta un forma de curva normal a una degradación de varios sustratos, mientras que en el de termofilia presenta un comportamiento de un solo sustrato, ese mismo comportamiento se observa en el control positivo lo que indica que los cultivos mixtos termófilos son capaces de degradar los compuestos inhibitorios y los residuales sin requerir de un periodo de retardo.



En el caso de las fracciones sólidas se puede ver que la fracción sólida del bagazo de caña presenta un comportamiento típico de degradación de dos sustratos quizá debido a la fracción líquida siendo la concentración de inhibidores y compuestos residuales del proceso de pretratamiento y además de a fracción sólida lignoceleulolítica presente en la condición mesofílica pero más remarcado en la condición termofílica.

En el caso del sólido lavado un comportamiento similar ocurre en las condiciones mesofílicas y termofílicas.

Tabla 5.3.1.1 Rendimiento de producción de metano en mesofilia y termofilia

Residuo	Y NmLCH ₄ /gSV Mesofilia	Y NmLCH ₄ /gSV Termofilia
Residuo Sólido	134.3±10	131±7
Sólido Lavado	75.1±25	82±8
Lixiviado	377±19	374±52
TRH	15d	5d

La tasa de producción de metano para las condiciones de mesofilia y termofilia fueron determinadas de acuerdo con, la metodología de nuestro grupo de trabajo (Martinez-Valdez, et. al., 2018) con los datos generados por el sistema automático de pruebas de potencial bioquímico de metano (AMPTS II).

Tabla 5.3.1.2 Velocidad de flujo máxima de producción de metano en bagazo de caña en mesofilia y termofilia

Residuo	Tasa de Producción (NmLCH ₄ /L _{reactor} h) mesofilia	Tasa de Producción (NmLCH ₄ /L _{reactor} h) termofilia
Residuo Sólido	3.71	2.67
Sólido Lavado	1.93	3.31
Lixiviado	8.83	11.76
Glucosa	12.82	36.48

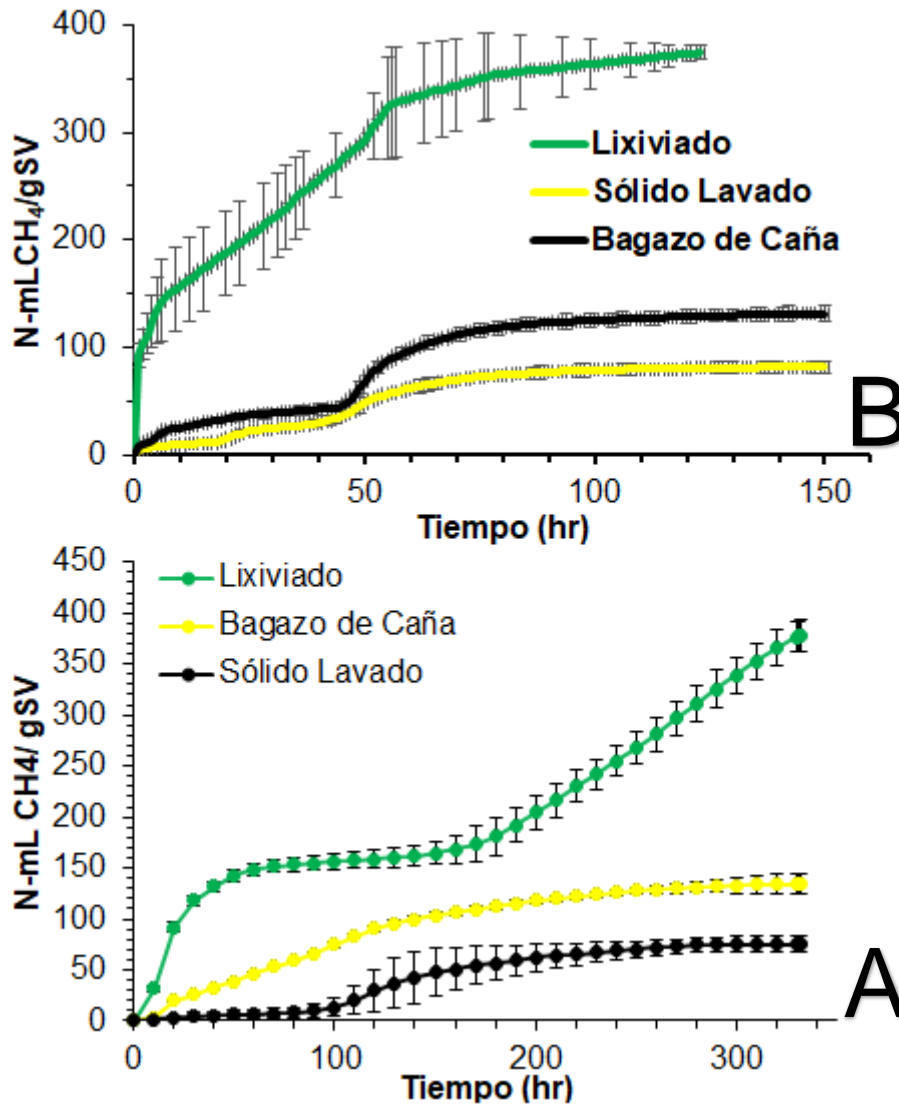


Figura 3.3.1.1 Resultados experimentales de pruebas de potencial bioquímico de metano en mesofilia (A) y termofilia (B) para bagazo de caña

Como se observa en la Tabla un aumento en tasa de producción de metano al aumento de la temperatura, utilizando un lodo granular aclimatado por un año para el caso del sólido lavado 71.5%, residuo líquido 33.2% y glucosa 184% mientras que un decremento en la tasa en el residuo sólido del 28%



5.4. Estudio de la Etapa Acidogénica escala laboratorio

Estudios recientes han probado que el proceso anaerobio puede ser diseñado para producir ácidos grasos volátiles, biohidrógeno y/o biometano por separado o simultáneo. Los ácidos grasos volátiles están ahora siendo probados como precursores de productos de valor como biocombustibles, alcoholes, aldehídos o cetonas. Los ácidos grasos volátiles son producidos en la hidrólisis de la digestión anaerobia, un número de ácidos orgánicos son incluidos en los ácidos grasos volátiles pero el orden de mayor producción es ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico (Khan, et. al., 2016).

Como ha sido sugerido el modo de operación para una la tasa de degradación de la biomasa favorable es utilizar un sistema en lote o semi-continuo (Lee, et. al., 2014). A demás del modo de operación, los valores óptimos de temperatura, pH, tiempo de retención y carga orgánica para la operación del proceso anaerobio varía de acuerdo con el tipo de sustrato y el tipo del reactor.

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre un inóculo endémico proveniente del efluente vitivinícola blanco, empleando como alimentación efluente vitivinícola blanco con fin de adaptar el inóculo a condiciones hipertermófilas de 70°C, ya que la temperatura tiene un efecto significativo en la producción ácidos grasos volátiles, ya que su incremento puede explicar un aumento en la solubilidad de carbohidratos y proteínas, además de la tasa hidrolítica (Liu, et. al., 2012a; Liu, et. al., 2012b).

Varios estudios realizados han encontrado que el rango de pH extremadamente ácido con un valor de 3 o extremadamente alcalino mayor a 12 son referidos como condiciones inhibitorias (Liu, et. al., 2012a; Liu, et. al., 2012b). Aunque el valor de pH óptimo ha sido citado con un valor alto como 10 para la hidrolisis de lodos, el valor puede cambiar entre 5.25 y 11 dependiendo del tipo de residuo (Lee, et. al., 2014). Por ejemplo la digestión anaerobia de residuos de cocina requiere un valor óptimo de pH igual a 7 (Wang, et. al., 2016) mientras que el valor óptimo de pH para la condición del tratamiento de aguas residuales se encuentra en el rango de 5.25 y 6 (Bengtsson, et. al., 2008).

Para la producción de ácidos grasos volátiles, la relación de ácidos grasos volátiles y Demanda Química de Oxígeno soluble se refiere a la cantidad de sustancias solubles convertidas a ácidos grasos volátiles (Jiang, et. al., 2013). Experimentos muestran que el rango de pH de 5-6 producen el valor más alto de la relación de ácidos grasos volátiles/demanda química de oxígeno soluble (75%), independientemente del tipo de inóculo utilizado para la producción de ácidos grasos volátiles (Wang, et. al., 2014).



Por lo mencionado en el párrafo anterior se seleccionó la condición de pH de 5.5 para el tratamiento de aguas residuales provenientes del proceso de una biorrefinería además que este pH favorece la producción de ácido acético, lo que nos permitirá una mejora en la producción de metano en la etapa siguiente.

El contenido orgánico que es hidrolizado es el primer factor, responsable directamente de la cantidad de los ácidos grasos volátiles producidos. Entre la composición del sustrato y demás parámetros, el pH juega un rol importante en el incremento y rendimiento de los ácidos grasos volátiles.

Un incremento en la temperatura del rango mesofílico a termofílico e hipertermofílico puede mejorar la producción de ácidos grasos volátiles, se ha reportado que el rango termofílico (60°C) permite una aclimatación biológica más rápida y activa en la etapa acidogénica comprado con la mesofílica (35°C), logrando un mayor rendimiento de ácidos grasos volátiles (Cai, et. al., 2009). Mientras que la producción de ácidos grasos volátiles a temperaturas extremas 70-80°C supera a las condiciones termófilas (Lu y Ahring, 2005).

La fermentación acidogénica de los diferentes sustratos se pueden realizar a través de una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por distintas enzimas. Numerosas rutas coexisten dentro del digestor de la fermentación anaerobia y toman un papel crucial en el rendimiento del sistema y la recuperación de los productos. Las proporciones de piruvato dirigidas a cada vía dependen del sustrato utilizado, las condiciones ambientales y las propiedades de los cultivos de microorganismos. Por lo general, las distribuciones de los principales productos solubles reflejan las rutas metabólicas prevalecientes. De acuerdo con la distribución de los productos líquidos importantes, las vías metabólicas acidogénicas se clasifican como se muestra en la Figura , como su nombre lo indica, cada vía tiene como principal producto el tipo de fermentación (Zhou, et. al., 2018).



Figura 5.4.1 Esquema de rutas metabólicas acidogénicas

5.4.1. Condición termófila

Como se observa en la Figura la producción de ácidos grasos volátiles se llevó a cabo mediante una fermentación mezcla ácida en donde los microorganismos acidogénicos transformaron a monómeros orgánicos una mezcla de ácido acético, propianato, butirato y valerato en similar cantidad junto con la formación de biogas en este caso únicamente dióxido de carbono (Zhou et al., 2018). La abundancia de los componentes individual en la mezcla ácida se ve afectada por varios factores como la concentración y características del sustrato en este caso efluente vitivinícola blanco, el pH bajo (<4.5) permite la producción de ácido acético, butirato y etanol como principales productos mientras que a valores de pH >6.5 se puede inducir el incremento en la producción de etanol y decrecer la formación de ácido (Zhu, y otros, 2009), a una condición de pH de 5.5, una agitación de 200 RPM y a una temperatura de 45°C alcanza una producción máxima de ácidos grasos volátiles al tiempo de 5 días y posteriormente disminuye y se estabiliza después de los 10 días después, el ácido acético es el principal ácido con una concentración máxima de 5g/L con una gran distribución de ácidos grasos volátiles a concentraciones en el rango de 2-3 g/L.

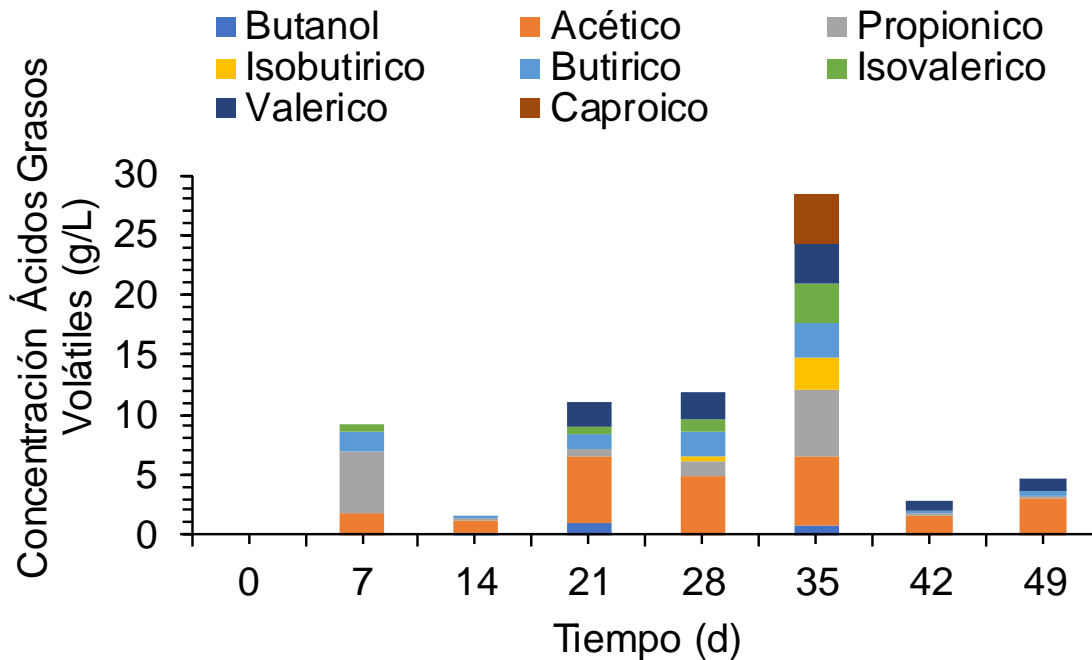


Figura 5.4.1.1 Producción de ácidos grasos volátiles en condiciones de 45°C

Una vez que se aumenta la temperatura a 55°C un cambio en la distribución de ácidos grasos volátiles se observa en el cual el ácido acético sigue siendo el de mayor concentración y seguido por la del ácido butírico y finalmente al del ácido valérico, la ruta metabólica que explica este tipo de distribución es la tipo butírico en la cual el mayor metabolito acidogénico es el butírico y acético, los factores críticos comunes para este tipo de vía es el pH y la temperatura, la reducción del equivalente (NADH_2) es también un factor crucial que determina la eficiencia de la producción de butirato. Se ha encontrado que la producción de butirato aumenta al incrementar la concentración de acetato en el sistema (He, et. al., 2012), debido a la alta concentración de acético no solo tiene una retroalimentación inversa a la generación de acetato, sino también a un superávit en los equivalentes NADH_2 . Comparando el proceso de producción de acetato, se consumen dos NADH_2 para reducir los intermediarios para la formación de butirato, lo que significa que más equivalentes de reducción como NADH_2 en el digestor podrían facilitar la producción de butirato.

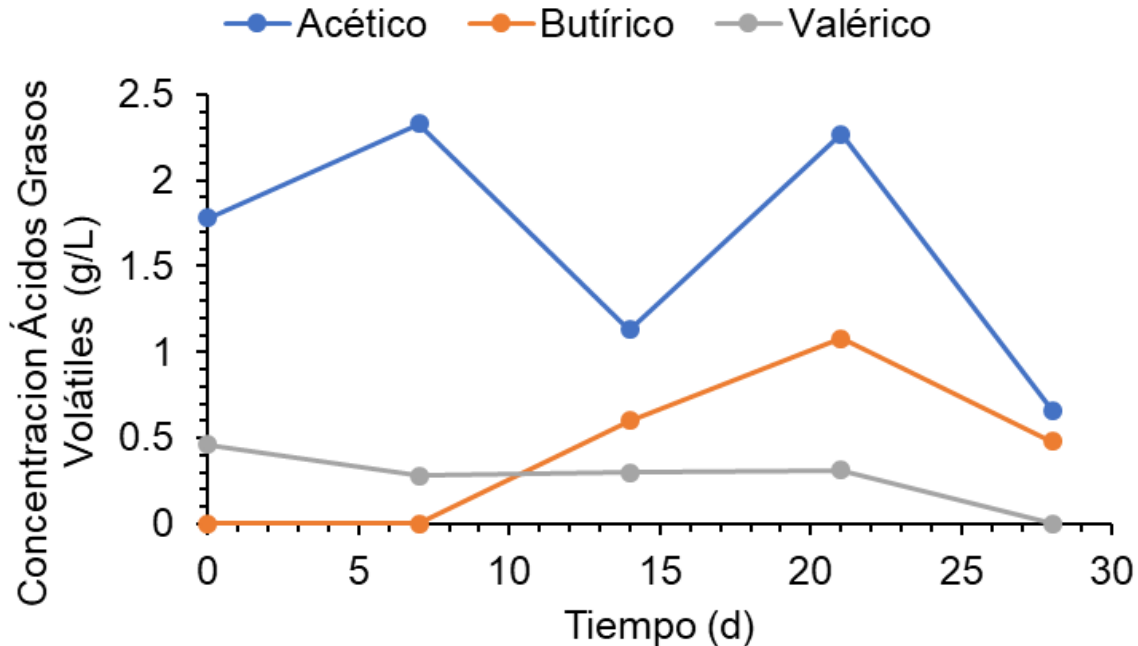


Figura 5.4.1.2 Producción de ácidos grasos volátiles en condiciones de 55°C

5.4.2. Estudio de la Etapa Acidogénica en hipertermofilia

En el proceso de digestión anaerobia de residuos el tiempo de retención de los residuos y el cultivo de bacterias dentro del reactor son parámetros del proceso importantes, el tiempo de retención incluye el tiempo de retención hidráulico y el tiempo de retención de sólidos que hacen referencia al volumen del reactor y al tiempo asignado para los microorganismos predominantes, respectivamente. Los resultados de la experimentación a la temperatura de 70°C a 1, 3 y 5 días fueron evaluados midiendo la concentración inicial y final de solventes y ácidos grasos volátiles empleando como sustrato efluente vitivinícola tinto y efluente vitivinícola blanco como inóculo.

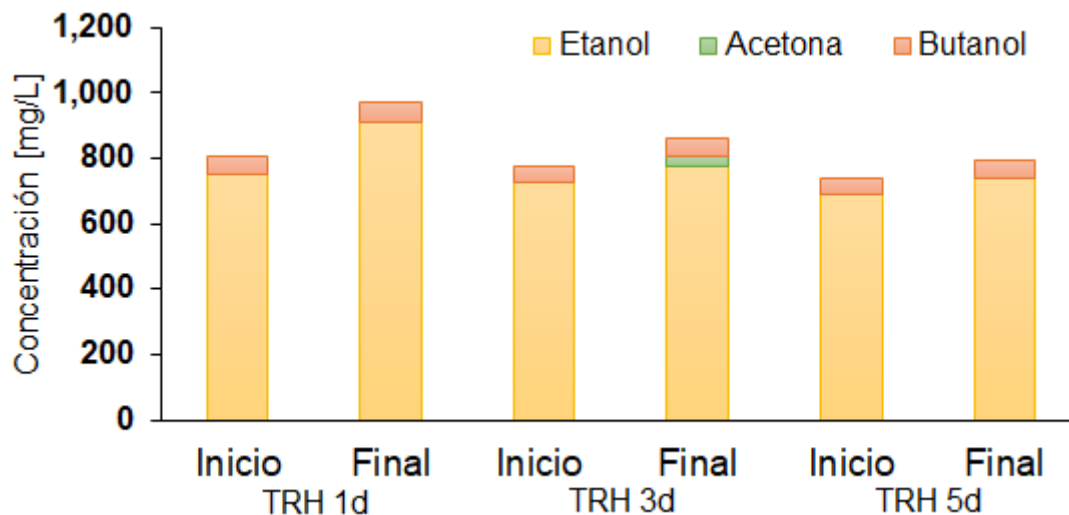


Figura 5.4.2.1 Producción de solventes a distintos tiempos de operación

Como se observa en la Figura los tres tempos de retención muestran un aumento en la concentración de etanol y en la Figura incremento en la concentración de ácido acético siendo estos los principales metabolitos producidos durante la fermentación, siguiendo ruta metabólica del tipo Acetato-Etanol, en la cual el acetato no solo puede ser producido a partir del piruvato mediante la vía de acetyl-CoA, sino también de la oxidación sintrófica del acetato (Shin y Youn, 2005). Durante la producción de etanol y ácido acético, la acetona y el butanol pueden ser producidos a partir de glucosa por algunas especies del género *Clostridium* como *Clostridium acetobutylicum* (Yen, et. al., 2011) y *Clostridium beijerinckii* lo cual nos permite la fermentación ABE (acetana-butanol-etanol).

El inóculo de origen anaerobio normalmente conduce a la acumulación típica de ácido acético durante el arranque de un proceso anaerobio (Charles, et. al., 2009). El pH es un factor crucial que afecta el cambio de la ruta metabólica acidogénica, se ha reportado que incrementar el pH de 4 a 7 puede incrementar la producción de ácido acético, pero decrece la producción de ácido butírico mientras que la producción de ácido acético y butírico se mantienen similares en el rango de pH de 6.5-7. La distribución de los acidos grasos volátiles como se muestra en la Figura en el caso tiempos de retención de tres y cinco días presentan una ruta de tipo butirato en la cual se observa un consumo del ácido acético y un aumento en concentración del ácido butírico.

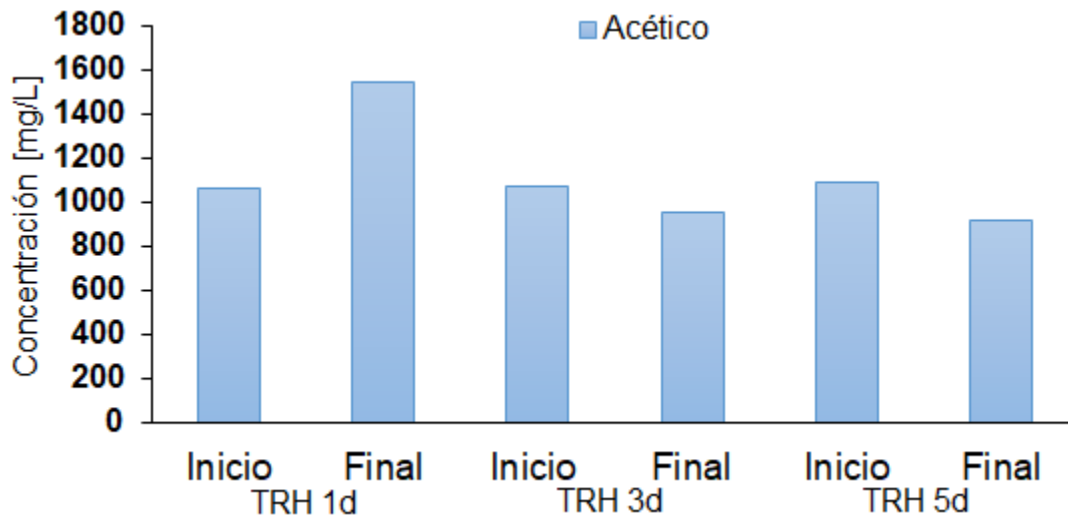


Figura 5.4.2.2 Producción de ácido acético a distintos tiempos de operación

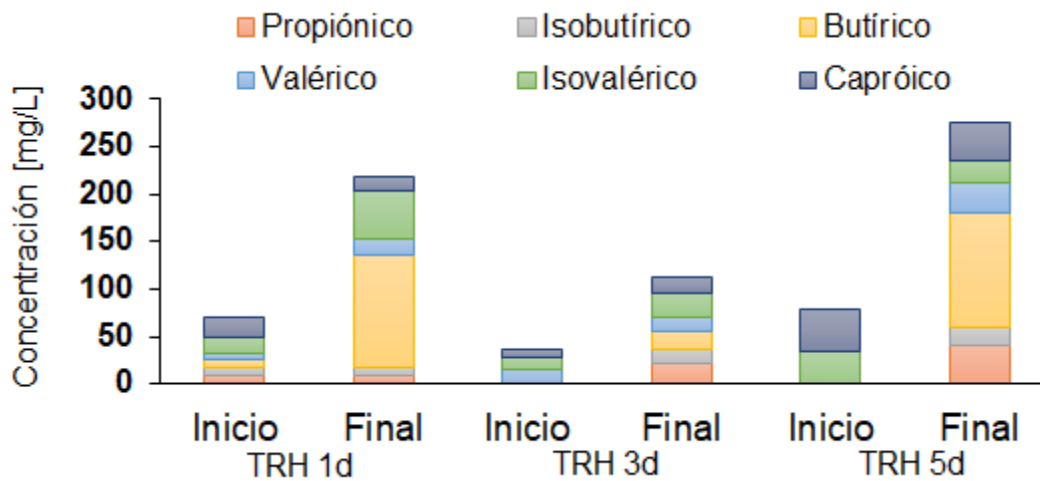


Figura 5.4.2.3 Producción de ácidos grasos volátiles a distintos tiempos de operación

Resultados experimentales han probado que la producción de ácidos grasos volátiles tiene una correlación con el tiempo de retención hidráulica y con la temperatura de operación del reactor (Kim, et. al., 2013). Se ha observado que el tiempo de retención hidráulica se puede utilizar para controlar la producción relativa de ácido propiónico y butíricos a partir de efluentes de la industria papelera y suero (Bengtsson et al., 2008), por lo que del mismo modo el tiempo de retención hidráulica se puede utilizar para controlar la producción relativa de ácido acético.

Una vez encontrado que el tiempo de retención hidráulica de 1d presenta la producción de ácido acético se procedió a evaluar cinco residuos distintos el

efluente vitivinícola tinto, los cuatro efluentes de biorrefinería (rastroy de maíz, paja de trigo, bagazo de caña, bagazo de agave) a una prueba de fermentación acidogénica a 70°C y empleando el mismo inóculo efluente vitivinícola blanco.

Diferencias en la composición de los sustratos nos permite analizar el tipo de distribución y concentración de los ácidos grasos volátiles producidos, como se puede observar en la Figura 4 siguen el mismo tipo de ruta metabólica tipo acetona-butanol-etanol, como se puede observar en el caso de bagazo de caña y bagazo de agave se observa la producción de acetona mientras que la concentración de los alcoholes aumenta también pero en menor proporción.

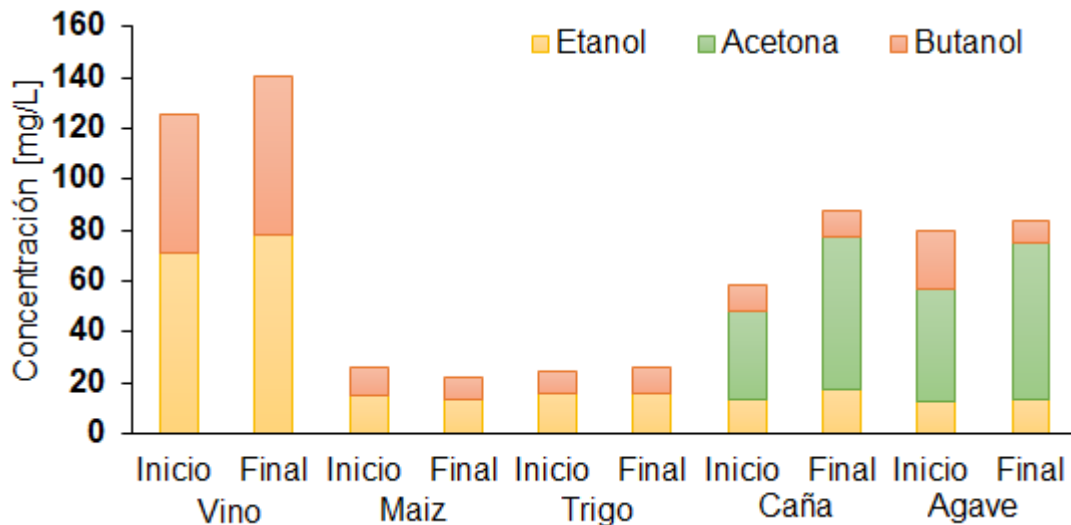


Figura 4 Producción de solventes empleando distintos sustratos a 1d de tiempo de operación

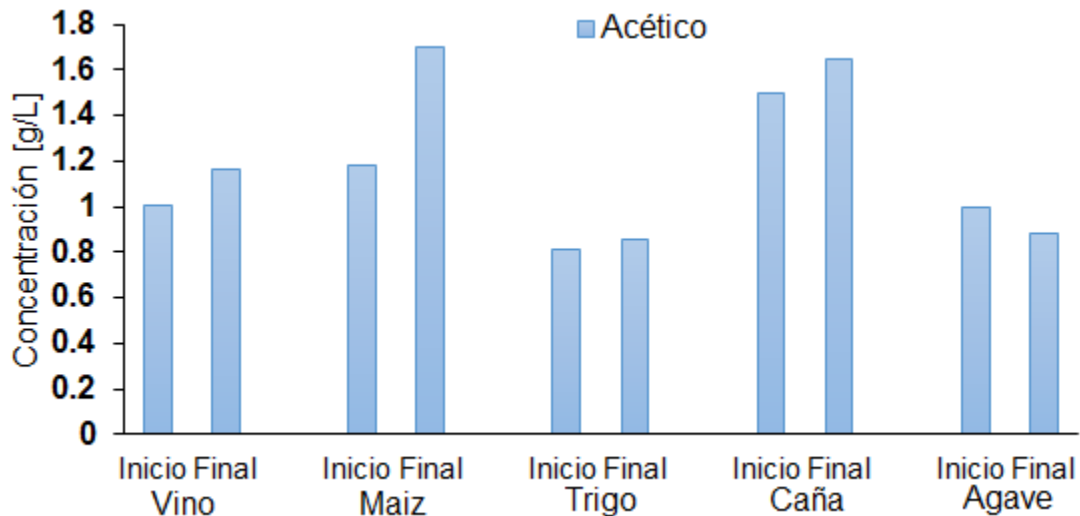


Figura 5 Producción de ácido acético empleando distintos sustratos a 1d de tiempo de operación

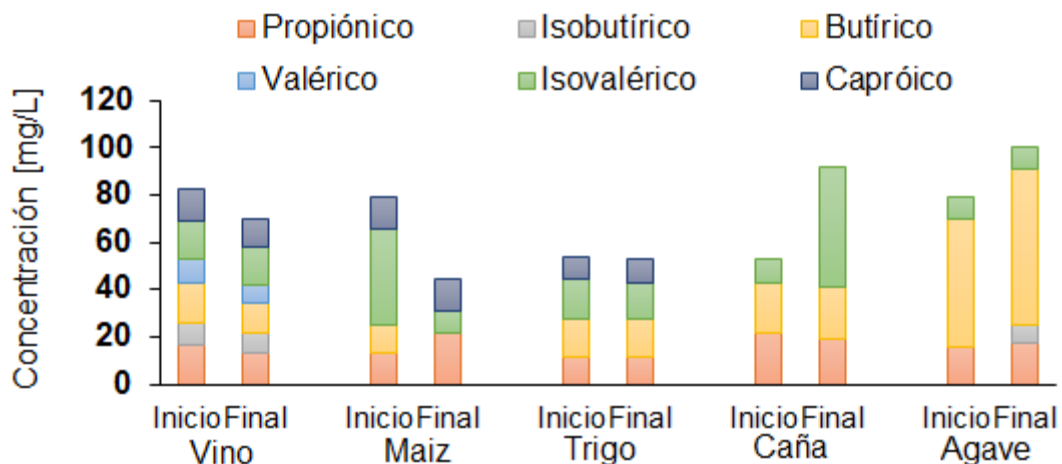


Figura 6 Producción de ácidos grasos volátiles empleando distintos sustratos a 1d de tiempo de operación

Durante la fermentación acidogénica de los distintos materiales lignocelulósicos y efluente vitivinícola presentan una variada distribución de ácidos grasos predominando la concentración de ácido acético, y siendo concentraciones mayores a 0.8g/L, teniendo como sustrato rastrojo de maíz una mayor producción de este ácido, en cuanto a la distribución de los ácidos grasos de mayor tamaño tiene una distribución similar en la concentración ácidos grasos volátiles siguiendo una ruta metabólica de ácidos mixtos, predominando el ácido butírico, isovalérico y propiónico.



En el caso de los bagazos de caña y agave presentan una menor distribución de ácidos grasos volátiles propiónico, butírico e isovalérico.

Dado que el tiempo de retención hidráulico tiene el impacto más significativo en la distribución de los ácidos grasos volátiles, un requerimiento de equilibrar el tiempo de retención y la concentración total de ácidos grasos volátiles, los valores benéficos de tiempo de retención hidráulicos son para un cierto valor de producción de ácidos grasos volátiles, mientras que un valor prolongado es responsable de la acumulación de ácidos grasos volátiles (Lee et al., 2014).

Un tiempo de retención hidráulico proveerá de un tiempo suficiente para que la bacteria acidogénica reduzca los residuos a sustancias derivadas y consecuentemente favorecerá el rendimiento de ácidos grasos volátiles (Bengtsson et al., 2008)

5.5. Puesta en Marcha de la Planta Piloto

Se puso en marcha la planta piloto con un periodo de operación de la etapa acidogénica de 30 días en condiciones mesófilas 35°C con una agitación de 117RPM, un pH de 5.5 empleando como inóculo efluente de vinazas vitivinícolas blanco, como se puede observar en la Figura 7 la distribución de los ácidos grasos volátiles es la misma que en la escala laboratorio, lo que nos indica que el escalamiento está realizándose correctamente y la concentración del ácido acético sigue siendo de mayor producción, seguido por la del butirato.

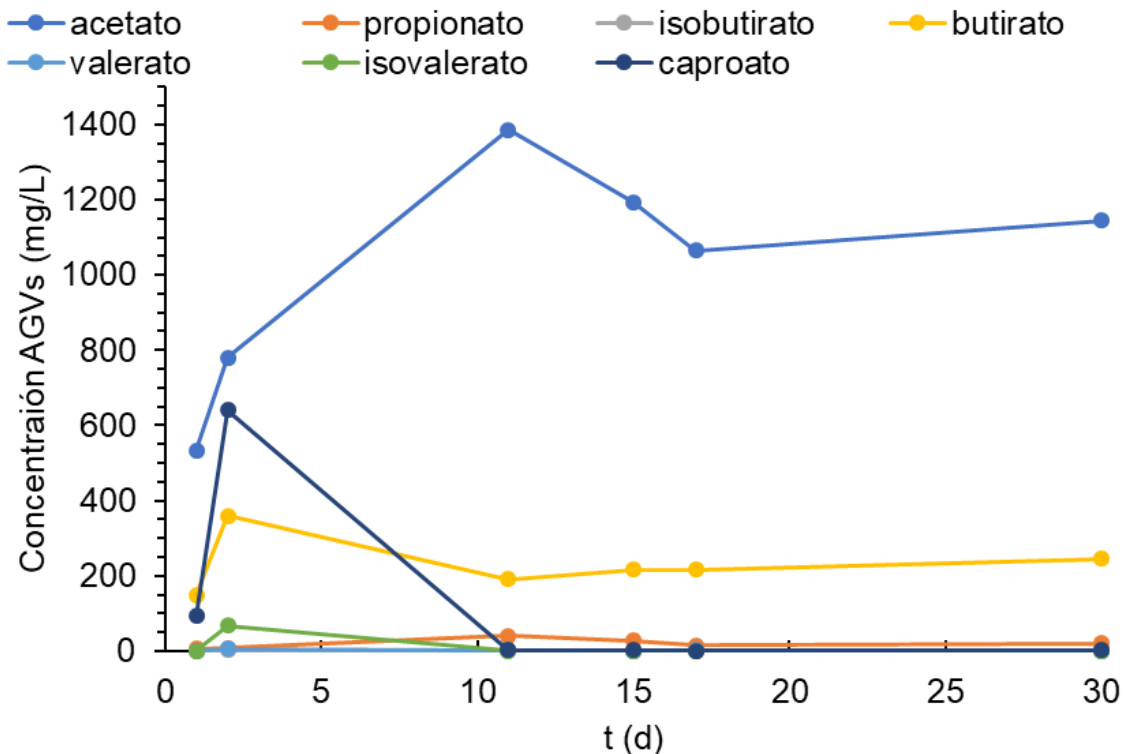


Figura 7 Generación de ácidos grasos volátiles en reactor piloto CSTR.

Posteriormente a la evaluación del reactor acidogénico con el inóculo a las condiciones mesófilas, resultó en conseguir la mayor concentración de ácido acético, se procedió al arranque del reactor metanogénico empleando los dos tiempos de residencia de 5 y 10 días, como se puede observar en la Figura 8 el comportamiento a los 5 días se ve una mejora de una producción de 50L a 75L un aumento de 25L probablemente a la aclimatación de los microorganismos al sustrato aunque el tiempo no alcanza la etapa de estacionaria, En el caso de 10 días una alteración del sistema ocurrió debido a la estimulación en los microorganismos teniendo una fase exponencial muy pronunciada en la producción de biogás aunque se llega al estado estacionario, en la segunda prueba ya presenta un comportamiento normal y con una producción de biogás de 75L, como se puede observar en la Figura 9 la degradación de la materia orgánica en el periodo 1 y 2 la degradación fue de 4 y 6 gDQO por lo que una mejora en el consumo de materia orgánica se observa mientras que el caso del periodo 3 y 4 se observa un consumo de 8gDQO mientras que en el otro periodo una disminución a 6gDQO.

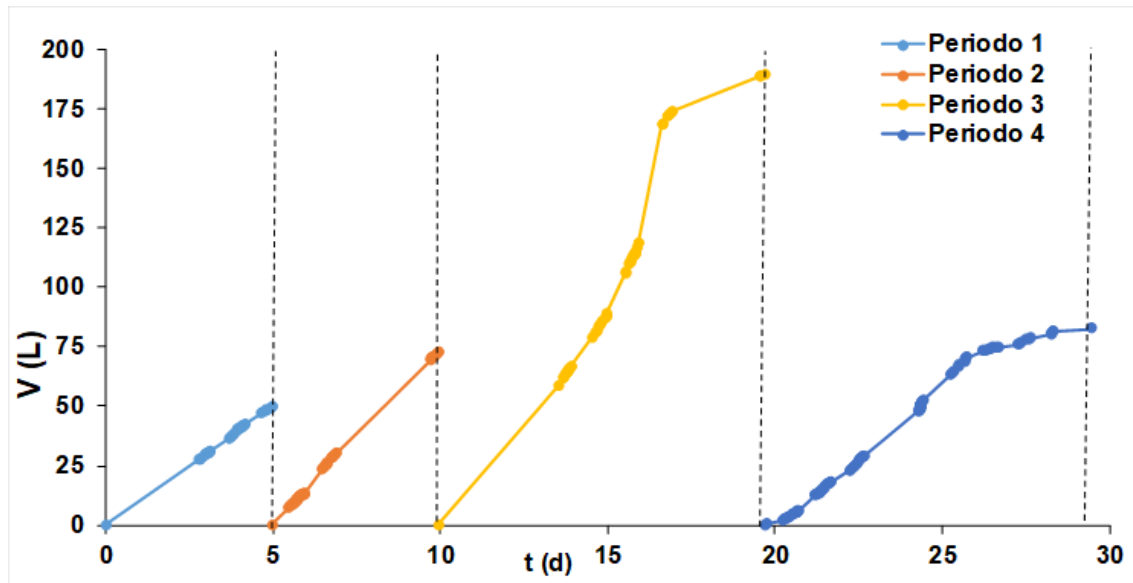


Figura 8.5.2 Producción de biogás producido en el reactor piloto metanogénico UASB

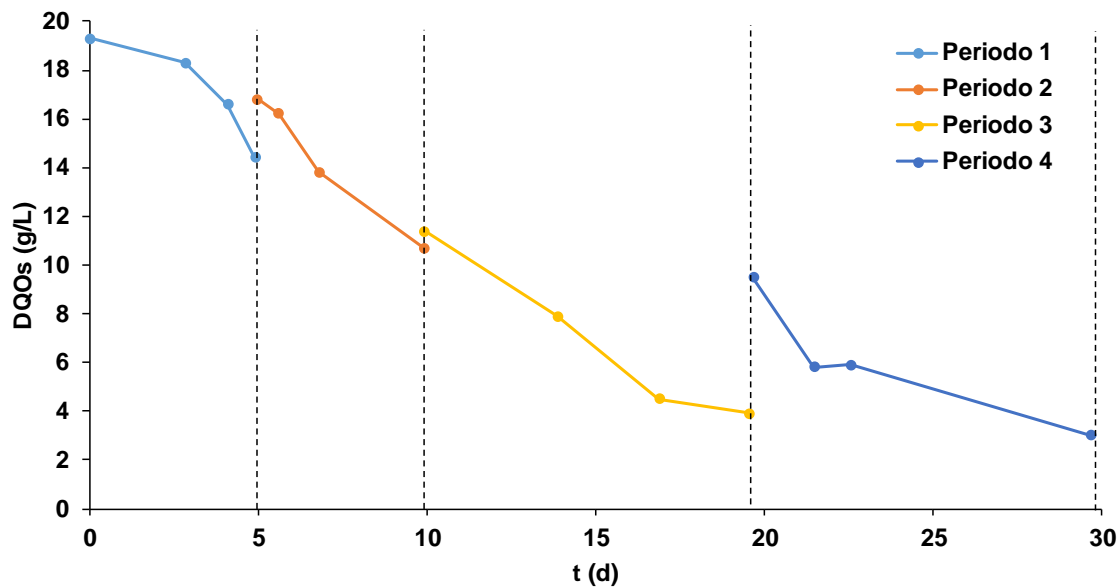


Figura 9 Degradación de materia orgánica en DQOs en el reactor piloto metanogénico UASB



Tabla 5.5.1 Resultados de mediciones operacionales del reactor piloto metanogénico UASB

Periodo	Porcentaje de Metano (%)	Volumen de Metano (L)	Parámetro α	Rendimiento (L CH ₄ /g DQO _{alimentado})	(L CH ₄ /L _{reactor} /d)
1	65	32	0.42	85.3	0.285
2	68	49	0.51	149.9	0.417
3	60	129	0.75	-	0.554
4	63	52	0.68	289.12	0.241

En el caso de las mediciones de composición del biogás corresponden al porcentaje promedio metano producido 60-65%, otro parámetro importante de influencia es el parámetro α ya que nos permite tener un control de la acidificación del reactor al tener un valor de 0.75 el parámetro se observó una estimulación de los microorganismos y una liberación mayor de bióxido de carbono.

6. Conclusiones

Se encontró que el furfural tiene un efecto estimulación en los microorganismos metanogénicos, pues este tiene un aporte de materia orgánica y no presenta efecto de inhibición en la fase metanogénica, lográndose degradar hasta 1g/L de concentración de furfural.

El mayor potencial bioquímico de metano se obtuvo de la fracción líquida (lixiviado) de los residuos lignocelulósicos provenientes del pretratamiento hidrotérmico. Para todos los residuos evaluados se determinó que 15 días son necesarios para alcanzar la máxima producción de metano.

Se determinó que las condiciones termófilas permiten reducir el tiempo de reacción hasta en una tercera parte comparado con las condiciones mesófilas pues aumenta la velocidad de producción de metano, en cuanto al rendimiento de metano, se observó que hubo un aumento en las fracciones sólidas lo que podemos inferir que se obtiene mayor capacidad hidrolítica y degradación de compuestos bajo las condiciones termófilas.

El aumento de la temperatura en la fermentación acidogénica a diferentes (reactor CSTR escala laboratorio) tuvo un efecto de distribución de ácidos grasos volátiles. Se observó una mayor variedad de ácidos grasos volátiles en 45°C que a 55°C o 70°C. El ácido acético fue el principal producto obtenido para las temperaturas más



elevada con un rango de hasta 2g/L para cada condición pero con reducción de tiempo de operación del reactor. El aumento de temperatura permitió reducir el tiempo de operación hasta de un día y en cuanto a los residuos lignocelulósicos en la condición hipertermófila el rastrojo de maíz con una producción de 600mg/L.

Se llevó a cabo el arranque satisfactorio de la planta piloto en dos etapas. En la fase acidogénica se produjo principalmente ácido acético. En el reactor metanogénico operado a 10 días de tiempo de operación alcanzo un rendimiento de 289 mLCH₄/gDQO, lo que indica que el valor obtenido procede a una reducción de la materia orgánica del 82% con respecto al rendimiento teórico.

7. Referencias

- Anderson, G., Kasapgil, B., & Ince, O. (1994). Microbiological study of two-stage anaerobic digestion during start up. *Water Res.*, 11(28), 2383-2392.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., ... Van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5), 927–934.
- Antonopoulou, G., Stamatelatos, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Ind. Eng. Chem. Res.*(47), 5227-5233.
- APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington: American Public Health Association.
- Assawamongkhol Siri, T., Reungsang, A., & Pattra, S. (2013). Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*, 14(38), 6146-6153.
- ASTM. (1997). Standar guide for evaluation of fuel ethanol manufacturing facilities- E1344-90. In A. S. Material, *Annual Book of ASTM Standards, vol 11.05: Biological Effects and Environmental Fate* (pp. 667-690). West Conshohocken: American Society for Testing and Material.
- Badshah, M. (2012). *Evaluation of process parameters and treatments of different raw materials for biogas production*. Sweden: University of Lund.
- Badshah, M., Lam, D. M., Liu, J., & Mattiasson, B. (2012). Use of an automatic methane potential test system for evaluating the biomethane potential test of sugarcane bagasse after different treatments. *Bioresour Technol*, 262-269.
- Barakat, A., Monlau, F., & Steyer, J. P. (2012). Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresour Technol*, 90-99.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., & Welander, T. (2008). Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and



- pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 492–499.
- Bolado-Rodríguez, S., Toquero, C., Martín-Juárez, J., Travaini, R., & García-Encina, P. A. (2016). Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 201, 182–190.
- Boopathy, R. (2009). Anaerobic biotransformation of furfural to furfuryl alcohol by a methanogenic archaeobacterium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(8), 1070–1072.
- Bouchard, J., Nguyen, T. S., Chorne, E., & Overend, R. P. (1990). Analytical methology for biomass pretreatment. Part . Solid residues. *Biomass*, 4(23), 249-261.
- Blonskaja, V., Menert, A., & Vilu, R. (2003). Use of two-stage anaerobic treatment for distillery waste. *Advances in Environmental Research*, 7, 671–678.
- Brune, G., Schoberth, S. M., & Sahm, H. (1983). Growth of a strictly anaerobic bacterium on furfural (2-furaldehyde). *App Environ Microbiol*(46), 1187-1192.
- Bryant, M. P. (1979). Microbial methane production-theoretical aspects. *J. Anim. Sci.*, 48, 193-201.
- Cai, M., Chua, H., Zhao, Q., Sin, N. S., & Ren, J. (2009). Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresour. Technol.*(100), 1399-1405.
- Callander, I. J., Clark, T. A., McFarlane, P. N., & Mackie, K. L. (1986). Anaerobic digestion of stillage from pilot scale wood-to-ethanol process: I. Stillage characterisation. *Environ Technol Lett*(7), 325-334.
- Cao, G. L., Ren, N. Q., Wang, A., Guo, W., Xu, J. F., & Liu, B. F. (2009). Effect of lignocellulose derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Int J Hydrogen Energy*, 13475-13480.
- Cappelletti, M., Bucchi, G., De Sousa Mendes, J., Alberini, A., Fedi, S., Bertín, L., & Frascari, D. (2012). Biohydrogen production from glucose, molasses and cheese whey by suspended and attached cells of four hyperthermophilic *Thermotoga* strains. *J. Chem. Technol.*, 9(87), 1291-1301.
- Charles, W., Walker, L., & Cord-Ruwisch, R. (2009). Effect of pre-aeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.*, 8(100), 2329-2335.
- Chu, S., & Majumdar, A. (2012). Opportunities and challenges for sustainable energy future. *Nature*, 7411, 294-303.
- Clark, T. A., & Mackie, K. L. (1987). Steam explosion of the softwood *Pinus radiata* with sulfur dioxide addition. I. Process Optimization. *J Wood Chem Technol*, 3(7), 373-403.



- Clark, T. A., Mackie, K. L., Dare, P. H., & McDonald, A. G. (1989). Steam explosion of the softwood *Pinus radiata* with sulfur dioxide addition. II. Process characterization. *J Wood Chem Technol*, 2(9), 135-166.
- Cohen, A., Breure, A. M., Van Andel, J. G., & van Deursen, A. (1980). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose: maximum COD-turnover rate during continuous operation. *Wat. Res.*(14), 1439-1448.
- Coleman, M. D., & Stanfurt, J. A. (2006). Biomass feedstock production systems: economic and environmental benefits. *Biomass and Bioenergy*, 30, 693-695.
- Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentration in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 28, 193-202.
- Costa, A. G., Pinheiro, G. C., Pinheiro, F. G., Dos Santos, A. B., Santaella, S. T., & Leitão, R. C. (2014). The use of thermochemical methane potential of the sugarcane bagasse. *Chem. Eng. J.*(248), 363-372.
- De Bok, F. A., Harmsen, H. J., Plugge, C., De Vries, M. C., Akkermans, A. D., De Vos, W. M., & Stams, A. J. (2005). The first true obligatory syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum Shinkii* sp. nov., co-culture with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*(55), 1697-1703.
- De Gioannis, G., Muntoni, A., Pollettini, A., & Pomi, R. (2013). A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manage*, 6(33), 1345-1361.
- Delgenes, J. P., Moletta, R. M., & Navarro, J. (1996). Effect of lignocellulosic degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzym Microb Technol*, 220-225.
- Deubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Método calorimétrico de fenol-sulfúrico para la microdeterminación de carbohidratos totales. *Anal. Chem.*, 3(28), 350-356.
- España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., & Alzate-Gaviria, L. (2011). Vinasses: characterization and treatments. *Waste management & research: the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA*, 29(12), 1235-50.
- Evans, E. a., Evans, K. M., Ulrich, A., Ellsworth, S., & Abbasnezhad, H. (2011). Anaerobic Processes. *Water Environment Research*, 83(10), 1285-1333.
- Ezeji, T., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agridultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioenerg*, 1460-1469.



- Ferreira, L. C., Donoso-Bravo, A., Nielsen, P. J., Fernandez-Polanco, F., & Pérez-Elvira, S. J. (2013). Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw. *Bioresour. Technol.*(143), 251-257.
- García Bustamante, C. A., & Masera Cerutti, O. (2016). *Estado del Arte de la Bioenergía en México*. México: Imagia Comunicación.
- Goh, C. S., & Lee, K. T. (2010). A visionary and conceptual macroalgae-based third generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sahab, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 842-848.
- Goldstein, I. S., & Easter, J. M. (1992). An improved process for converting cellulose to ethanol. *Tappi J*, 8(75), 135-140.
- Gould, M. C. (2015). Bioenergy and anaerobic digestion. In A. Dahija, *Bioenergy* (pp. 297-317). Academic Press.
- Graaf, D., & Fendler, R. (2010). *Biogas production in Germany*. Dessau-Rosslau.
- Grethlein, H. E., & Dill, T. (1993). *The cost of ethanol production from lignocellulosic biomass -A comparison of selected alternative process-*. Lansing : MI: Michigan Biotechnology Institute.
- He, M., Sun, Y., Zou, D., Yuan, D., Zhu, B., Li, X., & Pang, Y. (2012). Influence of temperature on hydrolysis acidification of food waste. *Procedia. Environ. Sci.*, 16, 85-94.
- Heitz, M., Capek-Menard, E., Koeberle, P. G., Gagne, J., Chornet, E., & Overend, R. P. (1991). Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment condition using the STAKE II technology. *Bioresour Technol*(35), 23-32.
- Henry, J. G., & Heinke, G. W. (1999). *Ingeniería Ambiental*. México: Prentice Hall.
- Ho, K.-L., Chen, Y.-Y., & Lee, D.-J. (2010). Biohydrogen production from cellobiose in phenol and cresol-containing medium using *Clostridium* sp R1. *Int J Hydrogen Energ*, 10239-10244.
- Holcenberg, J. S., & Stadtman, E. R. (1969). Nicotinic Acid Metabolism: III. Purification and properties of a nicotinic acid hydroxylase. *J. Biol. Chem.*(224), 1194-1199.
- Intanoo, P., Gulari, E., & Chavadej, S. (2014). Simultaneous Production of Hydrogen and Methane from Cassava Wastewater Using a Two Stage Upflow Anaerobic Sludge Blanket System under Thermophilic Operation. *Chemical Engineering Transactions*, 39(1996), 1567–1572.
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., & Li, M. (2013). Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature and organic loading rate. *Bioresour. Technol.*, 143, 525-530.
- Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresour. Technol.*, 19(33), 6666-6672.



- Kelly, C., Jones, O., Barnhart, C., & Lajoie, C. (2008). Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xilitol biosynthesis. *App Biochem Biotechnol*, 97-108.
- Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y. W., Zhou, J. L., Zhang, J., . . . Wang, J. (2016). Comparing the value of bioproducts from different stages of anaerobic membrane bioreactors. *Bioresour. Technol.*(214), 816-825.
- Knight, E. V., J, N. N., Kaplan, D. L., & Meeks, J. R. (1990). Biodegradation of 2 furaldehyde under nitrate-reducing and methanogenic conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 725–730
- Kim, W., Shin, S. G., Lim, J., & Hwang, S. (2013). Effect of temperature and hydraulic retention time on volatile fatty acids using swine wastewater. *Bioprocess Biosyst*, 6(36), 791-798.
- Kleinschmidt, J. (2007). Biofueling Rural Development: Making the Case for Linking Biofuel Production to Rural Revitalization. (U. o. Hampshire, Ed.) *Policy Brief no. 5* .
- Kubler, H., & Schertler, C. (1994). Three-phase anaerobic digestion of organic wastes. *Water Sci. Technol.*, 12(30), 367-374.
- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83–99.
- Lee, M., Hidaka, T., & Tsuno, H. (2009). Two-phased hyperthermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge with kitchen garbage. *J. Biosci. Bioeng.*, 5(108), 408-413.
- Lee, R. A., & Lavoie, J. -M. (2013). From first- to third-generation biofuels: challenges of producing and commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, 3, 6-11.
- Lee, W. S., Chua, A. S., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and application of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.*, 83-99.
- Lettinga, G., Hulshoff Pol, L. W., Wiegant, W., de Zeeuw, W., Hobma, S. W., Grin, P., . . . van Velsen, A. F. (1993). Upflow sludge blanket processes. *Proceedings of International Symposium Anaerobic Digestion*, (pp. 139-158). Boston.
- Liu, I. C., Wang, J., Liu, X., Fu, B., Chen, J., & Yu, H. Q. (2012a). Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: effect of pH. *Water Res.*, 3(46), 799-807.
- Liu, Y., Zhang, Y., Quan, X., Li, Y., Zhao, Z., Meng, X., & Chen, S. (2012b). Optimization of anaerobic acidogenesis by adding Fe₀ powder to enhance anaerobic wastewater treatment. *Chem. Eng. J.*(192), 179-185.
- Lu, J., & Ahring, B. K. (2005). Effects of temperature and hydraulic retention time on thermophilic anaerobic pretreatment of sewage sludge. *4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste*, (pp. 156-164). Copenhagen.



- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102(18), 8700–8706.
- Lyberatos, G., & Skiadas, I. V. (1999). Modeling of Anaerobic Digestion-Review. *Global Nest. Int. J.*, 1, 63-76.
- Mackie, K., Deverell, K., & Callander, I. (1983). Aspects of wood hydrolysis via the dilute sulphuric acid process. In H. E. Duckworth, & E. A. Thompson (Ed.), *International Symposium on Ethanol from Biomass* (pp. 271-308). Winnipeg, Canada, Ottawa: The Royal Society of Canada.
- Malina, J. F., & Pohland, F. G. (1992). *Design of Anaerobic Processes for Treatment of Industrial and Municipal Wastes* (Vol. 7). (T. Publishing, Ed.) Lancaster: Water Quality Management Library.
- Martinez-Valdez, F. J., Ojeda, F., & Buitrón, G. (2018). Biochemical methane potential and production rate from an acidogenic effluent of winery wastewater under mesophilia and thermophilia. *Water Resource*.
- McCarty, P. L., Young, L. Y., Gossett, J. M., Stuckey, D. C., & Healy, J. B. (1977). Heat treatment for increasing methane yields from organic materials. In H. G. Schlegel, & J. Barnea, *Microbial Energy Conversion* (pp. 179-199). Oxford: Pergamon Press.
- McDougall, F., Anderson, G., & Evison, L. (1993). Two-phase anerobic digestion of coffee wastewater. *Proceedings of the 48th Industrial Waste Conference*, (pp. 677-683).
- 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.
- Molau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Lignocellulosic materiasl into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Crit. Rev. Environ Sci Technol*, 3(43), 260-322.
- Molau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X. M., Latrille, E., Trably, E., . . . Carrere, H. (2012). Predictive Models of Biohydrogen and Biomethane Production Based on the Compositional and Structural Features of Lignocelullulosic Materials. *Environmental Science & Technology*, 21(40), 12217-12225.
- Morimoto, S., Hirashima, T., & Ohashi, M. (1968). Studies on fermentation products from aldehyde by microorganisms. *J. Ferment. Technol.*(46), 276-281.
- Owen, W. F., Healy Jr., J. B., Young, L. Y., & McCarty, P. L. (1979). Bioassay for monitoring biochemical methane portential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13(6), 485-492.



- Parawira, W., Read, J. S., Mattiassona, B., & Bjornsson, L. (2008). Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion. *Biomass Bioenergy*, 32, 44-50.
- Perez, A., & Torres, P. (2008). Índice de alcalinidad como herramienta para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Ingeniería y Competitividad*, 10(2), 41-52.
- Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., . . . Steyer, J.-P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*, 12(38), 4975-4985.
- Ratti, R. P., Botta, L. S., Sakamoto, L. K., & Varesche, M. B. (2013). Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. *Int. J. Hydrogen Energy*, 23(38), 9707-9717.
- REN21. (2018). Global Status Report. In R. E. Century, *Renewable 2018*. Paris.
- Rivard, C. J., & Grohmann, K. (1991). Degradation of furfural (2-furaldehyde) to methane and carbon dioxide by an anaerobic consortium. *Applied biochemistry and biotechnology*, 28-29, 285-295.
- Rivard, C. J., Himmel, H. E., & Grohmann, K. (1986). Utilization of hydrolysate from acidic pretreatment of biomass in a mesophilic anaerobic fermentation system for the production of methane: Comparison of the standard CSTR with up-flow packed bed reactors. *Biotechnol Bioeng Symp*, 135-151.
- Sambusiti, C., Ficara, E., Malpei, F., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical, characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*(55), 449-456.
- Sanchez, A., Valle-Perez, A., Gonzalez-Rios, J., Rodriguez, F., Perez-Pimienta, J. A., & Amaya-Delgado, L. (2018). Analisis comparativo de la influencia del tiempo de pretratamiento termoquímico sobre la sacarificación enzimática de residuos lignocelulósicos pretratados en un reactor tubular continuo. *XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ* (p. 793). San José del Cabo: División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Ingeniería Química.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microb. Mol. Biol. Rev.*(61), 156-161.
- SENER. (2016). *Balance Nacional de Energía 2016*. México: Secretaría de Energía.
- Sheehan, G. L., & Greenfield, P. F. (1980). Utilization, treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Res*, 3(14), 257-277.
- Shin, H. S., & Youn, J. H. (2005). Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation*, 1(16), 33-44.
- Smith, P. H. (1966). The microbial ecology of sludge methanogenesis. *Dev. Ind. Microb. Mol Biol. Rev.*(7), 156-161.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci*, 1621-1651.



- Takara, D., Nitayavardhana, S., Munasinghe, P., Surendra, K. C., & Khanal, S. K. (2012). Sustainable Bioenergy from Biofuel-derived Residues. *Water Environment Research*, 84(10), 1568–1585
- Tang, Y.-Q., Matsui, T., Morimura, S., Wu, X.-L., & Kida, K. (2008). Effect of temperature on microbial community of glucose-degrading methanogenic consortium under hyperthermophilic chemostat cultivation. *J. Biosci. Bioeng.*(106), 180-187.
- Taylor, G. (2008). Biofuels and the Biorefinery Concept. *Energy Policy*, 36, 4406-4409.
- Tian, Z. (2011). *Anaerobic Digestion of Biofuel Production Residues*.
- Torry-Smith, M., Sommer, P., & Ahring, B. K. (2003). Purification of bioethanol effluent in an UASB reactor system with simultaneous biogas formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(1), 7–12.
- Van Ginkel, S. W., Oh, S. E., & Logan, B. E. (2005). Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *Int. J. Hydrogen Energy*, 15(30), 1535-1542.
- van Haadel, A. C., & Catunda, P. F. (1994). Profitability increase of alcohol distilleries by the rational use of byproducts. *Water Sci Technol*, 8(29), 117-124.
- Vancov, T., Alston, A. S., Brown, T., & McIntosh, S. (2012). Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels. *Renew Energy*, 1-6.
- Venetsaneas, N., Antnopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.*(100), 3713-3717.
- von Sivers, M., & Zacchi, G. (1996). Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. *Bioresour Technol*(56), 131-140.
- Wang, F., Hidaka, T., & Tsumori, J. (2014). Enhancement of anaerobic digestion of shredded grass by co-digestion with sewage sludge and hyperthermophilic pretreatment. *Bioresour. Technol.*(169), 299-306.
- Wang, Y., Yin, J., Shen, D., & Li, N. (2014). Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH. *Bioresour. Technol.*, 161, 395-401.
- Wang, Y., Zang, B., Li, G., & Liu, Y. (2016). Evaluation the anaerobic hydrolysis acidification stage of kitchen waste by pH regulation. *Waste Manage.*(53), 62-67.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: Current and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4, 849-860.
- Whang, L. M., Hsiao, C. J., & Cheng, S. S. (2006). A dual-substrate steady-state model for hydrogen production in an anaerobic hydrogen fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, 3(95), 492-500.
- Williams, C. L., Dahiya, A., & Porter, P. (2015). Introduction to bioenergy. In A. Dahiya, *Bioenergy* (p. 670). Academic Press.



- Wilkie, A. C., Riedesel, K. J., & Owens, J. M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 19, 63–102.
- Wyman, C. E., & Goodman, B. J. (1993). Near term application of biotechnology to fuel ethanol production from lignocelulosic biomass. In R. M. Busche, *Opportunities for Innovation: Biotechnology* (pp. 151-190a). Gaithersburg: NIST GCR 93-633.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., & Ladisch, M. (2010). Inhibition of cellulases by phenols. *Enzym Microb Technol*, 170-176.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., & Luo, S. (2011). Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae biomass residues. *Int. J. Hydrogen Energy*, 5(36), 3465-3470.
- Yen, H. W., Li, R. J., & Ma, T. W. (2011). The development process for a continuous acetone-butanol-ethano (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 6(42), 902-907.
- Zhang, T. C., & Noike, T. (1991). Comparison of one-phase and two-phase anaerobic digestion process in characteristic of substrate degradation and bacterial population levels. *Water Sci. Technol.*, 7-9(23), 1157-1166.
- Zheng, Y., Lin, H. M., & Tsao, G. T. (1988). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol Prog*, 6(14), 890-896.
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W. C., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource Technology*, 248, 68–78.
- Zhu, H., Parker, W., Basnar, R., Proracki, A., Falletta, P., Beland, M., & Seto, P. (2009). Buffer requirements for enhance hydrogen production in acidogenic digestion of food waste. *Bioresour. Technol.*, 21(100), 5097-5102.
- Ziemiński, K., & Frąć, M. (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11(18), 4127–4139.