



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

PRODUCCIÓN DE ETANOL Y METANO A PARTIR DE LA FRACCIÓN
ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS (FORSU) EN UN PROCESO EN
DOS ETAPAS

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

PRESENTA:
HAMILTON GUILLERMO MOSQUERA TOSCANO

TUTOR PRINCIPAL
OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
IDANIA VALDEZ VÁZQUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
ALFONSO DURÁN MORENO, FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Iván Moreno Andrade
Secretario:	Dra. Lorena Amaya Delgado
Primer vocal:	Dra. Idania Valdéz Vázquez
Segundo vocal:	Dr. Alfonso Durán Moreno
Tercer vocal:	Dr. Oscar González Barceló

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015 No. de Certificado CMX C SGC 209 2020, válido en el período del 12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023

Tutor de Tesis:

Dr. Oscar González Barceló

Firma

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la oportunidad de conocer este hermoso país y realizar el sueño de obtener mi Maestría.

A mi amada familia:

A mi madre, Amada, quien ha sido la luz y guía de mi camino.

A mi padre, Guillermo, quien me ha inspirado para crecer y es el pilar de mis éxitos.

A mi hermana, Priscila, quien es mi consejera y me impulsa a conseguir mis sueños.

A mi hermano, Alexis, por quien no me rindo y continúo mejorando para ser digno de su admiración.

A Martín y Omar, porque, aunque me he perdido la hermosa etapa de observarlos crecer, cada pequeño logro que alcance me ayudará a mejorar y así podré guiarlos cuando me necesiten.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Ingeniería por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y hacer realidad mi sueño de formarme en esta prestigiosa Institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por la beca otorgada, sin la cual no hubiera sido posible desarrollar este trabajo.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, dentro del Proyecto con clave IT101320 titulado Biorrefinería para producción de ácidos grasos volátiles, biogás y digestato a partir de residuos sólidos orgánicos urbanos.

Al Dr. Oscar González Barceló, a quien admiro mucho por todo su trabajo, esfuerzo y dedicación. Gracias por compartirme sus conocimientos y guiarme de la mejor manera durante toda la Maestría.

A la Dra. Idania Valdéz Vázquez y al Dr. Alfonso Durán Moreno quienes aportaron su valioso conocimiento y gracias a su guía fue posible el desarrollo de mi investigación. A la Dra. Idania Valdéz Vázquez por su paciencia, tiempo e invaluable consejos.

Al M.C. Francisco Rojo Callejas, de la Facultad de Química, a quien le agradezco infinitamente por todas sus enseñanzas y apoyo. Su contribución fue de suma importancia para agregar valor a este trabajo.

A Mario y Dimitriv, a quienes considero la base fundamental durante la ejecución todo mi trabajo en Laboratorio. Muchas gracias por su ayuda y guía, el desarrollo de toda esta investigación no habría sido posible sin sus consejos, enseñanzas y recomendaciones.

A Diana y Anita, con quienes compartí la bonita experiencia de conocer este hermoso país y me brindaron su apoyo incondicional en todo momento.

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU)	4
2.1.1. Características.....	4
2.1.2. Clasificación de la FORSU.....	5
2.2. Fermentación	7
2.2.1. Hidrólisis	7
2.2.1.1. Tratamientos previos aplicados a la FORSU para mejorar la hidrólisis .	9
2.2.2. Acidogénesis y acetogénesis	13
2.2.2.1. Estrategias de fermentación para la obtención de etanol a partir de la FORSU	19
2.3. Metanogénesis	22
2.3.1. Potencial bioquímico de metano (PBM)	22
2.3.2. Rendimiento del digestato sólido	24
3. METODOLOGÍA	26
3.1. Planificación de la campaña de muestreo de residuos orgánicos	26
3.1.1. Fase de Campo	26
3.1.1.1. Selección del día de monitoreo.....	26
3.1.1.2. Selección de la muestra.....	26
3.1.1.3. Transporte y almacenamiento de la muestra.....	27
3.1.2. Fase de Laboratorio	27
3.1.2.1. Preparación de la FORSU	27
3.1.2.2. Caracterización de la FORSU	28
3.1.2.3. Fermentación de la FORSU	29
3.2. Análisis de datos	35
4. RESULTADOS	40
4.1. Características de la FORSU	40
4.2. Fermentación de la FORSU	42
4.2.1. Fermentación con microflora nativa.....	42
4.2.2. Fermentación con microflora nativa más <i>S. cerevisiae</i>	46
4.2.3. Cinética de fermentación	53
4.2.4. Grado de fermentación (η_f), rendimiento de acidificación (η_a) y pH	62

4.3.	Metanización de las fracciones sólidas de la FORSU fermentada	68
4.3.1.	Características del digestato espesado (fracción sólida).....	69
4.3.2.	Potencial bioquímico de metano (PBM)	71
4.3.2.1.	Biodegradabilidad de las fracciones sólidas (η_B).....	74
4.3.2.2.	Comportamiento de las curvas de PEM.....	76
4.3.2.3.	Cinética de la metanización y modelamiento	79
5.	CONCLUSIONES	84
6.	REFERENCIAS	86

ABREVIATURAS

CH_S: Hidratos de carbono solubles

CH_T: Hidratos de carbono totales

DQO_S: Demanda Química de Oxígeno soluble

DQO_T: Demanda Química de Oxígeno total

H: Humedad

MS-OFMSW: Fracción orgánica de los residuos sólidos municipales clasificada mecánicamente

N-NH₄: Nitrógeno amoniacal

N-NTK: Nitrógeno total Kjeldahl

NS-OFMSW: Fracción orgánica de los residuos sólidos municipales sin clasificación en el origen

OFMSW: Fracción orgánica de los residuos sólidos municipales

RDR-OFMSW: Fracción orgánica de los residuos sólidos municipales clasificada en tambor rotatorio

RSU: Residuos Sólidos Urbanos

SS-OFMSW: Fracción orgánica de los residuos sólidos municipales clasificada en el origen

SV: Sólidos volátiles

ST: Sólidos totales

AGV: Ácidos grasos volátiles

WS-OFMSW: Fracción orgánica de los residuos sólidos municipales clasificada en agua

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Diagrama esquemático de la digestión anaerobia completa de la materia orgánica.	8
Figura 2-2. Conversión biológica de la FORSU hasta etanol y metano.....	10
Figura 2-3. Procesos para la producción de azúcares y bioetanol.....	20
Figura 2-4. Crecimiento diaúxico en presencia de dos sustratos	23
Figura 4-1. Comportamiento de los metabolitos producidos durante la fermentación de la FORSU	43
Figura 4-2. Ajuste del modelo de Gompertz para los metabolitos predominantes	54
Figura 4-3. Grado de fermentación (η_f).....	62
Figura 4-4. Rendimiento de acidificación (η_a) y pH	65
Figura 4-5. PEM y modelamiento de la FORSU fresca y fermentada	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Grupos de enzimas hidrolíticas y productos	8
Tabla 2-2. Concentraciones de glucosa obtenidas mediante la aplicación de distintos tratamientos a la FORSU	11
Tabla 2-3. Tipos de fermentación	13
Tabla 2-4. Concentraciones de etanol obtenidas a partir de la FORSU pretratada	21
Tabla 2-5. Metanización de las fracciones sólidas obtenidas del proceso de fermentación de la FORSU.....	25
Tabla 3-1. Características físicas de la FORSU.....	28
Tabla 3-2. Características químicas de la FORSU	28
Tabla 3-3. Características bromatológicas de la FORSU	29
Tabla 3-4. Variables experimentales	30
Tabla 3-5. Características de la cepa de <i>S. cerevisiae</i>	30
Tabla 3-6. Frecuencia de monitoreo de los reactores de fermentación	31
Tabla 3-7. Cuantificación de metabolitos	33
Tabla 4-1. Características de la FORSU	40
Tabla 4-2. Metabolitos de la FORSU	42
Tabla 4-3. Parámetros cinéticos para la producción de etanol	55
Tabla 4-4. Parámetros cinéticos para la producción de ácido láctico.....	56
Tabla 4-5. Parámetros cinéticos para la producción de ácido acético	58
Tabla 4-6. Grado de solubilización de la FORSU en 72 horas de fermentación.....	61
Tabla 4-7. Valores finales de pH luego de 72 horas de fermentación	67
Tabla 4-8. SV en el reactor luego de 72 horas de fermentación.....	68
Tabla 4-9. Características del inóculo, fracciones sólidas fermentadas y fresca de la FORSU	70
Tabla 4-10. Producción específica de metano de las fracciones sólidas y FORSU fresca	72
Tabla 4-11. Biodegradabilidad (η_B) de las fracciones sólidas y la FORSU	76
Tabla 4-12. Parámetros cinéticos para la prueba de PBM de las fracciones sólidas y la FORSU fresca.....	80

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 3-1. FORSU extrudida y homogenizada.....	27
Imagen 3-2. Cuantificador automático de potencial de metano (Automatic Methane Potential Test System - AMPTS)	31
Imagen 3-3. Montaje de reactor para extracción de muestras	32
Imagen 3-4. Prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	35
Imagen 3-5. a) Modelo de Gompertz y b) Modelo de Gompertz en dos fases.....	39
Imagen 4-1. Fermentado obtenido luego de 72 horas	69

RESUMEN

El aprovechamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) como sustrato para la obtención de biocombustibles líquidos, gaseosos y otros productos de interés industrial ha sido ampliamente estudiado en las últimas décadas (Ebrahimian et al., 2020; Mahmoodi et al., 2018a; Moreno et al., 2021). En particular, la producción de etanol y metano a partir de la FORSU ha tomado especial interés debido a su potencial para reducir la dependencia de los combustibles fósiles (Barampouti et al., 2019). Debido a que, en condiciones naturales de fermentación con la microflora nativa, el ácido láctico siempre es el metabolito predominante (Castellón, 2021), el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la bioaumentación de *Saccharomyces cerevisiae* y el incremento del contenido de sólidos totales sobre la producción de etanol y metano.

Para cumplir con los objetivos establecidos en la presente investigación se llevó a cabo la fermentación de la FORSU en condiciones mesofílicas (35°C) y en discontinuo durante 72 horas. La FORSU se fermentó ajustando diferentes concentraciones de sólidos (10, 20 y 29.2%) y de *Saccharomyces cerevisiae* (6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}); como referencia de cada condición experimental se utilizó la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa. Finalizado el período de fermentación, los sólidos no fermentados fueron sometidos a una prueba de potencial bioquímico de metano.

Al fermentar la FORSU únicamente con su microflora nativa se formaron principalmente ácido láctico > etanol > ácido acético, mientras que al bioaumentar con *S. cerevisiae* esta tendencia se modificó hacia etanol > ácido láctico > ácido acético. El incremento en la concentración de sólidos y levadura condujo a una mejora en la producción de etanol. La mayor producción de etanol fue de 407 ± 3 g_{DQO}/kg_{ST} con la bioaumentación de 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} y 20%_{ST}, mientras que la máxima concentración de etanol alcanzada alcanzó un valor de 43.4 ± 0.1 g/L con un incremento en la producción de 255% respecto al valor referencial con la bioaumentación de 12 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} y 29.2%_{ST}. Además, se observó un incremento en la producción de metano a partir de la FORSU fermentada selectivamente a etanol, cuyos valores oscilaron entre 330 y 464 NL-CH₄/kg_{SV}, superando de este modo al registrado para la FORSU fresca (329 ± 5 NL-CH₄/kg_{SV}).

Palabras clave: FORSU, fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*, etanol, metano

ABSTRACT

The use of the organic fraction of urban solid waste (FORSU) as a substrate for obtaining liquid and gaseous biofuels and other products of industrial interest has been widely studied in recent decades (Ebrahimian et al., 2020; Mahmoodi et al., 2018a; Moreno et al., 2021). In particular, the production of ethanol and methane from FORSU has taken special interest due to its potential to reduce dependence on fossil fuels (Barampouti et al., 2019). Due to the fact that, under natural conditions of fermentation with the native microflora, lactic acid is always the predominant metabolite (Castellón, 2021), the objective of the present investigation was to evaluate the effect of the bioaugmentation of *Saccharomyces cerevisiae* and the increase in the content of total solids on the production of ethanol and methane.

To achieve the objectives established in this research, OFMSW fermentation was carried out under batch and mesophilic conditions (35°C) for 72 hours. OFMSW was fermented adjusting different solids concentration (10, 20 and 29.2%) and *S. cerevisiae* (6, 12 and 24 g/kg_{OFMSW}); OFMSW that was fermented only with the native microflora was the reference. At the end of each fermentation period, the supernatant of the fermented product obtained was extracted by centrifugation to be characterized and the solid remaining was subjected to a biochemical methane potential test.

When FORSU was fermented only with its native microflora, mainly lactic acid > ethanol > acetic acid were formed, while when bioaugmented with *S. cerevisiae* this trend was modified towards ethanol > lactic acid > acetic acid. The increase in the concentration of solids and yeast led to an improvement in ethanol production. The best ethanol yield was 407 ± 3 g_{COD}/kg_{TS} with bioaugmentation of 24 g_{*S. cerevisiae*}/kg_{OFMSW} and 20%_{TS}, while the maximum ethanol concentration reached was 43.4 ± 0.1 g/L corresponding to an increase in the production of 255% with respect to the reference value with the yeast bioaugmentation of 12 g_{*S. cerevisiae*}/kg_{OFMSW} and 29.2%_{TS}. Moreover, an increase in methane production from the solid fractions selectively fermented to ethanol was achieved, whose values ranged between 330 and 464 NL-CH₄/kg_{VS}, thus exceeding the value recorded for raw OFMSW (329 ± 5 NL-CH₄/kg_{VS}).

Keywords: OFMSW, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, methane

INTRODUCCIÓN

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) es un biorresiduo abundante con un gran potencial para ser aprovechado en la generación de productos con valor agregado y biocombustibles, sin embargo, gran parte de estos son incinerados o terminan en rellenos sanitarios contribuyendo a la actual crisis ambiental (López-Gómez et al., 2019). Debido a ello, en los últimos años varias investigaciones se han enfocado en el desarrollo de procesos para aprovechar la FORSU debido a que, además de generarse en grandes volúmenes y ser gratuita, contiene macro y micronutrientes, como carbohidratos, lípidos y proteínas que son aprovechados por los microorganismos y transformados a una amplia gama de productos de interés industrial (Inamuddin et al., 2021).

En general, la gran mayoría de investigaciones se han enfocado en estudiar el efecto que tiene la aplicación, individual o combinada, de procesos de pretratamiento (físico, químico, térmico, etc.), hidrólisis enzimática y/o adición de cepas específicas de microorganismos sobre la hidrólisis de los sólidos contenidos en la FORSU y la producción de metabolitos (Mahmoodi et al., 2018; Barampouti et al., 2019). Aunque la información aportada es importante, la adición de sustancias químicas, enzimas y/o microorganismos específicos supone un costo que muchas veces limitan su aplicación en la práctica.

Debido a que el etanol es considerado una de las fuentes de energía alternativa que presenta un bajo impacto ambiental y su producción se considera importante desde el punto de vista industrial y de investigación (Dalena et al., 2019), el presente trabajo se enfocó en evaluar las condiciones bajo las cuales se obtienen producciones elevadas de este metabolito. Para ello, se determinó el efecto de la variación de las concentraciones de sólidos y *S. cerevisiae* sobre la producción de etanol utilizando como sustrato la FORSU generada en la Ciudad de México. Finalmente, se evaluó el potencial de producción de metano de las fracciones sólidas obtenidas de la FORSU fermentada con el fin de compararlo con la FORSU fresca.

1. JUSTIFICACIÓN

La FORSU es un sustrato del cual se puede obtener una amplia gama de productos con valor agregado debido a que es rico en azúcares fermentables y, además, al tener un alto contenido de material orgánico, también se puede generar metano a través de la aplicación de procesos en dos etapas (Moreno et al., 2021; Ebrahimian et al., 2020). Durán-Moreno et al. (2013) reportó que la fracción orgánica de los residuos producidos en la Ciudad de México constituye el 49.5% de los residuos totales producidos, la cual puede ser tratada biológicamente para obtener productos con valor agregado. Esto se debe a que el 40% en peso seco de la FORSU son carbohidratos totales (Campuzano, 2013), de los cuales el 20% se encuentran como carbohidratos solubles en agua los cuales pueden ser aprovechados rápidamente por los microorganismos (Castellón-Zelaya & González-Martínez, 2021).

Trabajos como los de Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) y Jojoa-Unigarro & González-Martínez (2021) evidenciaron que, en la fermentación de la FORSU utilizando únicamente la microflora nativa, independientemente de la variación de parámetros como la temperatura y la concentración de sólidos, el etanol es producido en segundo lugar después del ácido láctico lo que indicaría que la fermentación predominante para este tipo de sustrato es heteroláctica. Además, observaron que un aumento en la concentración de sólidos puede generar una disminución en la producción de metabolitos totales, no obstante, esta reducción se debe principalmente a la baja producción de ácido láctico. Mientras que, en el caso del etanol, esta disminución no es proporcional y sugiere que un aumento en la concentración de sólidos tiende a favorecer la formación de alcoholes.

Esto indicaría que, para aumentar la producción de etanol utilizando este tipo de sustrato es, en primer lugar, necesario la bioaumentación de organismos fermentadores que sean capaces de captar rápidamente los azúcares disueltos y transformarlos en etanol. En segundo lugar, un aumento en la concentración de sólidos totales reduciría la producción de ácido láctico y favorecería una fermentación etanólica. Además, trabajos como los de Moreno et al. (2021) y Ebrahimian et al. (2020) reportan que la fracción no fermentada obtenida luego de extraer los metabolitos producidos pueden generar metano en cantidades iguales o superiores en comparación con la FORSU fresca.

1.1. HIPÓTESIS

El incremento conjunto de la concentración de sólidos y la bioaumentación de *S. cerevisiae* en la FORSU permite incrementar la producción de etanol al aprovechar los carbohidratos solubles en agua.

1.2. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la producción de etanol y metano a partir de la FORSU fermentada selectivamente a etanol mediante la adición de *S. cerevisiae*.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la concentración de sólidos y bioaumentación con una levadura sobre la producción de etanol durante la fermentación de la FORSU.
- Evaluar el efecto de la bioaumentación de *S. cerevisiae* en la FORSU sobre el consumo de carbohidratos solubles en agua.
- Determinar la biodegradabilidad de la FORSU fermentada selectivamente a etanol, medida como el potencial de producción de metano.

ALCANCES

- La fermentación de la FORSU se llevará a cabo utilizando la población nativa que está presente de forma natural y mediante la bioaumentación con *S. cerevisiae*.
- El proceso fermentativo se llevará a cabo en condiciones mesofílicas (35°C) y en discontinuo.
- Las pruebas de potencial bioquímico de metano se aplicarán a las fracciones sólidas de la FORSU fermentada con y sin adición de *S. cerevisiae*, a la FORSU fresca y su respectiva fracción sólida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU)

Según Campuzano & González-Martínez (2016), la definición de fracción orgánica de residuos sólidos urbanos varía a nivel regional y nacional; en los Estados Unidos de América, la FORSU se considera una mezcla de alimentos, desechos de jardín y papel. En la Unión Europea se considera una mezcla de residuos de parques, jardines y cocinas, mientras que para otros autores su conceptualización es más amplia y puede abarcar residuos de jardinería, restos de comida y basura de hogares, oficinas, restaurantes, cantinas, plantas procesadoras de alimentos, entre otras (Darvishi-Harzevili & Hiligsmann, 2018).

La composición de los residuos sólidos urbanos (RSU) tiene una amplia variabilidad, misma que depende de varios factores como la estacionalidad, clima, localización geográfica, hábitos de consumo de la población, entre otros (Kreith & Tchobanoglous, 2002). Todos estos factores pueden influenciar la relación SV/ST (sólidos volátiles/sólidos totales) misma que es un indicador para evaluar el contenido orgánico de un sustrato (Darvishi-Harzevili & Hiligsmann). En la mayoría de países en desarrollo, los RSU se componen principalmente de materia orgánica y contienen un bajo porcentaje de papel, plástico y metales; en general, en países donde se percibe un ingreso bajo o medio, los residuos urbanos contienen un alto porcentaje de materia orgánica compostable que oscila entre el 40 y el 85% del total (Malik & Grohmann, 2012). De acuerdo a Durán-Moreno et al. (2013), la fracción orgánica de los residuos producidos en la Ciudad de México constituye el 49.5% indicando que la mitad de los residuos totales producidos pueden ser tratados biológicamente para obtener productos con valor agregado.

2.1.1. Características

La FORSU es esencialmente biomasa lignocelulósica la cual está constituida por celulosa, hemicelulosa (xilosa, arabinosa, manosa, galactosa) y lignina (Sharma & Saini, 2020), de los cuales esta última representa uno de los principales obstáculos para la producción de

biocombustibles y otros productos de interés ya que presenta una elevada resistencia a la degradación microbiana, enzimática e incluso química (Buckeridge & Goldman, 2011).

Generalmente la FORSU está constituida por 30 – 69% de carbohidratos (almidón, celulosa y hemicelulosa), 10 – 40% de lípidos y 5 – 15% de proteínas en peso seco, de los cuales los glucanos (celulosa y almidón) y la mayor parte de los carbohidratos disueltos son convertidos en metabolitos durante la fermentación, mientras que la fracción difícilmente hidrolizable está conformada principalmente por proteínas, lípidos, hemicelulosa y lignina (López-Gómez et al., 2019; Moreno et al., 2021). Además, contiene nutrientes de los cuales el 74% son solubles en agua sin necesidad de la aplicación de pretratamiento (Bhaskar et al., 2021). Trabajos previos como el de Campuzano & González-Martínez (2016) han registrado valores de nitrógeno y fósforo de 5.4 y 1.8 g/kg_{FORSU} en la FORSU producida en la Ciudad de México.

2.1.2. Clasificación de la FORSU

Los procesos relacionados con la recuperación de energía desde la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos pueden verse afectados por la forma en que estos son recolectados. De acuerdo a Kumar et al. (2019), dependiendo del sistema de recolección, la FORSU puede ser clasificada en:

- Residuos biológicos: materia orgánica proveniente de un sistema de recolección con clasificación en el origen.
- Mezclada: materia orgánica proveniente de un sistema de recolección sin clasificación en el origen.
- Residuos remanentes: materia orgánica que queda después de la recolección de residuos biológicos.

La FORSU clasificada en el origen (SS-OFMSW, por sus siglas del inglés source-sorted organic fraction of municipal solid waste), o comúnmente denominada residuos biológicos, no se mezclan con el resto de residuos generados (que generalmente inhiben la actividad bacteriana) y frecuentemente están constituidos de un 60% de restos de comida y 30% de residuos de jardinería (Moreno et al., 2021). En comparación con la FORSU, la DQO de los restos de comida (90 - 170 g/L) suele ser casi la mitad (150 - 350

g/L) (Cheah et al., 2019). Por otro lado, la FORSU sin clasificar en el origen (NS-OFMSW, por sus siglas del inglés non source-sorted organic fraction of municipal solid waste) esta mezclada con otro tipo de materiales en su mayoría inorgánicos, lo cual reduce la calidad del residuo biológico que es utilizado como materia prima para la producción de biocombustibles.

En los últimos años, varios países han implementado plantas procesadoras que permiten separar estas dos fracciones a través de sistemas de clasificación mecánica (MS-OFMSW, por sus siglas del inglés mechanically sorted organic fraction of municipal solid waste), como tambores rotatorios (RDR-OFMSW, por sus siglas del inglés rotary drum sorted organic fraction of municipal solid waste) (Barampouti et al., 2019) y una novedosa tecnología desarrollada en China que aprovecha las fuerzas asociadas a la flotación y hundimiento de materiales en agua (WS-OFMSW, por sus siglas del inglés water sorted organic fraction of municipal solid waste) (Dong et al., 2010).

De acuerdo a Darvishi-Harzevili & Hiligsmann (2018), la FORSU también puede ser clasificada según su biodegradabilidad en:

- Fracción orgánica digerible: materia orgánica fácilmente degradable como residuos de cocina, residuos de poda de césped y papel.
- Fracción combustible: Materia orgánica de difícil digestión y no digerible como madera, cartón, plástico y materiales sintéticos.
- Fracción inerte: piedras, arena, vidrio, metales y huesos.

Generalmente, el contenido de materia orgánica de un sustrato está determinado por la cantidad de sólidos volátiles (SV). Según Mata-Álvarez (2003), en procesos de digestión anaerobia, solamente una parte de los sólidos volátiles pueden ser convertidos en biogás. Esto debido principalmente a que la FORSU, además de contener sólidos volátiles biodegradables, contiene sólidos volátiles refractarios como la lignina misma que no es fácilmente degradada por bacterias anaerobias y requiere largos períodos para ser degradada completamente (Kayhanian, 1995).

La lignina contenida en la FORSU no puede ser convertida directamente por las bacterias en ningún tipo de biocombustible (Mahmoodi et al., 2018a), debido a ello, se han aplicado

tratamientos para deslignificar la FORSU previo a su uso como sustrato. Aunque los tratamientos más comunes están enfocados en la aplicación de sustancias químicas debido a su rapidez y eficiencia en la despolimerización de este compuesto, pueden formarse compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano. En la naturaleza la lignina es degradada naturalmente principalmente por hongos y un grupo pequeño de bacterias equipadas con enzimas especializadas (*Sterptomyces*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*) (Lee et al., 2019); aunque existen muy pocos estudios relacionados con la deslignificación biológica de la FORSU, estudios como el de Semeraro et al. (2021), han obtenido un aumento en la producción de biogás de hasta el 100% a partir de la codigestión de residuos de poda y FORSU a través de la inoculación de hongos degradadores de lignina.

2.2. Fermentación

La fermentación (hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis) es la fase inicial de la digestión anaerobia de compuestos orgánicos donde se forman compuestos intermediarios que luego serán convertidos a metano, dióxido de carbono e hidrógeno (es decir, biogás) en la fase de metanización (**Figura 2-1**). En el caso de biomasas lignocelulósicas como la FORSU, la velocidad de hidrólisis limita la velocidad de la fermentación global (Reis et al., 2011) y, por tanto, la digestión anaerobia (Henze et al., 2008).

2.2.1. Hidrólisis

El proceso inicia con la hidrólisis de biomoléculas complejas suspendidas, coloidales y disueltas que no son asimilables para los microorganismos hasta compuestos disueltos de bajo peso molecular (monómeros y oligómeros). El proceso de degradación natural de polímeros complejos es catalizado por la acción de enzimas extracelulares (**Tabla 2-1**) secretadas por bacterias fermentativas (Maddela-Raju et al., 2021) que son adsorbidas en la superficie de la materia orgánica particulada (Darvishi-Harzevili & Hilgsmann, 2018). Estas enzimas, también llamadas hidrolasas, pueden ser esterases (hidrolizan enlaces éster de los lípidos), glicosidasas (hidrolizan enlaces glucosídicos de los carbohidratos) o peptidasas (hidrolizan enlaces peptídicos de las proteínas) (Kang & Yuan, 2017).

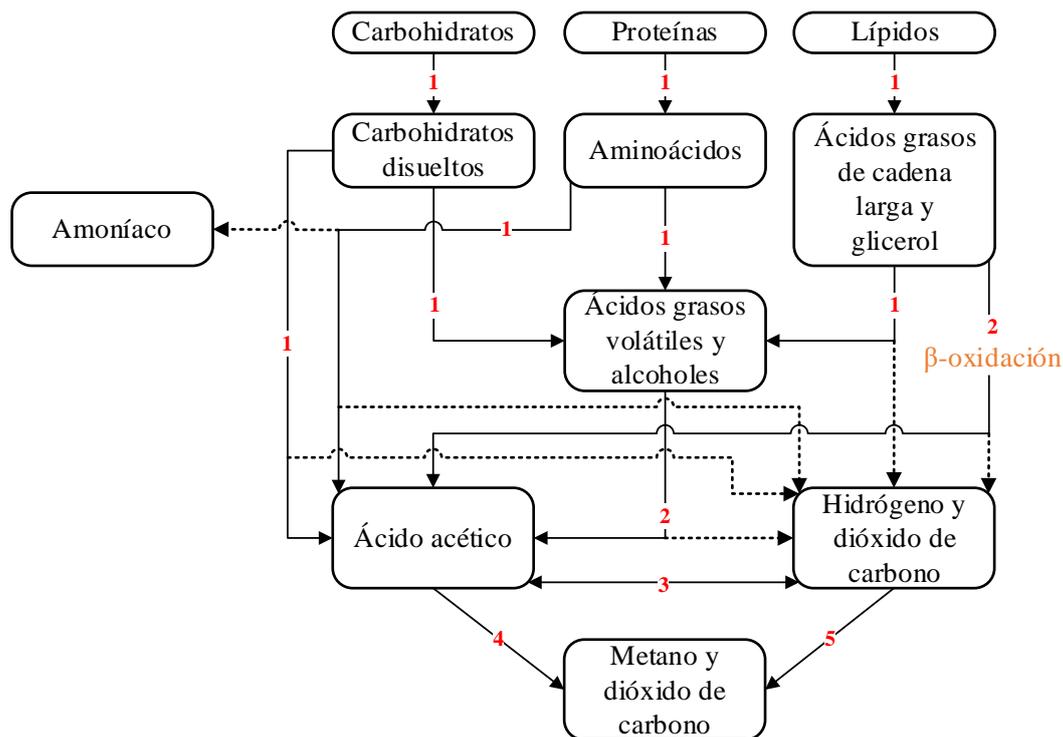


Figura 2-1. Diagrama esquemático de la digestión anaerobia completa de la materia orgánica.

Los números indican el tipo de bacteria asociada al proceso.

1. Bacterias fermentativas
2. Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno
3. Bacterias acetogénicas consumidoras de hidrógeno (homoacetogénesis)
4. Bacterias acetogénicas metanoclásticas
5. Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas

Fuente: Adaptado de Sanders (2001) y Nayono (2010)

Tabla 2-1. Grupos de enzimas hidrolíticas y productos

Sustrato	Enzima	Productos
Proteínas	Proteasa o peptidasa	Aminoácidos
Celulosa	Celulasa	Celobiosa y glucosa
Hemicelulosa	Hemicelulasa	Azúcares (glucosa, xilosa, manosa y arabinosa)
Almidón	Amilasa	Glucosa
Grasas	Lipasa	Ácidos grasos de cadena larga y glicerol
Pectinas	Pectinasa	Azúcares (galactosa, arabinosa)

Fuente: Tomado de Darmawan & Aziz (2022)

En procesos de digestión anaerobia, microorganismos como *Clostridium*, *Proteus vulgaris*, *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* han sido reportados como grupos típicos de bacterias

hidrolítico-fermentativas (Kang & Yuan, 2017). Miembros del género *Bacillus*, por ejemplo, están equipados con enzimas robustas que son secretadas en un orden específico y en ausencia de compuestos de bajo peso molecular permitiéndoles degradar polímeros como el almidón y otros polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos en compuestos fácilmente metabolizables (Hui & Khachatourians, 1995).

2.2.1.1. Tratamientos previos aplicados a la FORSU para mejorar la hidrólisis

Varias de las investigaciones relacionadas con el aprovechamiento de la FORSU, están enfocadas en solubilizar los biopolímeros hasta monómeros fácilmente asimilables por los microorganismos durante la acidogénesis y/o acetogénesis como las hexosas (glucosa, fructosa, galactosa, manosa) y/o pentosas (xilosa, ribosa, arabinosa, ramnosa). Esto debido a que la FORSU es una sustancia polimérica biodegradable, es decir, con un alto contenido de sólidos volátiles, que pueden degradarse hasta monómeros durante la hidrólisis (aumentando la DQOs) y, posteriormente, estos compuestos simples son transformados a metabolitos en la fase de acidogénesis (Soomro et al., 2019).

Las distintas investigaciones se han enfocado principalmente en estudiar el efecto de la aplicación combinada de tratamientos físicos, químicos y/o enzimáticos a fin de mejorar la hidrólisis de macromoléculas de la FORSU debido principalmente a su elevada heterogeneidad y a la presencia de productos de difícil degradación. Es así que, mediante procesos de tratamiento previo, se han llegado a obtener eficiencias de solubilización de entre el 81 y 91% de la materia orgánica particulada contenida en la FORSU (Barampouti et al., 2019).

En general, los procesos de tratamiento previo a la obtención de metabolitos a partir de la FORSU constan de dos partes fundamentales: a) tratamientos fisicoquímicos, que ayudan a solubilizar el material orgánico y b) hidrólisis enzimática, donde se adicionan enzimas para transformar principalmente la celulosa y almidones en glucosa. La mayor parte de las investigaciones evalúan el efecto de los tratamientos previo a la hidrólisis enzimática por lo que comparan su efecto sobre una muestra de FORSU tratada únicamente con la adición de enzimas (**Figura 2-2**) (Mahmoodi et al., 2018a; Mahmoodi et al., 2018b; Ebrahimian et al., 2020; Moreno et al., 2021).

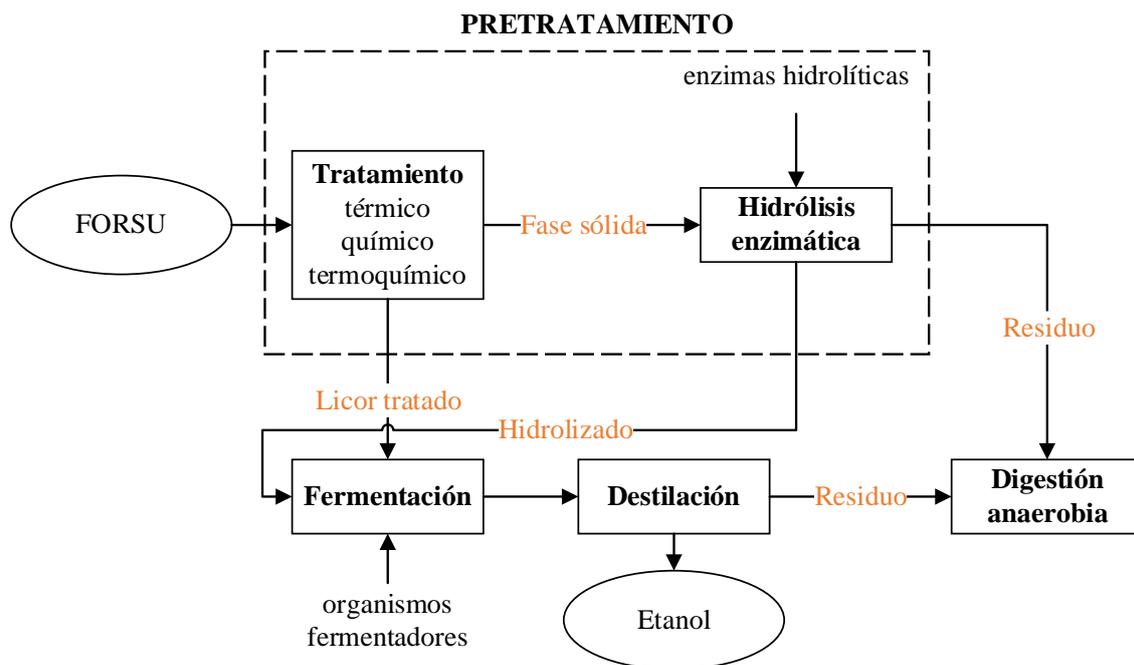


Figura 2-2. Conversión biológica de la FORSU hasta etanol y metano

Fuente: Adaptado de Mahmoodi et al. (2018a); Mahmoodi et al. (2018b); Ebrahimian et al. (2020)

➤ Glucosa

Los pretratamientos aplicados a la FORSU, con el fin de obtener principalmente glucosa, han sido estudiados ampliamente y las configuraciones de los procesos difieren entre los autores. Moreno et al. (2021), evaluaron los rendimientos finales de un proceso de presacarificación donde registraron rendimientos de producción de glucosa promedio de 63% (45 - 82%) y 50% (43 - 56%) para muestras de la FORSU clasificadas (SS-OFMSW) y sin clasificar en el origen (NS-OFMSW), respectivamente. Por otro lado, trabajos como los de Mahmoodi et al. (2018a), Mahmoodi et al. (2018b) y Ebrahimian et al. (2020) evalúan el efecto de la aplicación de distintas soluciones químicas y el tiempo de contacto con la FORSU previo a la utilización de enzimas hidrolíticas; los dos últimos autores cuantificaron la cantidad de glucosa obtenida tanto en el licor de pretratamiento como en el obtenido luego de la hidrólisis enzimática (**Tabla 2-2**).

Una vez aplicado el pretratamiento a la FORSU, el licor de pretratamiento es separado de la fase sólida a través de filtración o centrifugación. De acuerdo a la literatura citada anteriormente, los sólidos generalmente son lavados y secados antes de ser hidrolizados

mediante la agregación de enzimas, mientras que la corriente líquida o licor puede ser fermentada directamente con la adición de determinados microorganismos para la obtención de metabolitos, o puede ser tratada con enzimas (amilasas, α -amilasas y/o glucoamilasas) para transformar los almidones solubilizados en glucosa (Mahmoodi et al., 2018b). Al finalizar el proceso de hidrólisis enzimática, se obtiene un hidrolizado (fracción líquida) y un residuo sólido; en el primer caso, se adiciona una cepa de microorganismos a fin de fermentar el hidrolizado, mientras que en el segundo caso los sólidos son sometidos a digestión anaerobia para producir metano (Acton, 2013). El fermentado obtenido de las distintas corrientes tratadas es destilado para separar el etanol del resto de materiales y esta corriente residual es sometida a digestión anaerobia.

Tabla 2-2. Concentraciones de glucosa obtenidas mediante la aplicación de distintos tratamientos a la FORSU

	Moreno et al. (2021)	Ebrahimian et al. (2020)	López-Gómez et al. (2019)	Mahmoodi et al. (2018a)	Mahmoodi et al. (2018b)	
Tratamiento	%ST	20	10	–	10	
	T (°C)	50	120 y 160	–	130 y 160	
	pH	5	–	–	–	
	t (horas)	24 – 48	0.5 y 1	–	0, 0.5 y 1	
	Solución aplicada	–	Etanol-agua 85% v/v	–	H ₂ SO ₄ 0.5 y 1% Agua	
Referencia (g/L)	–	–	34.2	–	10.3	
SS-OFMSW (g/L)	–	–	–	–	4.2 – 43.3	
	%ST	20	5	20	5	
	Enzimas	celulasas amilasas	celulasas α -amilasas glucoamilasas	celulasas amilasas	celulasas	celulasas α -amilasas glucoamilasas
Hidrólisis enzimática	T (°C)	35	45 90 65 4.8	50	45	45 90 65 4.8
	pH	5.5	6 4.5 72	5	4.8	6 4.5 72
	t (horas)	48 – 72	2 24	72	72	2 30
SS-OFMSW (g/L)	46 – 98	40.9	55.4	16.7 – 23.4	30.5 – 48.7	
NS-OFMSW (g/L)	30 – 47	–	47.2	–	–	
RDR-OFMSW	–	–	36.8	–	–	

En general, se observa que la aplicación de ácido sulfúrico diluido a elevadas temperaturas permite incrementar la concentración de glucosa en el licor obtenido en comparación con otros tratamientos, sin embargo, pese a que la aplicación de

pretratamientos termales y termoquímicos solubilizan una gran parte de los sólidos de la FORSU, durante el proceso se pueden producir compuestos recalcitrantes como el 5-hidroxi-metil furfural (HMF) (a partir de las hexosas) y furfurales (a partir de la pentosas), lo que puede provocar una disminución en la tasa de crecimiento específico de organismos. Si la temperatura de tratamiento supera los 140°C, los azúcares pueden reaccionar con los aminoácidos formando melanoidinas las cuales son difíciles de degradar (Verma, 2020), por lo que este tipo de tratamientos pueden inhibir el crecimiento bacteriano durante la fermentación.

➤ Xilano (xilosa)

Los xilanos son el principal componente hemicelulósico de la FORSU y su degradación se ve afectada significativamente por las condiciones de pretratamiento aplicadas. Por ejemplo, Ebrahimian et al. (2020) observaron que el pretratamiento a 120°C durante 0.5 y 1 hora transformaron el 52.8% y el 56.4% de xilanos en xilosa, respectivamente. Sin embargo, si se aplican temperaturas más altas en torno a 160°C existe una mayor eliminación de xilano (más del 65%). Otro método común es la aplicación de ácidos fuertes diluidos a temperaturas elevadas para solubilizar compuestos hemicelulósicos y mejorar la producción de azúcares para su posterior fermentación, es así que Mahmoodi et al. (2018) observaron que los xilanos pueden liberarse completamente desde la fracción sólida a la fracción líquida aplicando H₂SO₄ al 0.5% durante 1 hora a 160°C o H₂SO₄ al 1.0% durante 0.5 horas a 160°C. En función de estas condiciones, evidenciaron un aumento en la concentración de xilosa desde 1.73 (t = 0 horas) a 1.95 g/L, para el primer caso, por el contrario, para el segundo caso existió una reducción en la concentración desde 1.90 (t = 0 horas) a 1.75 g/L.

López-Gómez et al. (2019) demostraron que después de la glucosa, la xilosa es el azúcar más consumido en las primeras 12 horas del proceso de fermentación de la fracción orgánica de residuos sometidos a un proceso de hidrólisis enzimática y fermentación, ya que observaron una disminución en la concentración de 10.8 a 3.7 g/L y de 11.5 a 3.1 g/L para muestras de residuos orgánicos clasificados en el origen (SS-OFMSW) y recuperados de un tambor rotatorio (RDR-OFMSW), respectivamente.

2.2.2. Acidogénesis y acetogénesis

Una vez que la FORSU se ha hidrolizado en compuestos más simples, los microorganismos, generalmente quimiorganótrofos, utilizan las hexosas y pentosas como fuente de carbono y energía para el crecimiento celular y formación de productos. Los metabolitos se forman según la función celular asociada a una ruta metabólica particular; por ejemplo, los alcoholes (metanol, etanol, etc.), se derivan de la producción de energía en el interior de las células, mientras que los ácidos orgánicos se generan en el ciclo del ácido cítrico durante la producción de biomasa y energía (Wilson et al., 2020). Estos metabolitos formados durante el metabolismo de los microorganismos también se denominan metabolitos primarios (Pele & Cimpeanu, 2012).

Según Madigan et al. (2015), la fermentación se clasifica por el sustrato que se fermenta o por los productos que se forman. Los metabolitos pueden aparecer como producto principal o secundario de la fermentación de hexosas o pentosas en bacterias anaerobias y facultativas (Schlegel et al., 1997) a través de distintas vías como las que se muestran en la **tabla 2-3**.

Tabla 2-3. Tipos de fermentación

Tipo	Reacción
Alcohólica	Hexosas ^a → 2 etanol + 2 CO ₂
Heteroláctica	Hexosas → ácido láctico + etanol + CO ₂ + H ⁺
Homoláctica	Hexosas → ácido láctico
Ácido mixta ^{b,c}	Hexosas → etanol + 2,3-butanodiol + succinato ²⁻ + ácido láctico + ácido acético + ácido fórmico + H ₂ + CO ₂

^aLa glucosa es el sustrato inicial de la glucólisis. No obstante, se pueden fermentar otros muchos azúcares C₆ (hexosas) tras su transformación a glucosa.

^bNo todos los organismos producen todos los productos. En concreto, la producción de butanodiol está limitada a ciertas enterobacterias. La reacción no está igualada.

^cTambién otros productos residuales como acetato y etanol en pequeñas cantidades (solo en la fermentación del butanol).

Varios trabajos relacionados con el aprovechamiento de la FORSU para la obtención de productos con valor agregado, también se han enfocado en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) como los ácidos acético (C₂), propiónico (C₃), butírico (C₄), valérico (C₅) y caproico (C₆) (Cheah et al., 2019; Gameiro et al., 2016), ácidos orgánicos (ácido láctico), alcoholes (metanol y etanol) (Castellón-Zelaya & González-Martínez, 2021;

Jojoa-Unigarro & González-Martínez, 2021; López-Gómez et al., 2019) e hidrógeno (Ebrahimian et al., 2020).

Gameiro et al. (2016) y Cheah et al. (2019), por ejemplo, evaluaron la producción de AGV durante la fermentación hidrolítica-acidógena de la FORSU variando parámetros como la alcalinidad y la concentración de sólidos. Esto se debe a que los AGV pueden ser usados como fuente de carbono para sintetizar polihidroxialcanoatos (PHA), entre ellos, la proporción de ácidos grasos con carbonos pares (AGCP) es particularmente importante. El aumento de la proporción de AGCP en los AGV puede aumentar la proporción del ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB) en el monómero de los PHA que mejoran las propiedades de algunos productos sintéticos (antimicrobianos, inhibidores de la corrosión, biodiésel, lípidos, bioplásticos y plásticos degradables) (Chen et al., 2021), mientras que los ácidos grasos con carbonos impares conducen a la formación de hidroxivalerato (Vergine et al., 2015).

Trabajos realizados por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) y Jojoa-Unigarro & González-Martínez (2021), por otro lado, evaluaron la producción de metabolitos únicamente utilizando la microflora nativa asociada a la FORSU de manera natural. El estudio realizado por el primer autor en cuestión, estuvo enfocado en evaluar el efecto del ensilaje (fermentación láctica) de la FORSU y su efecto sobre la producción de metano con base en la variación de parámetros como la temperatura (20, 35 y 55°C) y la concentración de sólidos (10, 20 y 28%). De la investigación realizada observaron que, independientemente de la variación de parámetros, el ácido láctico siempre se forma en primer lugar seguido del etanol y ácido acético; en conjunto, estos tres metabolitos pueden llegar a conformar hasta el 95% de los metabolitos totales producidos lo que sugeriría que la fermentación predominante para este sustrato es heteroláctica. Aunque el aumento de la concentración de sólidos disminuye la producción de metabolitos, la reducción es debida a la baja producción de ácido láctico; mientras que la producción de etanol se ve afectada mínimamente lo que indicaría que un aumento en la concentración de sólidos favorece de cierto modo una fermentación alcohólica. Además, pese a que el incremento en la concentración de sólidos impulsa la formación de etanol, se han presentado algunos casos en los que ha sido necesario limitar el contenido de sólidos a un 10% (w/w) ya que el alto contenido de sustrato incrementa la viscosidad y dificulta la transferencia de masa (Tomás-Pejó et al., 2008).

➤ Ácido láctico

La producción de este metabolito puede ser a través de dos vías: homoláctica (no gaseosa) o heteroláctica (gaseosa). La fermentación heteroláctica o heterofermentativa de la glucosa es una *adaptación* desarrollada por las bacterias del ácido láctico (BAL), que están más especializadas en pentosas (por ejemplo, xilosa, ribosa, arabinosa), para utilizar las hexosas como sustrato (Fuchs et al., 2017) mediante la vía de las pentosas fosfato (PPP) también conocida como vía de la fosfocetolasa o fosfogluconato (König et al., 2017). En consecuencia, las BAL convierten la glucosa-6-fosfato en 6-fosfogluconato en lugar de fructosa-6-fosfato durante la fermentación. En el caso de las BAL heterofermentativas obligatorias poseen una enzima denominada fosfocetolasa lo que les permite oxidar las hexosas y pentosas hasta ácido láctico, etanol, CO₂ y ácido acético por la vía PPP, mientras que las BAL heterofermentativas facultativas utilizan la vía glucolítica (poseen fructosa 1,6 difosfato aldolasa) para metabolizar hexosas y sintetizar también una fosfocetolasa inducible que les permite metabolizar pentosas (Pandey et al., 2018) hasta lactato y acetato (Wood & Holzapfel, 1995). Se conoce también que gran parte de las BAL requieren para su crecimiento de uno o más aminoácidos (Kurbanoglu & Kurbanoglu, 2003) los cuales obtienen gracias a su sistema proteolítico con el cual pueden convertir proteínas en péptidos y estos a su vez en aminoácidos (Karunaratne & Pamunuwa, 2017).

La vía heterofermentativa es utilizada por las BAL para generar compuestos antifúngicos, como los ácidos acético y propiónico, que inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables responsables de la degradación anaerobia (levaduras, clostridios, enterobacterias) o aerobia (levadura, bacilos, listeria, mohos) de la materia orgánica (Doelle et al., 2009; Vinderola, 2019). Generalmente, durante la degradación de los alimentos, parte sustancial de la FORSU, las BAL heterofermentativas aparecen al inicio de la fermentación conjuntamente con organismos indeseables como las enterobacterias provocando que el medio se acidifique, cuando el pH es de alrededor de 5 las BAL homofermentativas, que son tolerantes al pH ácido y producen ácido láctico que reduce más rápidamente el pH, aumentan en número mientras que la cantidad de organismos de la comunidad inicial disminuye (Katz, 2012). A medida que transcurre el proceso de fermentación el pH puede reducirse hasta alcanzar valores entre 3 y 4, inhibiendo de este modo patógenos, microorganismos descomponedores (Wu et al., 2018) e inclusive las

mismas bacterias lácticas, dejando únicamente organismos ácido-tolerantes como las levaduras (Bamforth & Cook, 2019; Davidson et al., 2005). La inhibición bacteriana se debe principalmente a que a pH 4, solamente el 11% del ácido láctico está disociado, mientras que en el caso del ácido acético y propiónico están disociados el 85 y 92%; los ácidos al estar disociados penetran fácilmente la membrana celular debido a que son liposolubles (Salminen et al., 2004).

Por ejemplo, los lactobacilos heterofermentativos facultativos normalmente fermentan las hexosas para formar lactato, sin embargo, si falta glucosa, fermentan las hexosas de forma heterofermentativa para generar ácido láctico, ácido acético, etanol, ácido fórmico y CO₂. Las pentosas se fermentan a lactato y acetato a través del ciclo de la fosfoacetolasa (Krömker & Bruckmaier, 2007). Aunque los estudios sobre la población bacteriana que se encuentra de forma natural en la FORSU son muy escasos e inclusive inexistentes, hay estudios relacionados con la composición de microorganismos en residuos frescos y restos de comida que, de cierto modo, son el componente principal de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

Wilson et al. (2016) analizaron los cambios en la comunidad bacteriana durante la descomposición de residuos frescos con una composición del 82% en masa húmeda de restos de alimentos, 7.25% recortes de césped, 3.5% hojas y 7.25% astillas de madera. Del estudio realizado en tres muestras observaron que la microflora nativa estaba dominada por organismos anaerobios, así como por microorganismos asociados con la descomposición de restos de alimentos. A nivel de orden, los *Lactobacillales* representaron más del 89% de los microorganismos en los residuos frescos identificándose 4 géneros principales: *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*, todos los cuales son anaerobios y toleran los ácidos generados en gran medida durante la fermentación de productos lácteos y verduras.

Una comunidad microbiana similar fue hallada en un estudio realizado por Wu et al. (2018), quienes analizaron durante 72 horas los cambios en la diversidad bacteriana en restos de comida en descomposición provenientes de un comedor, encontrando que las bacterias lácticas fueron el grupo más dominante tanto en temperaturas entre 25 y 28°C, así como entre 30 y 35°C. Además, la comunidad bacteriana en el rango de mayor temperatura era menos diverso en comparación con la de temperatura ambiente. A las 0

horas, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* y *Lactobacillus* fueron los grupos más dominantes a nivel de género, mientras que *Acetobacter* desapareció después de 72 horas en ambas condiciones de temperatura. Las muestras de residuos de comida almacenadas a una temperatura alta estuvieron dominadas por *Lactobacillus*, que representó casi el 90% de todas las bacterias mientras que, en las muestras colocadas a temperatura ambiente, *Weissella* representó alrededor del 40% de la comunidad microbiana seguido por *Lactobacillus* con un 28% en promedio y *Leuconostoc* en un 5%. El trabajo realizado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) durante el ensilaje de la FORSU también sugiere que existen bacterias del ácido láctico de forma natural en este sustrato debido a que se produce ácido láctico, ácido acético y etanol.

Investigaciones relacionadas con el aprovechamiento de la FORSU para obtener ácido láctico, al igual que varios estudios, han sometido este sustrato a hidrólisis enzimática, esterilización e inoculación de cepas productoras de ácido láctico para producir únicamente este metabolito. Por ejemplo, López-Gómez et al. (2019), luego de aplicar un proceso de hidrólisis enzimática a muestras de residuos orgánicos clasificados en la fuente (SS-OFMSW) y recuperados de un tambor rotatorio (RDR-OFMSW), filtraron el hidrolizado para remover partículas gruesas ($\phi > 150 \mu\text{m}$, filtración) y finas ($\phi > 0.2 \mu\text{m}$, microfiltración) en el primer caso, y solo gruesas en el segundo, obteniendo de este modo 5 fracciones líquidas diferentes las cuales fueron sometidas a un proceso de fermentación en discontinuo y por duplicado donde se incorporó un caldo rico en *Bacillus coagulans* A166 y otro en *Bacillus coagulans* A20 a cada tipo de hidrolizado líquido. Cada mezcla fue incubada a 52°C y 400 rpm, ajustando el pH a 6.0 con una solución de NaOH 20% (%w/w). Para el caso de residuos separados en la fuente, en muestras a las cuales se dosificó la cepa de *B. coagulans* A166, cuantificaron concentraciones de ácido láctico de 60.0 g/L (filtración) y 57.7 g/L (microfiltración). Mientras que para aquellas a las que se incorporó la cepa de *B. coagulans* A20 obtuvieron concentraciones de ácido láctico de 51.0 g/L (filtración) y 56.3 g/L (microfiltración). Por otro lado, para el hidrolizado de la muestra de la RDR-OFMSW, el cual solamente fue sometido a filtración, observaron la máxima producción de ácido láctico a las 12 horas de iniciado el experimento donde se alcanzó una concentración de 55 g/L y en las 16 horas posteriores apenas se incrementó hasta una concentración de 63 g/L. Si bien es cierto que las concentraciones de ácido láctico fueron relativamente cercanas, la diferencia principal radicó en el tiempo en que se alcanzó la máxima tasa de producción de ácido acético. Las muestras de residuos

separados a las cuales se les aplicó filtración y microfiltración, y las muestras de residuos mezclados solamente filtrados a las cuales se les incorporó la cepa A166, alcanzaron la máxima tasa de producción entre las 5 y 12 primeras horas de experimentación al igual que las muestras de residuos separados a las cuales se les aplicó solamente filtración, pero con dosificación de la cepa A20. Por otro lado, aquellas muestras de residuos separados a los que se les aplicó solamente filtración y la dosificación de la cepa A166, alcanzaron la máxima tasa de producción de ácido láctico entre las 6 y 18 horas de iniciado el experimento, mientras que a las muestras de residuos separados a las que se les aplicó filtración y microfiltración, con la posterior dosificación de la cepa A20, lograron la máxima tasa de producción de ácido láctico entre las 3 y 8 horas primeras horas de experimentación.

➤ Ácidos grasos volátiles (AGV)

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos es un sustrato ideal para producir AGV mediante fermentación acidogénica. Fernández-Domínguez et al. (2020) analizaron el impacto de la temperatura sobre la producción de AGV utilizando la FORSU clasificada en el origen (SS-OFMSW) proveniente de una Planta de tratamiento mecánico-biológico. Para ello, utilizaron el sobrenadante extraído del digestor anaerobio que primero ha pasado por una etapa de centrifugación para separarlo de los biosólidos; esta fracción líquida pasa a un pulpador que recibe los lixiviados del pozo de entrega de la FORSU y que, a su vez, incorpora el residuo biológico proveniente del transportador balístico para posteriormente conducir la mezcla enriquecida a un sistema de hidrociclones que remueven materiales inertes. Finalmente, esta fracción compuesta por el residuo biológico y el líquido fermentado ingresa nuevamente al digestor anaerobio. De esta última corriente colocaron 200 mL (V_{trabajo}) en botellas de vidrio sin agregar inóculo ni sustancias para regular el pH antes o durante el experimento y realizaron 5 pruebas: A, B y C a 35°C, D a 20, 35 y 45°C, y E a 34, 55 y 75°C. Las pruebas de fermentación por lotes a 35°C mostraron los mayores rendimientos de AGV (0.49-0.59 $g_{\text{DQO-AGV}}/g_{\text{SV}}$) conjuntamente con las máximas concentraciones (23 – 29 $g_{\text{DQO-AGV}}/L$). Además, observaron que la composición de AGV no se ve afectada por la temperatura de fermentación y estuvo dominada por los ácidos acético, propiónico y butírico. No obstante, evidenciaron que a medida que se incrementaba la temperatura de fermentación,

mayor era la DQO soluble asociada a compuestos diferentes a los AGV (alcoholes, aminoácidos, carbohidratos simples) y el nitrógeno amoniacal en el licor de fermentación.

Cheah et al. (2019) estudiaron el efecto del pH sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y su distribución a través de la fermentación acidógena de la fracción orgánica clasificada en origen de los residuos sólidos urbanos (OFMSW) de una planta de tratamiento mecánico-biológico (MBT) en digestores semicontinuos. Para ello, trabajaron en un reactor enchaquetado de 4.5 L de volumen efectivo donde establecieron un tiempo de retención hidráulica (HRT) de 3.5 días bajo condiciones ácidas (pH = 6.0). Los resultados mostraron que la concentración de AGV en el efluente del proceso de fermentación se incrementó entre 13.9 y 16.9% en comparación con el influente, y tenía una composición de AGV individuales similar al de la alimentación (C₂ 35-41%, C₃ 18-22%, C₄ 17-21% y C₅ 9-12%). Por lo tanto, este efluente tenía una proporción (C₂ + C₄)/(C₃ + C₅) ≈ 1.7 – 2.0 y una relación DQO_{AGV}/DQOs alrededor del 23%.

2.2.2.1. Estrategias de fermentación para la obtención de etanol a partir de la FORSU

Las investigaciones relacionadas con el aprovechamiento de la FORSU son muy amplias y varían según el tipo de producto que se desea obtener. En el caso de la producción de etanol, de acuerdo a Kumar & Sani (2018) y Bhaskar et al. (2021), existen varias estrategias de fermentación para la obtención de etanol a partir de la FORSU. Los diversos parámetros que se deben considerar para seleccionar una estrategia de fermentación particular son el tiempo de incubación, el volumen de inóculo, la temperatura, el metabolismo involucrado y la carga orgánica (Fernández-Rodríguez et al., 2014), todos los cuales influyen directamente en el rendimiento general.

Las estrategias más comunes son: Hidrólisis y fermentación separadas (SHF, por sus siglas del inglés Separated hydrolysis and fermentation), Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, por sus siglas del inglés Simultaneous saccharification and fermentation), Sacarificación y fermentación simultánea no isotérmica (NSSF, por sus siglas del inglés Non-isothermal simultaneous saccharification and fermentation), Sacarificación y Co-fermentación simultáneas (SSCF, por sus siglas del inglés Simultaneous saccharification and co-fermentation) y Conversión microbiana directa (DMC, por siglas del inglés Direct microbial conversion) / Bioprocesamiento

Consolidado (CBP, por siglas del inglés Consolidated bioprocessing) (Kumar & Sani, 2018) (**figura 2-3**).

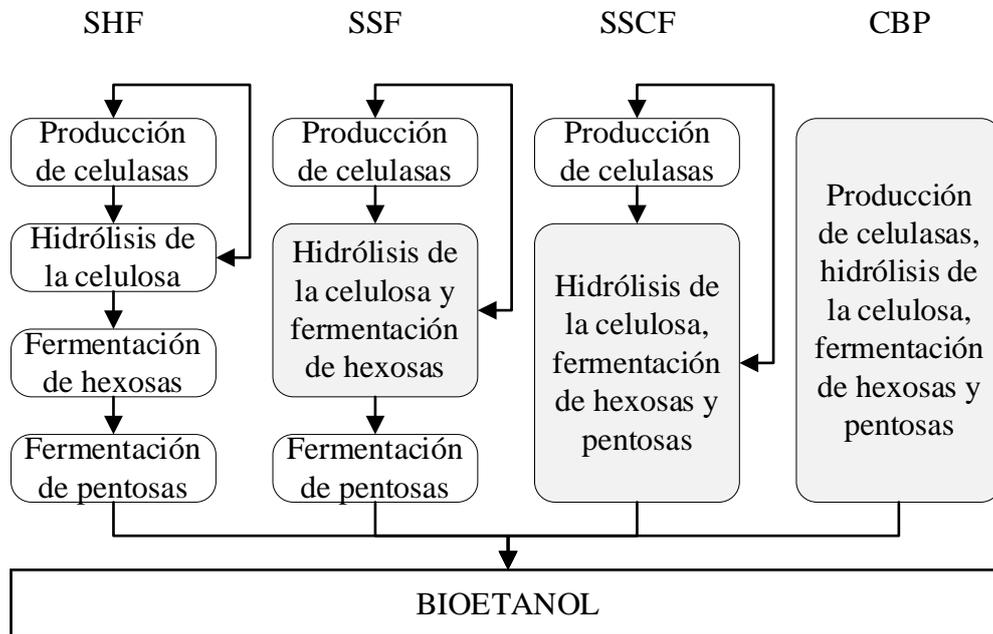


Figura 2-3. Procesos para la producción de azúcares y bioetanol

Fuente: Adaptado de Choudhary et al. (2016) y Liguori et al. (2016)

Los rendimientos derivados de cada método de tratamiento dependen de la configuración del proceso de tratamiento. De todas las configuraciones existentes para la obtención de etanol, la SSF presenta algunas ventajas sobre el resto ya que reduce la producción de compuestos inhibidores durante la hidrólisis, requiere bajos tiempos de residencia y bajos requerimientos de adición de enzimas (Tomás-Pejó et al., 2008).

En general, para producir etanol a partir de la FORSU, es necesario la aplicación de pretratamientos con el fin de convertir los biopolímeros complejos en hexosas y pentosas seguido de la inoculación de cepas específicas para producir etanol. La **tabla 2-4** muestra las diferentes condiciones e inóculos utilizados en la fermentación de la FORSU tratada previamente para producir etanol. Los datos reportados en la tabla mostrada a continuación se encuentran ligados a la información reportada en la **tabla 2-2** donde se establece el tipo de tratamiento previo dado a la FORSU.

Tabla 2-4. Concentraciones de etanol obtenidas a partir de la FORSU pretratada

	Moreno et al. (2021)	Ebrahimian et al. (2020)	Mahmoodi et al. (2018a)	Mahmoodi et al. (2018b)
%ST	20	5	10	10
T (°C)	35	37	37	37
pH	5.5	5.8	–	–
t (horas)	72	72	72	72
Microorganismo inoculado	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> PTCC 1221	<i>Mucor indicus</i> CCUG 22424	<i>Mucor indicus</i> CCUG 22424
Referencia (g/L)	–	5.4	0.25 (licor tratado) 4.9 (hidrolizado)	0.01 (licor tratado con amilasas) 4.8 (celulasas) 10.7 – 18 (licor tratado con amilasas)
SS-OFMSW (g/L)	24 – 52	7.2 – 8.1	6.9 – 10.5 (licor tratado) 1.8 – 19.3 (hidrolizado)	5.9 – 8.4 (hidrolizado con celulasas)
NS-OFMSW (g/L)	17 – 26	–	–	–

➤ Microorganismos utilizados en la producción de etanol

Cuando la FORSU es descompuesta de forma natural, microorganismos fermentativos naturales como las levaduras (*S. cerevisiae*) o bacterias (*Zymomonas mobilis*) convierten los azúcares en etanol mediante la vía metabólica conocida comúnmente como Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), sin embargo, debido a que las levaduras no son capaces de hidrolizar la materia orgánica y dependen de los azúcares disueltos en el medio, su acceso al sustrato es limitado y la producción de etanol es mínima (Bhaskar et al., 2021).

Aunque *S. cerevisiae* no es capaz de excretar enzimas hidrolíticas, es ampliamente utilizado durante la fermentación debido a que tiene una elevada tolerancia a compuestos inhibidores derivados del tratamiento de sustratos lignocelulósicos (Moreno et al., 2021). Además, este organismo es clasificado como facultativo anaerobio y es capaz de adaptarse rápidamente en entornos hiperosmóticos mediante la generación de glicerol (Nevoigt & Stahl, 1997). Esto debido a que, según reporta Navarrete et al. (2014) y Babazadeh et al. (2017), durante la fermentación anaerobia, la cadena respiratoria no es funcional y el NADH generado en relación con el crecimiento celular debe reoxidarse a NAD⁺ mediante la formación de glicerol, para evitar un desequilibrio en la relación NAD⁺/NADH.

Otra de las causas principales por las que este tipo de levadura es utilizada ampliamente es debido a su capacidad seguir produciendo etanol inclusive luego de que su crecimiento se ha detenido (Arora et al., 2004). Varios estudios mencionan que, si bien es cierto que *S. cerevisiae* tiene una alta afinidad por la glucosa, en realidad es capaz de captar otro tipo de azúcares fermentables como sacarosa, fructuosa, maltosa y maltotriosa. Si se fermentan estos azúcares se produce etanol, dióxido de carbono y 2 ATP mientras que, si respira, se produce dióxido de carbono, agua y 38 ATP (Walker & Stewart, 2016).

2.3. Metanogénesis

Luego de que compuestos como alcoholes, AGV y ácidos grasos de cadena larga (AGCL) han sido transformados en ácido acético, hidrógeno y CO₂ mediante bacterias acetogénicas durante la acetogénesis, bacterias metanógenas captan estos sustratos y los transforman en metano en la fase de metanogénesis la cual es la última etapa de la digestión anaerobia. El 66% del metano formado proviene de la descarboxilación del acetato a través de arqueas acetoclásticas, mientras que el 34% restante proviene de la reducción del CO₂ catalizada por el H₂ utilizando arqueas hidrogenofílicas. De acuerdo a Campuzano & González (2015), el potencial de producción de metano a partir de la FORSU depende en gran medida de las características del sustrato, su biodegradabilidad y contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos, así como las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. Además, el proceso de metanización está condicionado por factores como la temperatura a la cual se lleva el proceso, ya que se ha evidenciado que en condiciones termofílicas existe una alta tasa metabólica de los microorganismos y la destrucción de una mayor proporción de organismos patógenos (Zábranská et al., 2000).

2.3.1. Potencial bioquímico de metano (PBM)

La información proporcionada por el PBM es valiosa cuando se evalúan sustratos con potencial para producir metano, y para optimizar el diseño y el funcionamiento de digestores anaerobios (Raposo et al., 2011). Trabajos previos como los de Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), Figueroa-Escamilla (2018) y Campuzano (2013) han evidenciado que luego de someter la FORSU a pruebas de PBM, las curvas de generación de metano exhiben un comportamiento diaúxico asociado principalmente a la

heterogeneidad del sustrato y a la presencia de compuestos disueltos y material orgánico complejo que primero debe ser hidrolizado para ser aprovechado por las bacterias.

Este comportamiento bifásico en un sustrato complejo es típico de un crecimiento bacteriano diaúxico el cual se interpreta como una adaptación para maximizar el crecimiento de la población en entornos de múltiples nutrientes y donde los microorganismos crecen en un medio donde existen dos o más fuentes de carbono. Este tipo de crecimiento bacteriano se caracteriza por presentar dos fases de crecimiento separadas a menudo por una fase prolongada de crecimiento detenido (fase de latencia). En la primera fase exponencial, las bacterias captan el sustrato menos complejo y de mayor preferencia hasta agotar su suministro antes de sintetizar las enzimas necesarias para metabolizar el nutriente menos preferido; esta estrategia optimiza el crecimiento. Durante la fase de latencia, las bacterias metabolizan enzimas para degradar los compuestos complejos antes de iniciar una segunda fase de crecimiento. En la segunda fase exponencial, el sustrato más complejo es degradado hasta compuestos simples a través de enzimas periféricas (**Figura 2-4**) (Chu & Barnes, 2016).

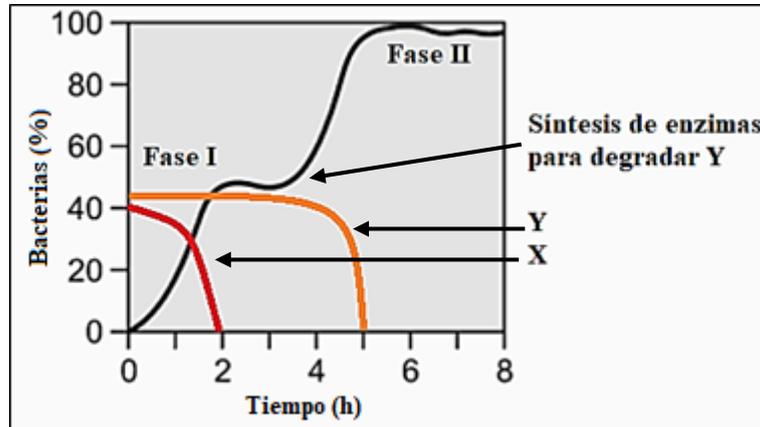


Figura 2-4. Crecimiento diaúxico en presencia de dos sustratos

Fuente: Adaptado de Dubey (2014)

Según Narang & Pilyugin (2007), para que exista un crecimiento diaúxico, las células deben detectar que los nutrientes están disponibles en su entorno y responder en consecuencia. La capacidad de detectar la disponibilidad de nutrientes en el entorno y, en consecuencia, modular el crecimiento, el consumo de energía y la producción de biomasa es fundamental para la aptitud competitiva y la adaptación de los organismos unicelulares (Steach & Cha, 2018).

2.3.2. Rendimiento del digestato sólido

Para evaluar el potencial de metano de la FORSU fresca y fermentada, Moreno et al. (2021) aplicaron pruebas de potencial bioquímico de metano al residuo sólido extraído del proceso de destilación del fermentado obtenido luego de aplicar un proceso de presacarificación y NSSF a muestras de residuos sólidos clasificados (SS-OFMSW) y sin clasificar en el origen (NS-OFMSW). Para ello, realizaron pruebas de PBM en discontinuo y por triplicado a 35°C y 150 rpm utilizando frascos de vidrio con un $V_{total} = 120$ mL y $V_{trabajo} = 70$ mL. Para el ensayo del potencial bioquímico de metano (PBM), la relación entre la cantidad de sustrato e inóculo ($S/I = SV_{sustrato}/SV_{inóculo}$) fue de 1/2 (donde SV se refiere a sólidos volátiles). El pH fue ajustado a 7.5 solamente al comienzo del ensayo mediante el suministro de 0.5 g de $CaCO_3/L$ a cada botella para amortiguar el sistema (**Tabla 2-5**).

Trabajos como los de Mahmoodi et al. (2018a), Mahmoodi et al. (2018b) y Ebrahimian et al. (2020) realizaron las pruebas de metanización en discontinuo a 37°C, utilizando frascos de vidrio oscuro con un $V_{trabajo} = 118$ mL donde se colocaron 0.25 g de sustrato (basado en sólidos volátiles SV), 20 mL de inóculo y 5 mL de agua desionizada. El primer autor realizó este proceso durante 45 días, mientras que los dos restantes extendieron la prueba 5 días más. Para establecer el blanco colocaron un volumen de inóculo y agua desionizada con el fin de determinar la producción endógena de metano.

Ebrahimian et al. (2020) sometieron a digestión anaerobia únicamente la fracción sólida obtenida del proceso de hidrólisis enzimática, mientras que Mahmoodi et al. (2018a) y Mahmoodi et al. (2018b) analizaron las fracciones sólidas residuales obtenidas de 3 etapas distintas del proceso de pretratamiento ácido, hidrólisis enzimática y fermentación etanólica aplicados a muestras de la FORSU: el residuo sólido obtenido de la hidrólisis enzimática, el residuo sólido obtenido luego de la destilación del hidrolizado sometido a fermentación etanólica y el residuo sólido obtenido luego de la destilación de la fracción líquida (obtenida del proceso de pretratamiento ácido) sometida a fermentación (**Tabla 2-5**).

Tabla 2-5. Metanización de las fracciones sólidas obtenidas del proceso de fermentación de la FORSU

	Unidades	Moreno et al. (2021)	Ebrahimian et al. (2020)	Mahmoodi et al. (2018a)	Mahmoodi et al. (2018b)
T	°C	35	37	37	37
pH	–	7.5			
t	horas	28	45	50	50
S/I	–	1/2		$\frac{0.25 \text{ g}_{\text{sustrato}} \text{ (SV)}}{20 \text{ mL}_{\text{inóculo}} + 25 \text{ mL}_{\text{H}_2\text{O}}}$	
Inóculo	–	Lodo de PTAR	Lodo de digestor anaerobio mesofílico		
Referencia SS-OFMSW	L-CH ₄ /kg _{sv}	381 ± 18	285	271	415
		385 ± 7	148 – 273	143 – 295	281 – 662
Referencia NS-OFMSW	L-CH ₄ /kg _{sv}	240 ± 4	–	–	–
		322 ± 3	–	–	–

La generación de metano a partir de la fracción sólida de la FORSU fermentada es variable y, como se observa en la literatura recopilada, depende de varios factores como el tipo de metabolitos a producir, el inóculo, la relación S/I, la duración de la prueba, la temperatura, pH, entre otros. Además, se debe tomar en consideración que el tipo de pretratamiento realizado a la FORSU y el método de separación y tratamiento de los sólidos (filtración, centrifugación, secado) también puede incrementar la variabilidad en la producción de biogás en general. No obstante, se observa en algunos casos que la producción de metano es mayor en comparación con la FORSU fresca, sugiriendo que las fracciones sólidas obtenidas independientemente del tipo de pretratamiento y fermentación presentan un mayor grado de digestibilidad en comparación con la FORSU sin fermentar (Moreno et al., 2021).

3. METODOLOGÍA

3.1. Planificación de la campaña de muestreo de residuos orgánicos

3.1.1. Fase de Campo

3.1.1.1. Selección del día de monitoreo

La FORSU usada en experimentación fue obtenida de los residuos orgánicos generados en la Ciudad de México que son recolectados mediante un sistema con clasificación en la fuente (SS-OFMSW). El muestreo se realizó en la estación de transferencia localizada en Coyoacán donde ingresan en promedio cerca de 128 toneladas/día de residuos orgánicos (20.4%), generados en las alcaldías de Coyoacán, Tlalpan, Xochimilco, Álvaro Obregón y La Magdalena Contreras, cuyas eficiencias en la recolección de residuos orgánicos son del 70, 66, 56, 23 y 59%, respectivamente (SEDEMA, 2019). La selección de los días para realizar el monitoreo se realizó en función de lo estipulado por la Gaceta Oficial de la Ciudad de México (2019), donde se establece que la recolección de residuos biodegradables susceptibles de ser aprovechados corresponden a los días martes, jueves y sábado.

3.1.1.2. Selección de la muestra

De acuerdo a la SEDEMA (2019), existen cerca de 123 vehículos de doble compartimento que ingresan a descargar los residuos en la estación de transferencia de Coyoacán. De este total, se escogieron aleatoriamente 15 para realizar el muestreo de residuos orgánicos. A cada camión se le pidió que descargara parte de los residuos en el piso para tomar una muestra de entre 30 y 50 kg por camión para tener un total de entre 450 y 750 kg de muestra. Posteriormente, siguiendo la metodología establecida por la Norma Mexicana NMX-AA-15-1985, se homogenizó la muestra y se cuarteó eliminando las esquinas opuestas hasta dejar una muestra de 50 kg. Adicionalmente, se tomó una porción de los residuos cuarteados para determinar el peso volumétrico *in situ*, siguiendo la metodología de la Norma Mexicana NMX-AA-19-1985.

3.1.1.3. Transporte y almacenamiento de la muestra

Los residuos orgánicos fueron empacados en bolsas con cierre hermético y transportados hasta las instalaciones del Instituto de Ingeniería donde se limpiaron y se almacenaron a una temperatura de -20°C .

3.1.2. Fase de Laboratorio

3.1.2.1. Preparación de la FORSU

Debido a que la FORSU de la zona de estudio presenta una elevada heterogeneidad, ésta fue sometida a tratamiento mecánico para reducir el tamaño de partícula y obtener una muestra más homogénea. Para ello, la FORSU fue triturada mediante el uso de una licuadora tipo industrial marca International, posteriormente, los restos se pasaron por un extrusor marca Advance RH, modelo MOLAI – 22, con diámetro de orificio de cedazo de 8 mm (Castellón-Zelaya & González-Martínez, 2021) (**Imagen 3-1**). La muestra extrudida fue colocada sobre el mesón de trabajo y se homogenizó nuevamente de forma manual antes de su análisis. Posteriormente, se registró el peso de una probeta de 25 mL y se agregó FORSU con el fin de determinar su densidad, donde se obtuvo un valor de 1.0355 g/mL, mismo que es cercano al valor de densidad del agua. Se tomaron 100 gramos de muestra la cual fue centrifugada con el fin de caracterizar la fracción líquida y disuelta, y evaluar la producción de metano de la fracción sólida de la FORSU fresca.



Imagen 3-1. FORSU extrudida y homogenizada

3.1.2.2. Caracterización de la FORSU

Con el fin de conocer las propiedades de la FORSU previo a su utilización como sustrato, se evaluaron las características físicas, químicas y bromatológicas. El detalle de las técnicas utilizadas se encuentra estipulado en las **tablas 3-1, 3-2 y 3-3**, respectivamente.

a) Características físicas

Tabla 3-1. Características físicas de la FORSU

Parámetro	Método	Descripción	Referencia
Humedad (%H)	2540-B	$\%H = \frac{B - C}{B - A} \cdot 100$	Adaptado de APHA (2017)
Sólidos Totales (ST)	2540-B	$\%ST = \frac{C - A}{B - A} \cdot 100$	
Sólidos Totales Fijos (STF)	2540-E	$\%STF = \frac{D - A}{B - A} \cdot 100$	
Sólidos Totales Volátiles (STV)	2540-E	$\%STV = \frac{C - D}{B - A} \cdot 100$	

A: peso del crisol tarado (g)

B: peso de la muestra de FORSU + peso del crisol (g)

C: peso del sólido seco + peso del crisol (105°C) (g)

D: peso de las cenizas + peso del crisol (550°C) (g)

b) Características químicas

Tabla 3-2. Características químicas de la FORSU

Parámetro	Código	Descripción	Referencia
Demanda Química de Oxígeno total (DQO _T) y soluble (DQO _S)	5220-D	Método colorimétrico. Digestión por reflujo cerrado a 150°C, lectura a 600 nm. La fracción soluble es obtenida luego de filtrar la muestra a través de una membrana de 0.45 µm.	
Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK)	4500-NH ₃ C 4500-NH ₃ E	Titulación. Digestión ácida con catalizador de selenio por el método de Wieninger seguida de un proceso de neutralización, destilación y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N.	APHA (2017)
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄)	4500-NH ₃ C 4500-NH ₃ E	Destilación y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N. Determinada en la fracción líquida después de centrifugación de la muestra a 5,000 rpm por 7 minutos.	
pH	-	Medición con potenciómetro.	

c) Características bromatológicas

Tabla 3-3. Características bromatológicas de la FORSU

Parámetro	Descripción	Referencia
Hidratos de carbono totales (CH _T) y solubles en agua (CH _S)	Fotometría. Con fenol y sulfato de hidracina a 490 nm por el método colorimétrico.	DuBois et al. (1956)
Proteínas	Nitrógeno Total Kjeldahl multiplicado por un factor de 6.25.	Palmisano & Barlaz (1996)

3.1.2.3. Fermentación de la FORSU

a) Montaje del experimento

El proceso de fermentación se llevó a cabo en frascos de vidrio de 2 L (un frasco por cada condición experimental) donde se calculó la cantidad de agua potable y FORSU extrudida que deben ingresar a los biorreactores de tal modo que se ajuste la concentración de sólidos a las condiciones mostradas en la **tabla 3-4**, para ello, se tuvo en cuenta la humedad natural de la FORSU. En el presente estudio se evaluaron una fermentación húmeda (%ST < 10), una semiseca (%ST 10 – 20) y una seca (%ST > 20) (Olsson, 2015; Bastidas-Oyanedel & Ejbye-Schmidt, 2019). Como controles del experimento (referencias) se colocaron frascos con el sustrato tomando en cuenta las mismas concentraciones de sólidos, pero sin la adición de la levadura con el fin de evaluar la eficiencia de la población nativa de la FORSU en el proceso de fermentación natural.

Se alimentó FORSU a los reactores y se aforaron con agua potable a 35°C hasta un volumen de 2L (volumen de trabajo) con el fin de ajustar la concentración de sólidos al 10% (200 g_{ST}) y 20% (400 g_{ST}) considerando la humedad natural del sustrato, mientras que en la última condición experimental se colocó la FORSU sin agua, es decir, considerando una concentración de sólidos del 29.2% (584.5 g_{ST}). Para establecer un punto de referencia en la dosificación de levadura se realizaron ensayos preliminares donde se observó que suministrando 6 g_{s. cerevisiae}/kg_{FORSU} y 10%_{ST} se puede lograr una producción de etanol y ácido láctico similar. Una vez establecido el punto de referencia, se procedió a evaluar concentraciones 6, 12 y 24 g_{s. cerevisiae}/kg_{FORSU} para concentraciones de sólidos de 10 y 20 %, mientras que para la prueba con 29.2%_{ST}, solamente se aplicó la

concentración de levadura donde previamente se obtuvo el mayor rendimiento de etanol en las pruebas anteriores que fue de 12 g *S. cerevisiae*/kg_{FORSU}.

Tabla 3-4. Variables experimentales

		Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
		Referencia	C ₁	C ₂	C ₃
Concentración de sólidos (%)	10	0	6	12	24
	20	0	6	12	24
	29.2	0	-	12	-

En la presente investigación se evaluó una levadura comercial cuyas características se encuentran detalladas en la **tabla 3-5**. Mediante el uso de una balanza analítica, se pesó la masa de *S. cerevisiae* a dosificar en cada prueba usando vasos de precipitación esterilizados con calor seco en estufa a 170°C durante 30 minutos; posteriormente, cada vaso fue llevado a un desecador hasta su enfriamiento. Se colocaron 100 mL de agua potable a 35°C en los vasos y se hidrató la levadura durante 5 minutos, inmediatamente el contenido se integró a la mezcla de FORSU/agua que ya se encontraba en los reactores de fermentación. Para asegurar que todo el contenido fue vertido, se lavaron los vasos 3 veces con agua potable. Una vez que se incorporaron todos los elementos se mezclaron durante 5 minutos para homogenizar el contenido de los frascos y se cerraron herméticamente.

Tabla 3-5. Características de la cepa de *S. cerevisiae*

Parámetros fisicoquímicos	Valores
Materia seca	> 95%
Proteína	47.8 ± 5.3%
Pentóxido de fósforo	2.5 ± 0.45%
Parámetros microbiológicos (UFC/g)	
Mesófilas aerobias	< 1 x 10 ⁶
Coliformes totales	< 100
E. Coli	< 10
E. Coli (GEI+)	< 1

b) Operación de los biorreactores

El experimento se llevó a cabo en condiciones mesofílicas a 35°C y sin control de pH durante 72 horas. La temperatura fue controlada mediante baño maría y los frascos de

vidrio fueron cubiertos con plástico para asegurar una temperatura homogénea en todo el reactor. Se utilizaron dos frascos por cada condición experimental, uno sirvió para cuantificar la producción de biogás con el uso de un equipo AMPTS II mientras que el otro fue utilizado para extraer muestras de la FORSU fermentada (**Imagen 3-2**). Además, se calculó la masa de las muestras extraídas del biorreactor en función del cronograma de muestreo mostrado en la **tabla 3-6**, de tal modo que la masa total purgada durante el período de fermentación no superara el 10% del contenido total del reactor a fin de no alterar la estabilidad del proceso (Grady et al., 2011; Haller, 1995). Para no alterar las condiciones internas del biorreactor, este no fue abierto para extraer las muestras, sino que se adaptó un tubo de muestreo en la salida lateral del reactor (**Imagen 3-3**).

Tabla 3-6. Frecuencia de monitoreo de los reactores de fermentación

Hora	Día			
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves
08:00	Inicio	X	X	X
11:00	X			
14:00	X	X	X	Fin
17:00	X	X	X	

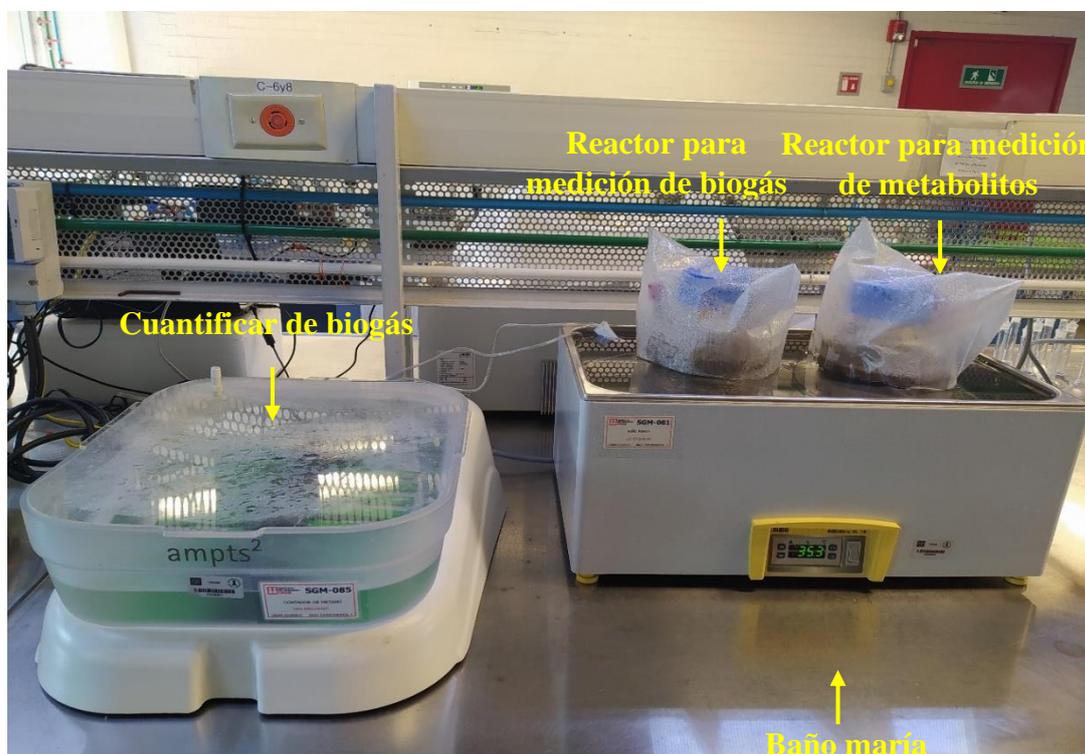


Imagen 3-2. Cuantificador automático de potencial de metano (Automatic Methane Potential Test System - AMPTS)

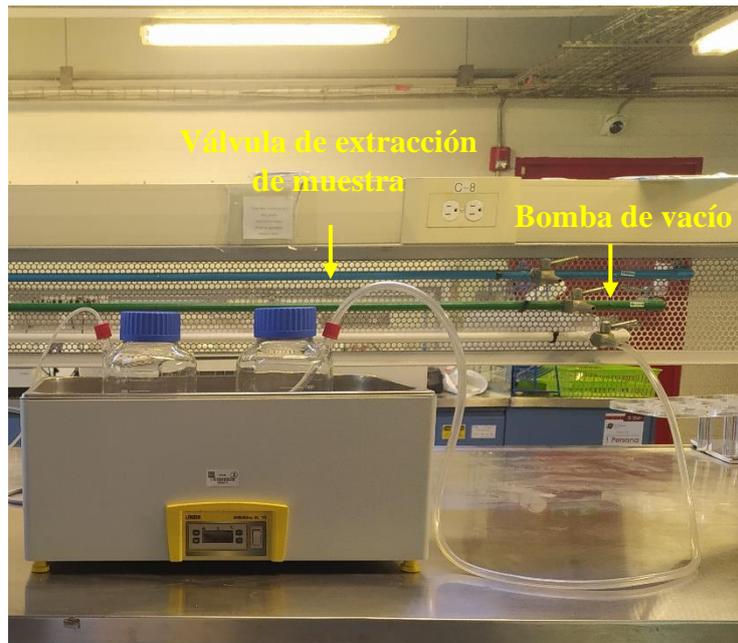


Imagen 3-3. Montaje de reactor para extracción de muestras

c) Análisis de las muestras

Para estudiar el efecto de la adición de *S. cerevisiae* sobre la producción de etanol, las muestras extraídas fueron centrifugadas para separar la fase sólida de la líquida. La velocidad de centrifugación fue ajustada a 3,000 rpm durante 10 minutos, esto debido a que en esta condición es posible sedimentar inclusive bacterias (Tripathi, 2010). Luego de este proceso, se obtuvo una fracción sólida (o digestato espesado) y una fracción líquida (o sobrenadante) mismas que fueron medidas en Laboratorio; en el primer caso, se registró el peso de los sólidos obtenidos mediante una balanza analítica mientras que en el segundo caso se midió el volumen de sobrenadante obtenido.

Del sobrenadante obtenido de la centrifugación se determinaron DQO_T , DQO_S , CH_T y CH_S , además, se cuantificaron los metabolitos producidos durante la fermentación como ácidos grasos volátiles (AGV) (ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico y hexanoico), alcoholes (metanol y etanol) y ácido láctico con base en las técnicas mostradas en la **tabla 3-7**. Luego de 72 horas de fermentación, el contenido del reactor fue purgado y colocado en frascos de centrifugación con el fin de separar la fracción sólida de la fracción líquida. Al sobrenadante se le realizaron los mismos análisis que las muestras extraídas diariamente del biorreactor, mientras que la fracción sólida fue

sometida a una prueba de potencial bioquímico de metano. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado a excepción de la prueba de PBM la cual se realizó por duplicado.

Tabla 3-7. Cuantificación de metabolitos

Parámetro	Descripción	Referencia
Ácido láctico	Determinación por espectrofotometría del producto coloreado de la reacción de iones lactato con cloruro de hierro (III). Lectura a 390 nm.	Borshchevskaya et al. (2016)
AGV y alcoholes	Cromatografía de gases (Sistema HP 5890GC) equipado con detector de ionización de llama (FID), Columna Stabilwax - DA, con hidrógeno como portador. La muestra utilizada es la obtenida luego de filtrar la fracción líquida a través de una membrana de celulosa de 0.22 µm.	Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021)

d) Potencial bioquímico de metano (PBM)

El potencial bioquímico de metano es un ensayo que permite cuantificar la cantidad de metano máxima que puede generarse a partir de la digestión anaerobia de un sustrato sólido o líquido (Owens & Chynoweth, 1993). Para llevar a cabo el procedimiento, en primer lugar, se recolectó un inóculo anaerobio activo desde el digestor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales de la cervecera Heineken localizada en Toluca, Estado de México, cuya temperatura de operación es de 35°C (condiciones mesofílicas).

El lodo granular anaerobio fue transportado al Laboratorio y conservado en el Instituto de Ingeniería a 4.5°C; posteriormente, fueron lavados y concentrados dos veces mediante centrifugación a 2,500 rpm durante 10 min. Este procedimiento se realizó con el fin de remover sustancias solubles remanentes que pudieran ser utilizadas por los microorganismos para generar metano adicional al de la digestión de la FORSU. Luego de cada centrifugación se eliminó el sobrenadante y se agregó un volumen de agua potable equivalente para eliminar la mayor cantidad de sustancias solubles adheridas en la FORSU. Del inóculo lavado y concentrado se determinaron SV y ST. Además, siguiendo las recomendaciones de la VDI (2016), se preparó una solución con micronutrientes la cual contiene 2,000 mg/L de FeCl₃·4H₂O; 2,000 mg/L de CoCl₂·6H₂O; 500 mg/L de MnCl₂·4H₂O; 30 mg/L de CuCl₂·H₂O; 50 mg/L de ZnCl₂; 50 mg/L de H₃BO₃; 50 mg/L

de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 90 mg/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,000 mg/L de EDTA, y 1 mg/L de HCl.

La producción de CH_4 fue cuantificada mediante el sistema de ensayo automático de potencial de metano (AMPTS II por sus siglas en inglés). Para ello, en frascos de reacción de 500 mL se añadieron una masa de inóculo equivalente a 8 g SV, 1 mL de la solución de micronutrientes, 10 gramos de fracción sólida y se completó hasta un volumen de 400 mL con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH de 7 (Campuzano, 2013; Figueroa, 2018). La prueba de PBM se realizó por duplicado a la fracción sólida obtenida luego del proceso de centrifugación de la FORSU fermentada para cada condición experimental, incluido el blanco. Además, se corrió una prueba adicional donde se sometió por separado la fracción sólida y la FORSU fresca a PBM para establecer un punto de referencia para la comparación del potencial de generación de metano. Esta prueba se llevó a cabo una vez. El pH de los reactores se midió al inicio y término de cada experimento y la composición del biogás se determinó diariamente mediante la inyección de 1 mL de muestra en un cromatógrafo en fase gaseosa (SRI 8610c) equipado con detector de conductividad térmica, columna de acero inoxidable empaquetada con gel de sílice (8600-PK1A), helio como gas de arrastre con flujo de 20 mL/min. La temperatura del detector fue de 150°C.

El equipo para las pruebas de potencial bioquímico de metano (PBM) consta de un baño de agua para controlar la temperatura con capacidad para pruebas en lote de 15 frascos de reacción de 500 mL, cada uno con sistema de agitación individual. En este dispositivo los reactores se mantienen con temperatura controlada a 35°C. Los tapones de plástico utilizados para cerrar los frascos de reacción tienen una salida que conduce el biogás producido a un frasco lavador de dióxido de carbono si se desea cuantificar metano, o directamente al contador si se desea cuantificar biogás. El contador es un recipiente con agua, en el cual hay 15 celdas calibradas a un volumen determinado (cada celda corresponde a una salida de un frasco) y cuenta con sensores de temperatura y presión para normalizar el metano o el biogás cuantificado a 0°C y 1 atm (NL = litros normalizados). El biogás generado desplaza el agua dentro de cada celda y, por fuerza boyante, la celda abre liberando el biogás a la atmósfera, y cada vez que la celda abre se envía una señal al software para cuantificar el volumen de metano o biogás con respecto al tiempo (**Imagen 3-4**).



Imagen 3-4. Prueba de Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

3.2. Análisis de datos

Se utilizó el software Microsoft Excel como software base para el análisis estadístico de las curvas de producción de metabolitos y biogás, así como para la determinación de estadísticos descriptivos. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con un test a posteriori (post-hoc) de Tukey para hallar diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Fórmulas

➤ Fermentación de la FORSU

- a) Rendimiento específico (Y): expresa la cantidad de producto que se obtiene por unidad de masa de sustrato (en peso seco) tratado:

$$Y = \frac{g_{DQO_{\text{metabolito}}}}{kg_{ST}}$$

- b) Porcentaje de incremento (%): Este parámetro permite evaluar el incremento o decremento porcentual de las variables cuantificadas con base en un valor inicial (referencia).

$$\%_{\text{incremento o decremento}} = \left| \frac{\text{Valor final} - \text{Referencia}}{\text{Referencia}} \right|$$

- c) Grado de fermentación (η_f): De acuerdo Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), este parámetro representa el porcentaje de la DQO_s que es debida a los metabolitos obtenidos en la fermentación y se cuantifica mediante la siguiente ecuación:

$$\eta_f(\%) = \frac{DQO_{\text{equivalente metabolitos, t=i}}}{DQO_{S, t=i}}$$

t = i se refiere al valor de la DQO_s medida en un instante de tiempo determinado.

- d) Rendimiento de acidificación (η_a): De acuerdo a Duarte et al. (2021), el rendimiento de acidificación se define como la relación entre la suma de los AGV totales más ácido láctico, cuantificados en términos de DQO equivalente, y la DQO_T que se alimenta a los reactores, según la ecuación:

$$\eta_a(\%) = \frac{DQO_{AGV, t=i} + DQO_{\text{ácido láctico, t=i}}}{DQO_{T, t=0}}$$

- e) Grado de solubilización (η_H): Según Gameiro et al. (2016) y Soomro et al. (2019), la solubilización de la materia orgánica presente en la FORSU expresa la tasa de hidrólisis de la materia orgánica particulada (proteínas, carbohidratos o grasas) hasta compuestos simples que son consumidos por las bacterias como aminoácidos, azúcares o ácidos grasos, siendo la DQO_s el principal producto para la evaluación de la biodisponibilidad de la materia orgánica. La eficiencia de

hidrólisis se define como la relación entre la DQO_S en el lixiviado y la DQO inicial de los sólidos secos del sustrato biodegradable, se calcula mediante la siguiente ecuación:

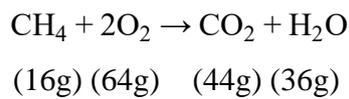
$$\eta_H (\%) = \frac{\text{DQO}_{\text{solubilizada}}}{\text{DQO}_{T, t=0} - \text{DQO}_{S, t=0}} = \frac{\text{DQO}_{S, t=i} - \text{DQO}_{S, t=0}}{\text{DQO}_{T, t=0} - \text{DQO}_{S, t=0}}$$

➤ Potencial bioquímico de metano (PBM)

f) Biodegradabilidad (η_B): De acuerdo a Song et al. (2021), la biodegradabilidad se usa indistintamente en investigaciones relacionadas con la digestión anaerobia, no obstante, en este caso se utilizará la ecuación de Buswell la cual se basa en la relación entre el rendimiento acumulado de metano (η_{CH_4}) y el rendimiento teórico de metano ($\eta_{\text{teórico-CH}_4}$) como se muestra a continuación:

$$\eta_B (\%) = \frac{\eta_{\text{CH}_4}}{\eta_{\text{teórico-CH}_4}}$$

Para evaluar la biodegradabilidad de las fracciones sólidas obtenidas de la fermentación de la FORSU, se determinó la máxima cantidad de metano teórico que se puede generar a partir de este sustrato.



A partir de la ecuación estequiométrica presentada se sabe que se requieren 64 gramos de oxígeno para oxidar 1 mol de metano, por tanto, la DQO equivalente del metano serán 64 g_{DQO}/mol. Además, el volumen ocupado por un gas en condiciones estándar (1 atm y 0°C) es 22.4 L/mol, entonces la máxima cantidad de metano teórico que se puede generar es de 0.35 NL-CH₄/g_{DQO}. Tomando en consideración que la relación DQO_T/SV para la FORSU fue de 1.55 g_{DQO}/g_{SV}, se calculó un PBM teórico máximo para la FORSU de la Ciudad de México de 544 NL-CH₄/kg_{SV}.

g) Cinética y modelamiento de la fermentación y metanización

Según Pererva et al. (2020), los modelos utilizados en las pruebas de PBM varían según el origen incluidos, entre otros, enzimáticos (por ejemplo, Monod, Michaelis-Menten, etc.), químicos (primer orden, dependientes del tiempo, etc.), cinéticos, distribución estadística (Weibull, Cauchy o Gaussiano) y modelos de crecimiento microbiano (Gompertz, logístico, etc.). De entre todos estos modelos, el más común en las pruebas de potencial bioquímico de metano es el modelo de Gompertz.

Con base en trabajos previos realizados por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), Figueroa-Escamilla (2018) y Campuzano (2013), se evidencia que las curvas de producción de metano obtenidas a partir de la FORSU de la Ciudad de México siguen un comportamiento diaúxico. Con estos antecedentes, en la presente investigación se modelaron estas curvas mediante la aplicación del modelo modificado de Gompertz en dos etapas siguiendo la metodología propuesta por Gomes et al. (2021) como se muestra en la **imagen 3-5**.

En el modelo de Gompertz en dos fases propuesto, la fase logarítmica 1 (λ_1) se enlaza con la fase logarítmica 2 (λ_2) por medio de la fase de latencia (Plateau) posterior a la primera fase de producción de metano. El potencial de metano del sustrato se obtiene de la suma del metano producido en ambas fases ($A_1 + A_2$). La duración de la segunda fase de latencia es la diferencia entre el comienzo de la segunda fase exponencial y el comienzo de la segunda fase de latencia (λ_p). Esta fase es calculada mediante la intersección entre la línea $y = A_1$ con la línea que cruza el eje x en λ_1 y el punto de inflexión de la primera fase de la curva acumulada de producción de metano dado por la ecuación $\frac{d^2y}{dt^2} = 0$. La ecuación global del modelo de Gompertz en dos fases está dada por la siguiente expresión:

$$y = \sum_{i=1}^n \left(A_i \exp \left\{ -\exp \left(\frac{\mu_{mi} \cdot e}{A_i} \cdot (\lambda_i - t) + 1 \right) \right\} \right)$$

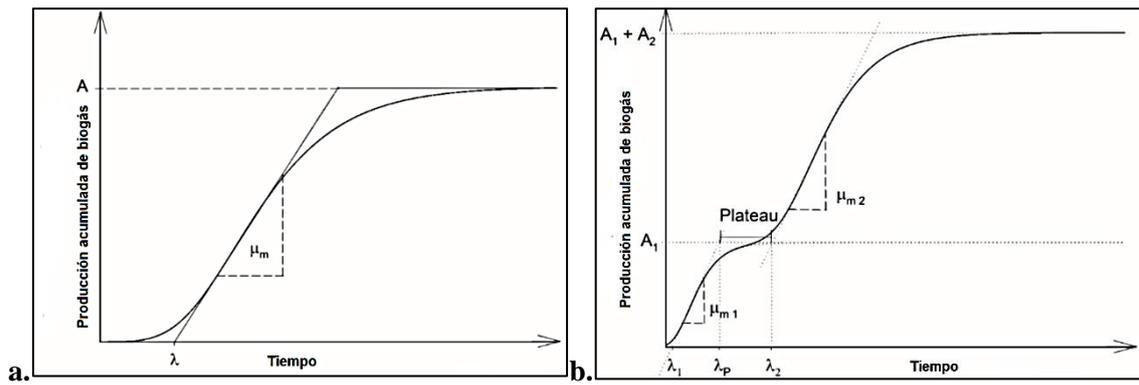


Imagen 3-5. a) Modelo de Gompertz y b) Modelo de Gompertz en dos fases

Fuente: Adaptado de Gomes et al. (2021)

Para modelar las curvas obtenidas de las pruebas de PBM de las distintas muestras, se usó la herramienta Regresión no lineal del software estadístico SPSS.

4. RESULTADOS

4.1. Características de la FORSU

En la **tabla 4-1** se establecen las características físicas, químicas y bromatológicas de la FORSU, mismas que fueron comparadas con otros autores y se evidenció una gran similitud con excepción de ciertos parámetros que serán abordados posteriormente. Los resultados muestran que la FORSU es ácida con un pH de 5.7 ± 0.1 . Por cada kilogramo de FORSU existen 292 ± 5 gramos de sólidos totales, mientras que el restante es humedad. Del total de sólidos cuantificados, el $21.5 \pm 0.3\%$ corresponde a materia orgánica y $7.7 \pm 0.6\%$ son cenizas, es decir, existen 220 gramos de sólidos volátiles por cada kilogramo de FORSU. Los residuos presentaron una relación DQO/SV de 1.55 y SV/ST igual a 0.73.

Tabla 4-1. Características de la FORSU

Parámetro	Este trabajo	Castellón (2021)	Campuzano (2013)	Unidades
pH	5.7 ± 0.1	5.2	NR	-
H	70.8 ± 0.5	72.5	70 ± 0.4	g/kg _{FORSU}
ST	292 ± 5	275 ± 2	297 ± 0.4	g/kg _{FORSU}
SV	215 ± 3	221 ± 2	223 ± 4.1	g/kg _{FORSU}
SF	77 ± 6	54	75 ± 0.5	g/kg _{FORSU}
DQO _T	334 ± 7	315 ± 3	304 ± 11	gDQO/kg _{FORSU}
DQO _S	118 ± 6	119 ± 12	NR	gDQO/kg _{FORSU}
DQO/SV	1.55	1.58	1.37	-
SV/ST	0.73	0.80	0.75	-
CH _T	118 ± 18	NR	118 ± 6.9	g/kg _{FORSU}
CH _S	85 ± 0.8	61 ± 12	NR	g/kg _{FORSU}
N-NH ₄ ⁺	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.04	NR	g/kg _{FORSU}
NTK	7.5 ± 0.8	NR	5.4 ± 0.1	g/kg _{FORSU}
Proteínas	48.8 ± 5	NR	34 ± 0.8	g/kg _{FORSU}
Metabolitos	1.3 ± 1	7.96 ± 0.7	NR	gDQO/kg _{FORSU}

Los carbohidratos totales representaron el 40.4% en peso seco de la FORSU, mientras que las proteínas constituyeron el 16.4%; estos porcentajes se encuentran ligeramente sobre el rango estipulado por Moreno et al. (2021) quienes establecen que estos parámetros pueden variar entre el 30 – 40% y 5 – 15%, respectivamente. En términos de DQO, el 35.4 % de la FORSU se encontró en forma soluble, resultado que se acerca al registrado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) que fue del 38%. Se

analizaron varias muestras de FORSU para la determinación de carbohidratos solubles y se evidenció que el $89 \pm 8\%$ de la DQO_s corresponde a carbohidratos solubles en agua expresados como DQO equivalente ($1.07 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{g}_{\text{carbohidrato}}$) (Grady et al., 1999). Este resultado difiere del obtenido por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) quienes registraron que el 51% de la DQO soluble fue debida a carbohidratos solubles en agua lo que indicaría que el porcentaje restante se debe a DQO generada por otros compuestos.

Al analizar la **tabla 4-2**, se evidencia que la suma de los metabolitos presentes de manera natural en la FORSU equivalen a $1.3 \pm 1 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$ (1.1% de la DQO disuelta), valor que es menor al registrado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) y también por Ossa (2020) quienes obtuvieron valores de 7.96 ± 0.7 y $9.17 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$, respectivamente. La diferencia entre los valores registrados puede deberse posiblemente a que la FORSU utilizada en este estudio se encontraba más fresca y transcurrió un menor tiempo entre su análisis y el día en que fueron recolectados. Otro parámetro que sugiere que las muestras utilizadas para el estudio se encontraban más frescas, es el nitrógeno total el cual fue de $7.5 \pm 0.6 \text{ g}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$, valor que es superior al registrado por Campuzano (2013) y Jojoa-Unigarro & González-Martínez (2021) los cuales fueron de $5.4 \text{ g}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$ y $4.5 \text{ g}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$, respectivamente, lo que indicaría que pudo haber existido una baja tasa de descomposición de los residuos al momento de su recolección y posterior análisis. El nitrógeno amoniacal registró un valor de $0.31 \text{ g}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$, el cual es similar a los obtenidos por Jojoa-Unigarro & González-Martínez (2021) y Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) quienes registraron valores de $0.42 \text{ g}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$ y $0.31 \text{ g}/\text{kg}_{\text{FORSU}}$, respectivamente.

Aunque las diferencias observadas entre los parámetros de la FORSU fueron mínimos en comparación con la literatura citada, esto se debió a que las muestras analizadas provienen de la misma zona de estudio. Campuzano & González-Martínez (2016) reportan que las características de la FORSU con menor variación son la humedad y la relación SV/ST, mientras que parámetros como el NTK y los carbohidratos totales presentan una mayor variabilidad. Esto a causa principalmente de las diversas formas en que se define la FORSU en cada región, y también a condiciones intrínsecas de cada zona de estudio como el clima, actividades económicas predominantes, hábitos alimenticios y el tipo de sistema de recolección.

Tabla 4-2. Metabolitos de la FORSU

Metabolito	Masa específica (g/kg _{FORSU})	DQO _{equivalente} (gDQO/g _{compuesto})	Masa como DQO equivalente (gDQO/kg _{FORSU})
Ácido láctico	0.71	1.08	0.76
Metanol	0.06	1.50	0.09
Etanol	0.10	2.09	0.21
Ácido acético	0.15	1.08	0.17
Ácido propiónico	0.04	1.53	0.06
Ácido butírico	0.01	1.813	0.02

Los valores de DQO equivalente para cada metabolito se tomaron de Grady et al. (1999)

4.2. Fermentación de la FORSU

4.2.1. Fermentación con microflora nativa

Carbohidratos solubles en agua. En cuanto al comportamiento de los carbohidratos solubles durante el proceso de fermentación natural utilizando solamente la microflora nativa, de acuerdo a la **figura 4-1**, para 10, 20 y 29.2%_{ST} se observó que en las primeras tres horas de fermentación existió un consumo de este sustrato con la respectiva transformación a metabolitos. A las seis horas, para una concentración de sólidos del 10%, se observó el inicio de la fase de mayor producción de metabolitos, mientras que para el 20 y 29.2%_{ST} esta etapa empezó a las nueve horas. En el primer caso, el consumo de carbohidratos disueltos continuó hasta las seis horas, no obstante, a las nueve horas existió un ligero incremento; mientras que en el segundo y tercer caso se observó un aumento en la concentración de carbohidratos solubles en agua desde las seis hasta las nueve horas después de que se inició la prueba de fermentación.

Al transcurrir 24 horas de fermentación, se observó que para concentraciones de sólidos del 10 y 20%, los carbohidratos disueltos se redujeron en 92 y 89%, respectivamente, mientras que para la condición restante (29.2%_{ST}) fue del 64%, indicando que a medida que aumenta la concentración de sólidos los microorganismos requieren un mayor tiempo para consumir los carbohidratos solubles en agua. Al término de las 72 horas, se observó que las concentraciones de carbohidratos disueltos representaron el 2, 4 y 10% respecto a los valores iniciales para 10, 20 y 29.2%_{ST}, respectivamente.

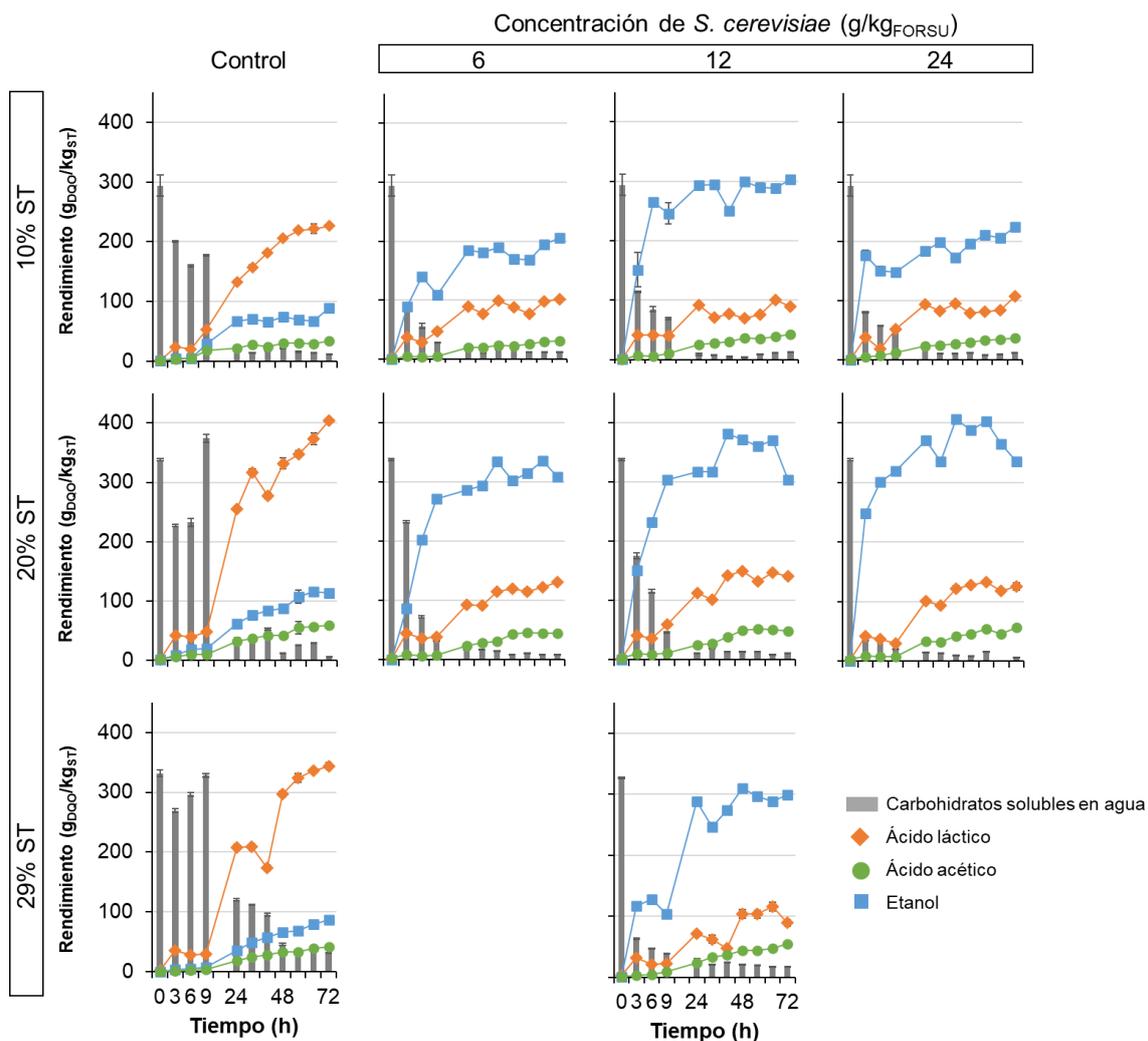


Figura 4-1. Comportamiento de los metabolitos producidos durante la fermentación de la FORSU

Según Jones et al. (2004) y Ali & Tahir (2021), durante los procesos de ensilaje (fermentación), para producir ácido láctico, las bacterias deben tener azúcares disponibles y, si este sustrato se agota durante la fermentación, la producción de ácido láctico se detiene; esto puede resultar en un pH final que es demasiado alto para restringir el crecimiento de otros microorganismos que compiten por sustrato y nutrientes. En el presente estudio posiblemente durante las primeras tres primeras horas de fermentación, donde se evidenció el consumo de carbohidratos disueltos en los tres casos (10, 20 y 29.2%_{ST}) con una mínima producción de ácido láctico, las bacterias capturaron rápidamente parte del sustrato disuelto para generar energía y sintetizar exoenzimas a fin de hidrolizar el material particulado generando de este modo más carbohidratos solubles. En el caso de 20 y 29.2%_{ST}, donde existe una menor transferencia de masa debido a que el medio es

más viscoso, posiblemente bacterias hidrolítico-fermentativas agotaron el sustrato disuelto de su entorno y empezaron a degradar los sólidos de la FORSU sobre los cuales se encontraban adsorbidas.

Aunque la acumulación de carbohidratos solubles en agua al final del período de fermentación fue baja, indicaría que estos no fueron aprovechados por los microorganismos. Kim et al. (2010) sostienen que, cuando los azúcares se consumen secuencialmente durante las fermentaciones por lotes, los azúcares no preferidos (como las pentosas) se acumulan en el medio hasta que el azúcar preferido (es decir, la glucosa) se consume por completo. Debido a la alta concentración de productos finales inhibidores de la fermentación, como el ácido láctico o el etanol, la tasa de utilización de las pentosas restantes es más lenta que si se hubieran fermentado como sustrato único. Además, si queda una pequeña cantidad de glucosa en el medio, las pentosas no serán utilizadas y permanecerán sin fermentar. Este fenómeno, denominado represión catabólica por carbono (RCC), es un mecanismo regulador que permite a las bacterias elegir entre diferentes fuentes de carbono según su valor metabólico y cambiar de una fuente de carbono a otra en función de su disponibilidad en el medio de crecimiento.

Metabolitos. De acuerdo a la **figura 4-1**, independientemente de la concentración de sólidos y en condiciones naturales de fermentación, es decir, sin adición de levadura, el ácido láctico fue el metabolito predominante, seguido del etanol y ácido acético. Además, los tres metabolitos principales generados llegaron a conformar el 97% de los metabolitos totales producidos para una concentración de sólidos del 10%, mientras que para concentraciones del 20 y 29.2% fue del 95%. En menores concentraciones, se registró la presencia de metanol, ácido propiónico, isobutírico y butírico los cuales sumaron entre sí un total de 12, 22 y 24 g_{DQO}/kg_{ST} para concentraciones de sólidos del 10, 20 y 29.2%, respectivamente.

Durante los procesos de fermentación para 10, 20 y 29.2%_{ST}, se evidenció la formación de metabolitos (principalmente ácido láctico, acético y etanol). En la hora 6, para una concentración de sólidos del 10%, se observó el inicio de la fase de mayor producción de metabolitos (fase exponencial), mientras que para 20 y 29.2%_{ST} esta etapa empezó en la hora 9. Además, se evidenció que, en las tres condiciones, cuando inicia la fase de mayor producción de metabolitos, tanto el ácido láctico como el etanol y ácido acético

empezaron a producirse en mayor cantidad y al mismo tiempo en comparación con el resto de productos, sugiriendo que la fermentación predominante para este tipo de sustrato es heteroláctica.

En el caso del etanol, representó el 25, 19 y 18% de los metabolitos totales producidos durante la fermentación natural de la FORSU para 10, 20 y 29.2%_{ST}, respectivamente; por otro lado, en estas mismas condiciones de concentraciones de sólidos, se registraron concentraciones de 4.2 ± 0.1 , 10.8 ± 0.4 y 12.2 ± 0.2 g/L los cuales sirvieron como *valores referenciales* para estimar el efecto conjunto del incremento de los sólidos totales y la concentración de levadura sobre la producción de este metabolito. Cabe mencionar que, aunque se evidenció un aumento en la concentración de etanol (y de otros metabolitos) como función del aumento de los sólidos totales en el reactor, este no correspondía, en algunos casos, con un aumento en el rendimiento, esto debido a que al estandarizar los valores de concentración en términos de rendimiento específico (g_{DQO}/kg_{ST}) el incremento en la concentración de metabolitos no fue proporcional al aumento de la concentración de sólidos totales.

Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), quienes investigaron el efecto del ensilado de la FORSU de la CDMX sobre la producción de biogás bajo distintas condiciones, también observaron que los metabolitos predominantes durante la fermentación fueron el ácido láctico, etanol y ácido acético. Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo y de los autores mencionados anteriormente, se sugiere que la fermentación predominante de la FORSU es heterofermentativa o, en un sentido más estricto, heteroláctica ya que el ácido láctico es el metabolito predominante durante la fermentación natural de este sustrato, por lo que posiblemente la microflora nativa se encuentre dominada por bacterias del ácido láctico.

De acuerdo a Wang et al. (2021), las BAL se encuentran de manera natural en procesos de fermentación de los alimentos, debido a ello, han sido ampliamente estudiadas en la industria alimentaria por sus características microbianas y su capacidad de descomponer polisacáridos (almidón, celulosa, fructanos, etc.), proteínas y lípidos presentes en distintos alimentos mediante la producción de hidrolasas. Aunque no existen trabajos que demuestren que la microflora nativa de la FORSU está dominada específicamente por este grupo de microorganismos, trabajos como los de Probst et al. (2015), Wilson et al.

(2016) y Wu et al. (2018) han reportado que las BAL dominan la microflora de residuos biológicos y restos de alimentos en descomposición los cuales son componentes principales de la FORSU al representar más del 60% de su composición.

4.2.2. Fermentación con microflora nativa más *S. cerevisiae*

Carbohidratos solubles en agua. De acuerdo a la **figura 4-1**, al bioaumentar la FORSU con *S. cerevisiae*, el consumo de carbohidratos solubles en agua en las primeras 6 horas de fermentación fueron significativamente superiores que en el control en todas las condiciones de concentración de sólidos ($p < 0.05$), mientras que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Se observó que entre el 71 – 81% de los carbohidratos fueron consumidos rápidamente durante las primeras horas de fermentación con la generación inmediata de etanol con 10%_{ST} y bajo las distintas concentraciones de levadura. Una reducción similar dentro del mismo período de tiempo fue registrada para una concentración de sólidos del 20%_{ST} y aplicando las distintas dosis de levadura, misma que fue entre el 66 y 89%; mientras que, para la única prueba de fermentación con *S. cerevisiae* con 29.2%_{ST}, la disminución de carbohidratos con respecto a la hora 0 fue del 86%. Estos resultados sugieren que al bioaumentar la FORSU con levadura, estos organismos captaron rápidamente el sustrato disuelto con la posterior transformación a etanol.

Metabolitos. Al bioaumentar la FORSU con levadura, se observó un cambio notable en la distribución de metabolitos, donde el etanol fue el producto predominante seguido del ácido láctico y ácido acético; en menores proporciones también se registró la formación de metanol, ácido propiónico, isobutírico y butírico. La producción de etanol en los tratamientos (es decir, cuando se agrega *S. cerevisiae*) fue significativamente mayor que el control (fermentación solo con microflora nativa) ($p < 0.05$) y, de acuerdo con el modelo estadístico establecido, el aumento del contenido de sólidos de 10 a 20% condujo a una mejora en el rendimiento de este metabolito. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos con el mismo contenido de ST ($p > 0.05$). En contraste, los rendimientos de ácido láctico en los tratamientos fueron significativamente menores en comparación con sus respectivos controles ($p < 0.05$), mientras que no se observaron diferencias entre los tratamientos. En cambio, la producción de ácido acético no se vio afectada por la adición de levadura o el aumento de TS ($p > 0.05$).

a) Etanol

Fermentación al 10% ST. Se obtuvieron rendimientos máximos de etanol de 216 ± 3 , 303 ± 11 y 224 ± 1 g_{DQO}/kg_{ST} para dosis de 6, 12 y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, respectivamente, y un incremento en el rendimiento de 144, 241 y 153% respecto a los valores referenciales. Las concentraciones máximas de etanol fueron de 10.4 ± 0.2 , 14.5 ± 1 y 10.7 ± 0.1 g/L para dosis de 6, 12 y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, respectivamente; los máximos rendimientos fueron logrados en 72 horas de fermentación.

Al observar la **figura 4-1a**, se evidencia que existió un mayor rendimiento de etanol a medida que aumenta la concentración de levadura excepto en la condición con 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} donde, pese a que durante las tres primeras horas existió una rápida producción de etanol en comparación con los otros casos, el resto del tiempo se visualizó un bajo rendimiento debido, posiblemente, a una baja carga orgánica asociada a una excesiva alimentación de levadura. De acuerdo a Liu (2017), la inhibición más común es la elevada densidad celular en reactores. Al igual que los reactivos en una reacción elemental, antes de que las células puedan dividirse, debe haber espacio disponible para las nuevas células y suficiente sustrato para satisfacer los requerimientos celulares.

Según se muestra en la **figura 4-1**, el máximo rendimiento y concentración de etanol fueron obtenidos con una concentración de 12 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, mientras que para las otras concentraciones de levadura se obtuvieron concentraciones y rendimientos similares de este metabolito. Además, se evidenció que el etanol conformó el 59% de los metabolitos totales producidos para concentraciones de 6 y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, respectivamente, mientras que para 12 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} alcanzó el 67%.

La máxima concentración alcanzada con 10%_{ST} fue de 14.5 ± 0.1 g/L, valor que supera al registrado por Thapa et al. (2019) quienes trabajaron con una concentración de sólidos igual y, mediante la aplicación de tratamiento termoquímico con ácido sulfúrico y adición de *S. cerevisiae*, lograron una concentración máxima de etanol de 13.8 g/L (288 g_{DQO}/kg_{ST}) luego de 5 días de fermentación. Ebrahimian et al. (2020), luego de aplicar pretratamiento etanólico organosolv e hidrólisis enzimática a la FORSU y fermentar el hidrolizado obtenido durante 72 horas adicionando una cepa de *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221 con una concentración de sólidos del 5%, lograron una concentración

máxima de etanol de 8.1 ± 0.2 g/L (161 ± 5 g_{DQO}/kg_{ST} pretratados). Aunque la concentración de etanol lograda en el presente estudio al 10%_{ST} fue superior a los reportados por el autor mencionado anteriormente, el rendimiento obtenido fue bajo.

En el estudio realizado por Mahmoodi et al. (2018a), luego de aplicar pretratamiento termoquímico con ácido sulfúrico e hidrólisis enzimática a la FORSU y fermentar el hidrolizado obtenido durante 72 horas adicionando una cepa de *Mucor indicus* CCUG 22424 con una concentración de sólidos del 10%, lograron una concentración máxima de etanol de 19.2 g/L (401 g_{DQO}/kg_{ST} pretratados). En otro estudio similar realizado por estos mismos autores, aplicaron pretratamiento hidrotermal e hidrólisis enzimática a la FORSU, posteriormente, dosificaron una cepa de *Mucor indicus* CCUG 22424 y trabajaron con 10%_{ST}, donde lograron alcanzar una concentración máxima de 18 g/L de etanol (376 g_{DQO}/kg_{ST} pretratados) (Mahmoodi et al., 2018b). En ambos casos, la concentración y rendimiento de etanol obtenidos fueron superiores a los registrado en el presente estudio para 10%_{ST}, sin embargo, se observa que solamente mediante la dosificación de *S. cerevisiae* se logró hasta el 81% de los valores de concentración de etanol alcanzados por los autores mencionados.

Fermentación al 20% ST. Al duplicar la concentración de sólidos, y aplicando dosis de 6, 12 y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, se obtuvieron rendimientos máximos de etanol de 335 ± 1 , 382 ± 1 y 407 ± 3 g_{DQO}/kg_{ST}, respectivamente, con incrementos en el rendimiento de 196, 237 y 260% respecto a los valores referenciales. Acorde a la **figura 4-1**, el máximo rendimiento de todo el experimento fue obtenido con una concentración de 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}. Se evidenció también que el etanol conformó el 61, 60 y 62% de los metabolitos totales producidos para concentraciones de 6, 12 y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, respectivamente. Además, en la fermentación con esta concentración de sólidos se lograron obtener los mayores rendimientos en la producción de metabolitos totales de toda la experimentación.

Aplicando esta misma concentración de sólidos, Moreno et al. (2021) obtuvieron concentraciones de etanol entre 24 y 52 g/L (251 y 543 g_{DQO}/kg_{ST}, respectivamente) en 72 horas de fermentación luego de someter a la FORSU a un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas no isotérmicas (NSSF) usando *S. cerevisiae*. En el presente estudio se lograron concentraciones máximas de etanol de 32.1 ± 0.1 , 36.5 ± 0.1 y $38.9 \pm$

0.3 g/L en 33 horas de fermentación, para el primer y segundo caso, y en 57 horas para el tercer caso, aplicando dosis de 6, 12 y 24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}, respectivamente. En este caso, tanto las concentraciones como el rendimiento de etanol en el presente estudio, superaron a los valores registrados por Ebrahimian et al. (2020) pese a que los autores realizaron las pruebas experimentales con una concentración de sólidos del 5% durante 72 horas.

Fermentación al 29.2% ST. Para evaluar el efecto de la bioaumentación de *S. cerevisiae* en la FORSU con su humedad natural (fermentación seca), solamente se aplicó la dosis con la cual se obtuvo el mayor rendimiento de etanol bajo las distintas concentraciones de sólidos evaluadas (10 y 20%_{ST}). Esto debido a la dificultad que implicó la extracción de muestras del biorreactor sin afectar las condiciones del proceso de fermentación. Aplicando 12 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU} se obtuvo una concentración máxima de etanol de 43.4 ± 0.1 g/L, cuyo rendimiento correspondiente fue 310 ± 1 g_{DQO}/kg_{ST}, con un incremento en la producción de etanol de 255% respecto al valor referencial. Aunque la concentración de etanol fue la más alta registrada de todas las condiciones experimentales estudiadas, al observar la **figura 4-1**, el rendimiento ocupó el cuarto lugar entre todos los ensayos experimentales donde se adicionó levadura. Además, se evidenció que el etanol conformó el 65% de los metabolitos totales producidos bajo esta condición, siendo el segundo porcentaje más alto registrado de entre todas las condiciones evaluadas.

Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) reportaron que la producción de metabolitos totales se reduce cuando se incrementa la concentración de sólidos, sin embargo, esto se debe principalmente a la reducción en la producción de ácido láctico. En el caso de los alcoholes (metanol y etanol), aunque se observa también una reducción en la producción, esta es menor en comparación con el ácido láctico. Según Ramesh (2007), esto se debe a que las bacterias en general requieren de una elevada actividad del agua (superior a 0.9), mientras que organismos como las levaduras y hongos pueden tolerar bajas actividades del agua lo que les permite predominar en sustratos con estas características.

En fermentaciones semisecas y secas utilizando la FORSU como sustrato, al existir una menor disponibilidad de agua libre, la concentración de carbohidratos solubles en el medio se incrementa. Debido a que *S. cerevisiae* es una levadura tolerante a una baja

actividad del agua (Tokuoka & Ishitani, 1991) y las BAL requieren por lo general una elevada actividad del agua (Troller & Stinson, 1981; Kamel et al., 2018), los resultados de la presente investigación sugieren que al aumentar la concentración de sólidos totales posiblemente se reduce la actividad de las BAL permitiendo que la levadura inoculada colonice rápidamente el sustrato y capte los carbohidratos solubles.

Trabajos como los de Kadhum et al. (2017) han demostrado que, al aumentar la concentración de sólidos durante procesos de hidrólisis enzimática y fermentación con *S. cerevisiae* utilizando sustratos lignocelulósicos (paja de trigo y rastrojo de maíz), es posible mejorar la producción de etanol inclusive utilizando concentraciones de sólidos de entre el 30 y 45%. Moreno et al. (2019) también estudiaron el efecto de la presencia de sólidos insolubles sobre la morfología de *S. cerevisiae*, la tasa de consumo de glucosa y la producción de etanol donde observaron que, con concentraciones de sólidos del 40%, se alcanzaron concentraciones de etanol similares (7.0 ± 0.1 g/L) a las observadas en ausencia de sólidos (7.3 g/L) en 24 horas de fermentación. De acuerdo a Graves et al. (2006), ciertos componentes de un sustrato complejo pueden mejorar la tolerancia de las levaduras a factores de estrés; esto es posible debido a que estos organismos desencadenan una respuesta transitoria denominada *protección cruzada* para resistir condiciones de estrés osmótico, oxidativo, térmico, entre otros.

En forma general, se observa que la bioaumentación de *S. cerevisiae* en la FORSU durante procesos de fermentación semisecca y seca mejora la producción de etanol sin aplicar pretratamiento o adición de enzimas hidrolíticas, de tal modo que se observa un cambio notable en el perfil de metabolitos producidos en comparación con la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa. Esto implica una reducción en los costos asociados a la utilización de procesos más complejos y, principalmente, de agua ya que, como se observa en la presente investigación, es posible llevar a cabo fermentaciones de la FORSU en condiciones secas (es decir, con la humedad natural) con elevadas producciones de etanol. De acuerdo a Moreno et al. (2021), para que el aprovechamiento de un sustrato sea rentable y compense los costos asociados al proceso de destilación del etanol, se debe generar al menos 40 g/L de producto, valor que fue incluso superado en el presente estudio (43.4 ± 0.1 g/L de etanol).

b) Ácido láctico

De los experimentos realizados, se observó que el segundo metabolito producido en las condiciones donde se fermentó la FORSU con adición de levadura fue el ácido láctico. Debido a que se propició una fermentación alcohólica mediante la bioaumentación de levadura a la FORSU, existió una reducción en la producción de ácido láctico con respecto a las referencias. Para concentraciones de sólidos del 10, 20 y 29.2%, se registraron reducciones en el rendimiento de este metabolito que oscilaron entre 53 – 56%, 63 – 68% y 66%, respectivamente.

Además, al analizar la **figura 4-1** se evidenció que, en condiciones de fermentación natural y con adición de *S. cerevisiae*, existe un aumento en la producción de ácido láctico cuando se duplica la concentración de sólidos del 10 al 20%, sin embargo, con 29.2%_{ST} ocurrió lo contrario reduciéndose el rendimiento de este metabolito respecto a la última condición. En forma general, se visualizaron rendimientos de ácido láctico similares en concentraciones de sólidos del 10 y 20% independientemente de las dosis de levadura adicionadas a la FORSU registrándose rendimientos generales de 103 ± 4 y 138 ± 10 g_{DQO}/kg_{ST}, respectivamente.

En la presente investigación, utilizando únicamente la microflora nativa, se lograron concentraciones de ácido láctico de 21 ± 0.4 , 75 ± 1.2 y 93 ± 3 g/L con concentraciones de sólidos de 10, 20% y 29.2%_{ST}, respectivamente, mientras que al adicionar *S. cerevisiae* se alcanzaron concentraciones de 9.2 ± 0.9 , 25 ± 1.4 y 24 ± 3.2 g/L. Trabajos como los de López-Gómez et al. (2019), mediante la aplicación de hidrólisis enzimática y la inoculación de una cepa específica para la producción de ácido láctico, lograron alcanzar concentraciones de este metabolito que fluctuaron entre 51 y 63 g/L trabajando con una concentración de sólidos del 20%. Si bien es cierto que existió una reducción en la producción de ácido láctico en la presente investigación, hay que mencionar que fue posible producir, además de este metabolito, etanol y ácido acético. Considerando las máximas concentraciones de ácido láctico logradas en el presente estudio con adición de levadura, se logró alcanzar entre el 38 y 40% (20 y 29.2%_{ST}, respectivamente) de la producción registrada por López-Gómez et al. (2019) sin requerir de la adición de enzimas y obteniendo, además, otros metabolitos valorizables.

c) Ácidos grasos volátiles (AGV)

En la presente investigación además de generar elevadas concentraciones de etanol, se evidenció también la producción de otros metabolitos de interés industrial como los AGV. De acuerdo a la **figura 4-1**, para concentraciones de sólidos del 10% y 29.2%, se registró un aumento en la producción de AGV totales con respecto al valor referencial de cada condición cuando se agrega levadura. En el primer caso, se registraron porcentajes de aumento en el rendimiento de 1, 36 y 15% aplicando dosis de 6, 12 y 24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}, respectivamente, mientras que para el segundo caso se registró un aumento del 18% aplicando una dosis de 12 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}. Por otro lado, al analizar los valores registrados para una concentración del 20%, se evidenció una reducción de 22, 23 y 3% en el rendimiento de AGV (con respecto a la referencia) para dosis de 6, 12 y 24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}, respectivamente. El bajo rendimiento en la producción de AGV puede deberse a que, al tratarse de una fermentación predominantemente alcohólica, gran parte de los carbohidratos disueltos fueron transformados en etanol y dióxido de carbono.

De los metabolitos totales producidos con y sin adición de *S. cerevisiae* a la FORSU, el ácido acético siempre fue el tercer metabolito generado bajo todas las condiciones experimentales. El rendimiento más bajo fue de 32 ± 1 g_{DQO}/kg_{ST} (2.91 g/L) mismo que fue obtenido con 10%_{ST} y 6 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}, mientras que el más alto registrado fue de 58 ± 1 g_{DQO}/kg_{ST} (10.6 g/L) con 20%_{ST} y 24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}.

El comportamiento en la producción de AGV fue variable para todas las condiciones de experimentación donde se evidenció que el rendimiento de ácido acético conformó entre el 77 y 86% de los AGV totales producidos, seguido del ácido propiónico (8 – 17%), isobutírico (1 – 8%) y butírico (2 – 5%). La composición de AGV difirió de lo observado por Cheah et al. (2019), quienes registraron valores de 35 – 41% y 18 – 22% para los ácidos acético y propiónico, respectivamente, mientras que para el ácido butírico oscilaron entre 17 – 21%. De acuerdo a Zhang et al. (2005), un bajo pH puede conducir a una ineficiente producción de ácido acético y, en general, de AGV; no obstante, en la presente investigación esto no fue observado posiblemente debido a que, bajo condiciones anaerobias, *S. cerevisiae* es capaz de producir, además de etanol, otros subproductos, entre ellos el ácido acético (Navarrete et al., 2014 y Babazadeh et al., 2017).

Al igual que lo reportado en el trabajo de Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), en la presente investigación se observó que al aumentar la concentración de sólidos de 10 a 20% también se incrementa la producción de AGV tanto en la FORSU fermentada solamente con la microflora nativa como en la bioaumentada con *S. cerevisiae*, no obstante, esta producción se redujo con 29.2%_{ST}. Durante un proceso de digestión anaerobia semiseca mesofílica de la FORSU, Li et al. (2010) también observaron una tendencia creciente en las concentraciones de AGV a medida que incrementaron el contenido de sólidos (para contenidos de ST de 11, 13.5 y 16%); los valores máximos de AGV fueron 4.2 g/L, 6.8 g/L y 22.4 g /L, respectivamente. Los resultados hallados por estos autores sugieren que el aumento del contenido de ST en la alimentación por debajo del 20% tiene un efecto positivo en los procesos fermentativos y en la producción de metano.

De acuerdo a Ebrahimian et al. (2020), luego de aplicar pretratamiento etanólico organosolv e hidrólisis enzimática a la FORSU y fermentar el hidrolizado obtenido durante 72 horas adicionando una cepa de *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221 con una concentración de sólidos del 5%, lograron rendimientos de ácido acético entre 30.6 ± 18 gDQO/kg_{ST}pretratados (1.4 ± 0.8 g/L) y 66.2 ± 13 gDQO/kg_{ST}pretratados (3.1 ± 0.6 g/L). Esto indicaría que, sin necesidad de realizar pretratamiento e hidrólisis enzimática, en la presente investigación se lograron rendimientos comparables con los autores antes mencionados mientras que, en términos de concentración, se logró inclusive triplicar el máximo valor que estos autores obtuvieron en su investigación.

4.2.3. Cinética de fermentación

Los metabolitos principales obtenidos (etanol, ácidos láctico y acético) en la fermentación de la FORSU con y sin bioaumentación de *S. cerevisiae* fueron modelados utilizando el modelo de Gompertz, cuyos resultados se encuentran en la **figura 4-2**. En este caso, se utilizaron los valores de concentración (g/L) obtenidos bajo cada condición experimental.

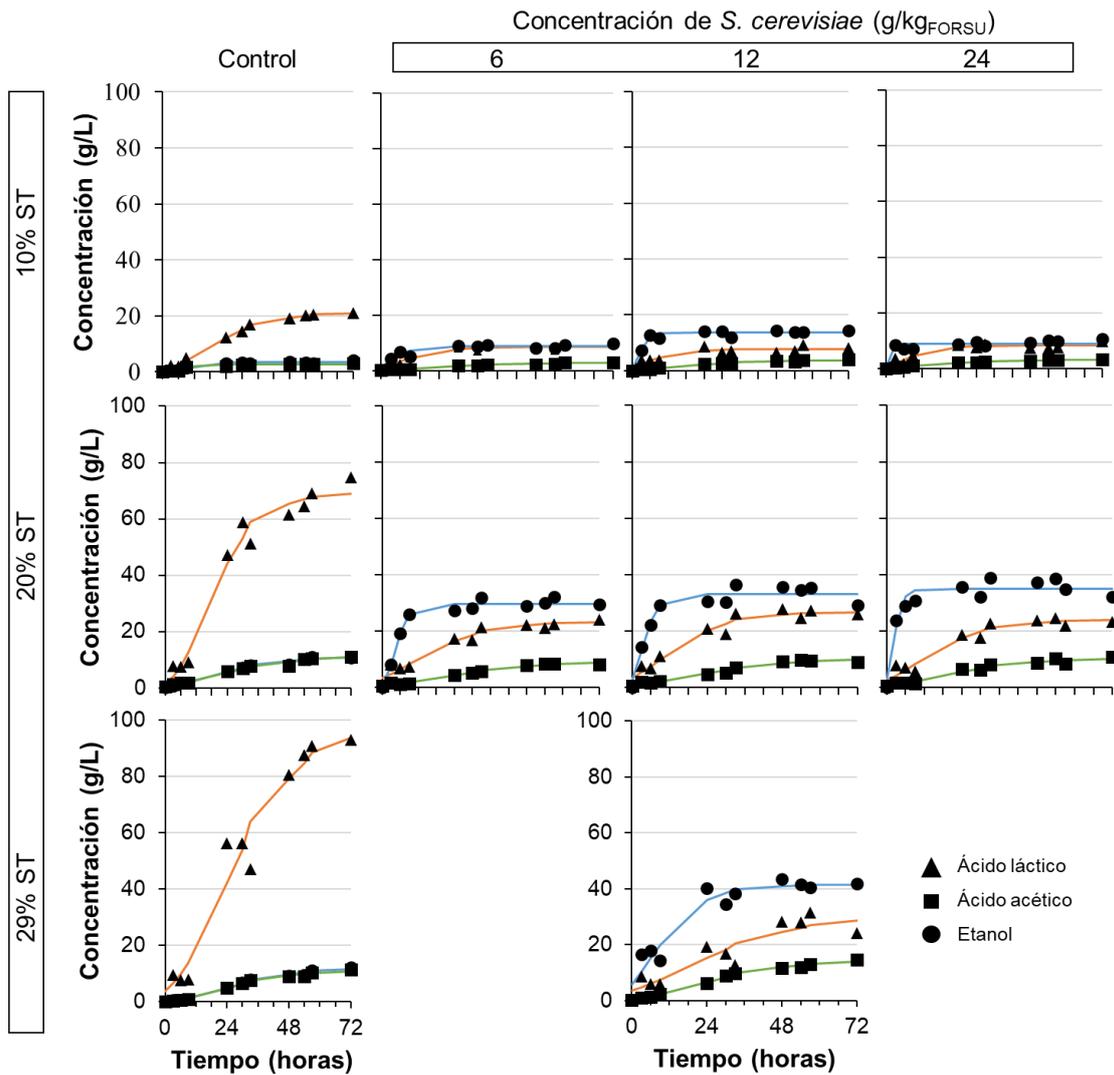


Figura 4-2. Ajuste del modelo de Gompertz para los metabolitos predominantes

El ajuste del modelo de Gompertz para los datos recopilados bajo condiciones de fermentación natural exhibieron los mayores coeficientes de determinación (R^2) los cuales fueron mayores a 0.96 para todos los metabolitos modelados y, en el caso particular del ácido acético, se evidenció que los modelos ajustados exhibieron los mayores valores de R^2 en todos los experimentos. En el caso del etanol y el ácido acético el R^2 exhibió una relación directa con el aumento en la concentración de sólidos, mientras que en el caso del ácido láctico tuvo un efecto contrario donde se evidenció que este coeficiente tiende a disminuir a medida que se incrementa la concentración de sólidos en el reactor.

a) Etanol

Al analizar la **tabla 4-3** se observa que, en todos los casos donde se bioaugmentó la FORSU con levadura, tanto la tasa de producción (μ_m) como la máxima producción de etanol (A) tendieron a incrementarse a medida que se incrementó la concentración de sólidos y de *S. cerevisiae*. Por otro lado, se evidenció una reducción en la fase de latencia (λ) en todos los casos donde la FORSU fue fermentada con adición de levadura en comparación con los casos donde solamente se utilizó la microflora nativa. En condiciones de fermentación natural, la tasa de producción de etanol fue igual en las tres distintas concentraciones de sólidos de acuerdo al ajuste del modelo de Gompertz. Al adicionar *S. cerevisiae* se observó un incremento considerable en la productividad de etanol en todas las condiciones, siendo la más notable con una concentración de sólidos del 20% donde la tasa de producción de etanol fue 14 veces superior para 6 y 12 $g_s. cerevisiae/kg_{FORSU}$, mientras que para 24 $g_s. cerevisiae/kg_{FORSU}$ fue 25 veces superior al valor referencial.

Tabla 4-3. Parámetros cinéticos para la producción de etanol

		A	s	μ_m	s	λ	s	R^2
		g/L	g/L	g/L·h	g/L·h	h	h	
10% _{ST}	NT	3.4	0.1	0.3	0.1	4.3	1.8	0.96
	C1	8.9	0.4	0.8	0.3	-1.3	1.8	0.89
	C2	13.6	0.3	3.0	1.0	0.6	0.8	0.96
	C3	10.0	0.4	4.7	4.6	0.4	2.2	0.85
20% _{ST}	NT	11.2	0.6	0.3	0.0	1.6	2.0	0.99
	C1	29.7	0.6	4.1	0.6	1.1	0.6	0.98
	C2	33.0	1.1	4.2	1.0	0.0	1.0	0.95
	C3	34.8	1.2	7.6	2.3	0.1	0.9	0.93
29.2% _{ST}	NT	12.2	0.6	0.3	0.0	5.6	1.8	0.99
	C1	-	-	-	-	-	-	-
	C2	41.4	2.2	1.7	0.5	-3.0	2.9	0.93
	C3	-	-	-	-	-	-	-

Nota: NT, C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 0, 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU} , respectivamente. NT se refiere a la referencia.

Al analizar los valores asociados a la fase de latencia (λ) obtenidos del modelo, se evidenció que, en condiciones donde la FORSU fue fermentada únicamente con la microflora nativa, existió una fase de latencia la cual sugiere que los microorganismos nativos atravesaron un período de aclimatación previo al inicio de su fase de mayor

producción de etanol (fase exponencial). Por otro lado, cuando se bioaumentó el sustrato con levadura, la cepa inoculada actuó inmediatamente captando los carbohidratos disueltos del medio lo que condujo a una disminución en el tiempo de latencia y una producción inmediata de etanol. De acuerdo a la **tabla 4-3**, también se registraron valores de lambda muy cercanos a cero e inclusive negativos los cuales indicarían que los microorganismos se aclimataron rápidamente al medio y transformaron los carbohidratos disueltos en etanol.

b) Ácido láctico

En el caso de este metabolito, se observó una disminución en la tasa de producción con respecto a los valores referenciales en todos los ensayos donde se realizó la bioaumentación de *S. cerevisiae*. Para una concentración de sólidos del 10%, la disminución de la productividad de ácido láctico fue mínima, sin embargo, para 20 y 29.2%_{ST} la tasa de producción fue entre 3 y 4 veces menor en comparación con los valores referenciales.

Tabla 4-4. Parámetros cinéticos para la producción de ácido láctico

		A	s	μ_m	s	λ	s	R ²
		g/L	g/L	g/L·h	g/L·h	h	h	
10% _{ST}	NT	21.4	0.5	0.6	0.0	2.0	0.9	1.00
	C1	8.5	0.5	0.4	0.1	-2.0	2.9	0.92
	C2	7.6	0.5	0.4	0.2	-2.6	3.8	0.84
	C3	8.3	0.5	0.5	0.2	-0.8	3.0	0.89
20% _{ST}	NT	69.3	3.2	2.2	0.3	3.5	2.1	0.98
	C1	23.5	1.4	0.6	0.1	-4.7	2.9	0.96
	C2	26.8	1.4	0.8	0.2	-2.9	2.6	0.96
	C3	24.0	1.5	0.7	0.1	-2.6	2.8	0.95
29.2% _{ST}	NT	99.6	10.4	2.0	0.3	3.2	3.7	0.96
	C1	-	-	-	-	-	-	-
	C2	31.0	6.5	0.5	0.2	-4.8	7.7	0.85
	C3	-	-	-	-	-	-	-

Nota: NT, C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 0, 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}, respectivamente. NT se refiere a la referencia.

De acuerdo a la **tabla 4-4**, la máxima producción y la tasa de producción de ácido láctico no exhibieron una tendencia clara en cuanto a los valores obtenidos del modelo. No

obstante, se observó que, independientemente de la concentración de *S. cerevisiae* adicionada a la FORSU, los valores de concentración de ácido láctico obtenidos fueron similares para cada concentración de sólidos. Para 10%_{ST} se produjeron en promedio 8.2 ± 0.5 g/L de ácido láctico, mientras que para 20%_{ST} la concentración media fue de 24.7 ± 1.8 g/L. Estos valores fueron muy cercanos a los obtenidos experimentalmente donde se registraron concentraciones de 9.2 ± 0.9 y 24.5 ± 1.4 g/L para concentraciones de sólidos de 10 y 20%, respectivamente. Tanto los valores experimentales como los obtenidos del modelo de Gompertz sugieren que, independientemente de las concentraciones de *S. cerevisiae* investigadas, la producción de ácido láctico no varió de manera significativa con una misma concentración de sólidos en el reactor.

En el caso del parámetro lambda, al igual que en el caso del etanol, todas las pruebas en las que se realizó la adición de levadura presentaron valores menores en comparación con los obtenidos bajo condiciones de fermentación natural. Sin embargo, en este caso todos los valores fueron negativos, esto se debe principalmente a que al analizar los modelos para este metabolito, se observa que la producción de ácido láctico durante las primeras 36 horas presentó una tendencia lineal lo que implica que al trazar una tangente sobre los datos recopilados en este período de tiempo, la intersección con el eje de las abscisas se da en el eje que contiene los valores negativos, lo que indicaría de igual modo que la producción de este metabolito fue inmediato y las bacterias atravesaron por una fase de latencia considerablemente reducida.

Aunque los trabajos relacionados con el modelamiento cinético para la obtención de metabolitos a partir de la FORSU con adición de *S. cerevisiae* son escasos, trabajos como los de Laila et al. (2019), donde modelaron matemáticamente la fermentación del sorgo con y sin inoculación de bacterias del ácido láctico (LAB), observaron que la introducción de organismos diferentes a los de la población nativa ocasionaron variaciones en los parámetros cinéticos e inclusive llevaron a la supresión de organismos autóctonos. Aunque en el presente trabajo no se observó la supresión de bacterias productoras de ácido láctico sino más bien una *coexistencia* con *S. cerevisiae*, el análisis de los parámetros cinéticos obtenidos del modelo de Gompertz demuestran una disminución general en los valores de la tasa de producción y la producción máxima de ácido láctico.

c) Ácido acético

Al revisar la **tabla 4-5**, se observa que la tasa de producción de ácido acético se mantuvo constante para 20 y 29.2%_{ST} independientemente de la adición de levadura, por otro lado, en el caso de 10%_{ST} la productividad del ácido acético fue 4 veces menor en comparación con la referencia en todos los casos donde se bioaumentó la FORSU, además, se evidenció que un aumento en la concentración de levadura afectó mínimamente la tasa de producción de este metabolito.

En el caso de la producción máxima de ácido acético se observó que, para concentraciones de sólidos del 10% y 29.2%, la adición de levadura condujo a un ligero incremento en la producción de este metabolito con respecto a la referencia mientras que, para 20%_{ST}, se observaron producciones menores. De acuerdo a los valores obtenidos del modelo de Gompertz, en promedio se produjeron 3.3 ± 0.5 g/L y 10.1 ± 0.6 g/L de ácido acético para concentraciones de sólidos de 10 y 20%, respectivamente; este comportamiento se asemejó a lo observado en el caso del ácido láctico donde, bajo una misma concentración de sólidos, la adición de distintas concentraciones de *S. cerevisiae* no afectaron significativamente la producción de este metabolito.

Tabla 4-5. Parámetros cinéticos para la producción de ácido acético

		A	s	μ_m	s	λ	s	R ²
		g/L	g/L	g/L·h	g/L·h	h	h	
10% _{ST}	NT	2.6	0.1	0.4	0.2	5.0	1.2	0.93
	C1	2.8	0.2	0.1	0.0	0.1	2.9	0.96
	C2	3.8	0.2	0.1	0.0	-1.0	1.7	0.99
	C3	3.2	0.1	0.1	0.0	-2.6	1.8	0.98
20% _{ST}	NT	11.4	0.8	0.2	0.0	-0.5	2.4	0.98
	C1	9.3	0.5	0.2	0.0	0.0	2.0	0.99
	C2	10.5	0.9	0.2	0.0	-0.9	2.9	0.97
	C3	10.3	0.7	0.2	0.0	0.5	2.8	0.97
29.2% _{ST}	NT	11.1	0.5	0.3	0.0	5.5	1.7	0.99
	C1	-	-	-	-	-	-	-
	C2	14.7	0.6	0.3	0.0	3.1	1.4	0.99
	C3	-	-	-	-	-	-	-

Nota: NT, C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 0, 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}, respectivamente. NT se refiere a la referencia.

➤ Balance de DQOs

En todas las condiciones de experimentación, entre el 94 y 95% de la DQO_s fue debida a carbohidratos solubles en agua en la hora 0. En la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa, al transcurrir 24 horas de fermentación, se observó que para concentraciones de sólidos del 10 y 20%, los carbohidratos disueltos representaron el 7% de la DQO_s, mientras que para la condición restante (29.2%_{ST}) fue del 29%. Por otro lado, en la FORSU donde se bioaugmentó levadura, la DQO debida a carbohidratos disueltos al término de 24 horas de fermentación representó menos del 4% de la DQO_s en todos los casos con excepción de la prueba con 29.2%_{ST} y 12 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU} donde el valor fue del 9%; posteriormente, tras 72 horas de fermentación, los carbohidratos disueltos representaron en todos los casos menos del 2% de la DQO_s.

Al bioaugmentar la FORSU con *S. cerevisiae*, se observó que más del 66% de los carbohidratos disueltos fueron consumidos rápidamente en las seis primeras horas de fermentación con la generación inmediata de etanol mientras que, del análisis de la **figura 4-1**, en la fermentación de la FORSU utilizando únicamente la microflora nativa (referencias), se observa que apenas a partir de las seis horas de fermentación empieza la fase de mayor producción de metabolitos para 10%_{ST} y a las nueve horas en el caso de 20 y 29.2%_{ST}. De este modo, la información proporcionada en esta investigación sugiere que cuando la microflora nativa apenas empieza su fase de mayor producción de metabolitos, ya existe un déficit de sustrato disuelto y una alta densidad celular de *S. cerevisiae*, de modo que, aunque la levadura supera en número a los microorganismos asociados de manera natural a la FORSU, estos *coexisten* en el medio ya que se genera ácido láctico.

El ácido láctico fue el segundo metabolito predominante en aquellas condiciones donde se adicionó levadura, esto implicaría que la microflora nativa fue capaz de producir ácido láctico inclusive cuando existió una baja disponibilidad de sustrato soluble. Esto explicaría el incremento de la DQO_s luego de 72 horas de fermentación con respecto a la DQO_s en la hora 0. Se evidenció que en la FORSU fermentada con adición de levadura, con excepción de un solo caso (20%_{ST} y 6 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}), el incremento de la DQO_s fue superior en comparación con el registrado cuando se fermenta únicamente con la microflora nativa. De este modo, con base en los resultados observados y el análisis realizado en el párrafo anterior, se sugiere que posiblemente se promovió una mayor

hidrólisis de la fracción sólida de la FORSU al inducir el agotamiento acelerado de carbohidratos disueltos mediante la adición de levadura. Además, se observó que la DQO debida a AGV no varió de forma representativa entre las referencias y los tratamientos, de tal modo que los valores de DQO_{AGV} representó entre el 8 y 12% de la DQO soluble.

En todas las condiciones de experimentación, se registró un aumento paulatino en la DQO soluble de la FORSU fermentada con y sin adición de levadura con respecto al valor registrado en la hora 0. Este comportamiento en la DQO_S difiere de lo registrado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) quienes observaron una disminución de entre el 45 y 50% en el valor de DQO_S tras 24 horas de ensilado de la FORSU a 35°C, para concentraciones de sólidos del 10 y 20%, mientras que un porcentaje de reducción similar se produjo a las 48 horas para 28%_{ST}; posteriormente los valores de DQO_S tendieron a aumentar.

Entre las causas probables del comportamiento diferenciado de este parámetro con respecto al observado en este trabajo, es que los autores citados anteriormente cuantificaron que el 51% de la DQO soluble de la FORSU fue debida a carbohidratos solubles en agua, mientras que en la presente investigación este parámetro representó más del 94% lo que implicaría que los microorganismos tuvieron mayor disponibilidad de sustrato disuelto el cual captaron rápidamente para satisfacer las distintas funciones celulares con la posterior producción de metabolitos y, consecuentemente, la DQO que inicialmente se debía a carbohidratos solubles fue desplazada por DQO debida a los productos del metabolismo celular. En el caso del trabajo realizado por los autores mencionados anteriormente, al tener una baja disponibilidad de alimento, los microorganismos pudieron haber consumido el sustrato disuelto del medio con una baja producción de metabolitos causando una disminución de la DQO debida al consumo de carbohidratos disueltos, misma que posteriormente se incrementó ya que empezaron a generar una mayor cantidad de metabolitos.

Además, en la presente investigación se obtuvieron valores menores en la relación DQO_{AGV}/DQO_S en comparación con lo registrado por Cheah et al. (2019) quienes, al someter FORSU a fermentación acidogénica controlando el pH a un valor de 6, observaron que la relación DQO_{AGV}/DQO_S osciló entre 23 y 23.2%. Esta reducción posiblemente fue debido a que la producción de AGV se incrementa a medida que se

incrementa el pH, siendo el óptimo cuando este valor es superior a 5.5 (Lim et al., 2008; Strazzer et al., 2018). Al revisar los valores de pH presentados en la **tabla 4-7**, bajo ninguna condición experimental, los valores de pH en 72 horas de fermentación superaron el valor de 5.5.

➤ Grado de solubilización (η_H)

Para complementar la tendencia de los valores de DQO_S, también se calculó el grado de solubilización (η_H) de la FORSU con base en los datos de DQO_S y DQO_T registrados en la hora 0. Para obtener los valores de DQO_T al inicio de cada corrida experimental, se tomaron muestras de los reactores con 10, 20 y 29.2%_{ST} donde se registraron valores de 966 ± 19 , 1072 ± 42 y 1142 ± 24 g_{DQO}/kg_{ST}, posteriormente, para verificar que existió una correlación entre la concentración de sólidos en los reactores y la DQO_T, se graficó una curva de DQO_T contra %_{ST} con el fin de hallar el coeficiente de determinación (R^2) cuyo valor fue de 0.99; además, los datos presentaron una relación lineal. Del análisis de la **tabla 4-6**, se observó que en la FORSU fermentada con bioaumentación de levadura, con excepción de un caso (20%_{ST} y 6 g_{s. cerevisiae}/kg_{FORSU}), el grado de solubilización fue igual o superior en comparación con el registrado cuando se fermenta únicamente con la microflora nativa.

Tabla 4-6. Grado de solubilización de la FORSU en 72 horas de fermentación

Concentración de sólidos (%)	Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
	0	6	12	24
	η_H (%)			
10	12	28	28	37
20	37	25	38	47
29.2	26	-	29	-

Gameiro et al. (2016), lograron alcanzar eficiencias de solubilización de entre el 87 y 99% con 10%_{ST} durante la fermentación acidogénica de la FORSU, donde adicionaron distintos valores de alcalinidad y agregaron un inóculo de un digestor anaerobio de lodos de depuradora. Además, luego de evaluar el efecto de la variación de la alcalinidad y la concentración de sólidos totales, evidenciaron que los mayores grados de solubilización fueron obtenidos al 10%_{ST}, seguido del 8%_{ST} y 5%_{ST}. Al analizar la **tabla 4-6**, se observó que la máxima tasa de solubilización fue obtenida con 20%_{ST} y 24 g_{s. cerevisiae}/kg_{FORSU}, sugiriendo que un aumento en la concentración de sólidos en los reactores, no siempre

limita los procesos biológicos como consecuencia de una deficiente transferencia de masa, sino que existen varios factores que pueden afectar los procesos al interior de los reactores.

4.2.4. Grado de fermentación (η_f), rendimiento de acidificación (η_a) y pH

A partir de la DQO soluble y de las concentraciones de metabolitos totales (**figura 4-1**) se determinaron el grado de fermentación (**figura 4-3**) y el rendimiento de acidificación (**figura 4-4**) de la FORSU fermentada bajo las distintas condiciones.

➤ Grado de fermentación (η_f)

Con base en la información recopilada para la DQO soluble y los metabolitos totales producidos, se analizó el comportamiento del grado de fermentación durante las 72 horas de fermentación de la FORSU bajo las distintas condiciones cuyos resultados se muestran en la **figura 4-3**.

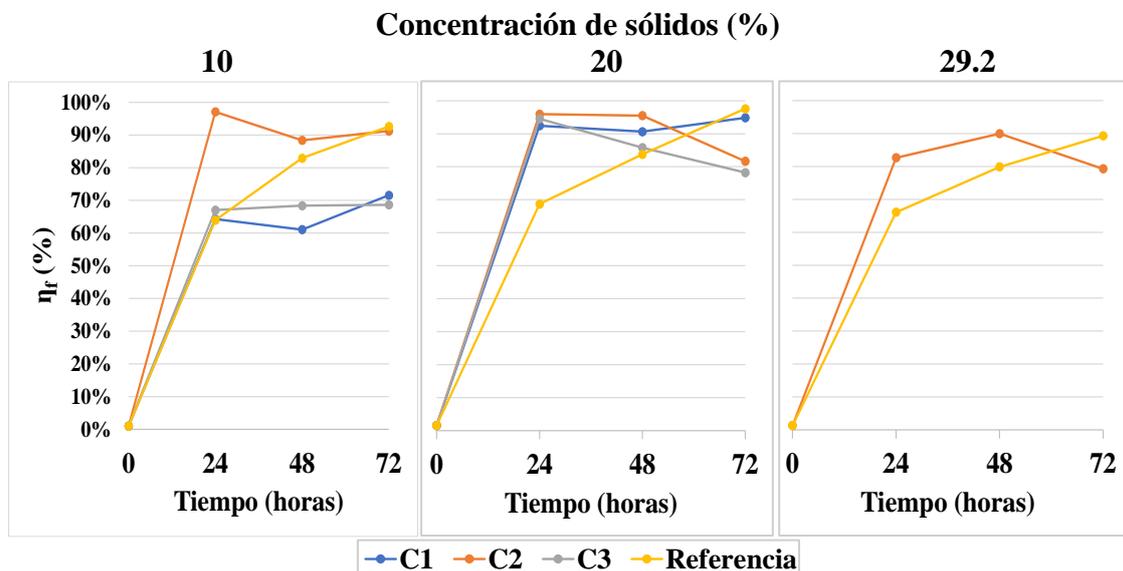


Figura 4-3. Grado de fermentación (η_f)

Nota: C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}, respectivamente.

Fermentación con microflora nativa. Al analizar la **figura 4-3**, se puede observar que en la FORSU fermentada naturalmente, el máximo grado de fermentación fue obtenido

con 20%_{ST} donde se alcanzó el 98% tras 72 horas de fermentación, seguido del 10 y 29.2%_{ST} con valores del 93 y 89%, respectivamente. Este comportamiento en el grado de fermentación coincide con lo registrado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) quienes observaron que la fase principal de fermentación se produjo durante las primeras 48 horas de ensilaje de la FORSU alcanzando grados de fermentación superiores al 90% para concentraciones de sólidos del 10, 20 y 28%, no obstante, a partir de las 72 horas de fermentación registraron una disminución paulatina del grado de fermentación en las dos últimas condiciones, mientras que en el primer caso los metabolitos producidos representaron casi la totalidad de la DQO soluble.

Esta tendencia en las dos últimas condiciones mencionadas no se visualizó en el presente trabajo, sin embargo, la explicación estaría ligada al comportamiento de la DQO_s que registraron los autores mencionados anteriormente. En general, los autores observaron que, para concentraciones de sólidos de 10, 20 y 28%, la DQO_s disminuyó paulatinamente hasta alcanzar los valores más bajos en 24 horas de fermentación, para los dos primeros casos, y a las 48 horas para el tercer caso; posteriormente, este parámetro se incrementó nuevamente, por lo tanto, los valores cuantificados a las 72 horas fueron mayores en comparación con los visualizados a las 24 y 48 horas de fermentación. Debido a que el grado de fermentación es inversamente proporcional a la DQO_s, y pese a que existió un incremento paulatino en la concentración de metabolitos durante el ensilaje de la FORSU, al dividir la DQO debida a metabolitos por la DQO_s, los valores del grado de fermentación registrados tras 72 horas de fermentación fueron ligeramente menores en comparación con los registrados a las 48 horas para ambos casos. También se observó en el trabajo de estos autores que, a medida que transcurre el proceso de ensilado de la FORSU, el grado de fermentación disminuye paulatinamente pese a que existe una producción de metabolitos hasta cinco días después de iniciado el proceso fermentativo.

Fermentación con microflora nativa más *S. cerevisiae*. Al agregar levadura a la FORSU, se observó que los máximos grados de fermentación fueron obtenidos en 24 horas para 10 y 20%_{ST} cuando se agregaron 12 g_{s. cerevisiae}/kg_{FORSU}, en ambos casos se lograron valores superiores al 96%. Para 20%_{ST} con una dosis 6 y 24 g_{s. cerevisiae}/kg_{FORSU} se alcanzaron valores del 95%, en el primer caso, este valor se logró tras 72 horas de fermentación mientras que en el segundo caso fue a las 24 horas. Para la única prueba con 29.2%_{ST} se alcanzó un valor del 90%, sin embargo, este fue alcanzado al transcurrir 48

horas. En la mayoría de casos se observó una reducción en los grados de fermentación luego de haber alcanzado sus valores máximos, sin embargo, para 10 y 20%_{ST} donde se agregaron 24 y 6 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, respectivamente, los valores se mantuvieron cuasi-constantemente durante las 72 horas de fermentación.

En el caso particular de los experimentos que se llevaron a cabo al 10%_{ST} donde se dosificaron 6 y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}, se observó que el grado de fermentación osciló entre el 60 y 70% indicando que bajo estas condiciones la DQO debida a la producción de metabolitos fue menor, indicando que la DQO_s restante se debe a otros compuestos. Durante la producción de etanol por adición de *S. cerevisiae* bajo condiciones anaerobias también se forma glicerol, el cual es un subproducto importante que representa el 4 – 5% del consumo de la fuente de carbono, además, se forman otros subproductos como el ácido pirúvico o el ácido succínico. Además, según Jahangeer et al. (2021), aparte de los metabolitos esenciales (carbonos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, acetonas, etanol, etc.), *S. cerevisiae* puede generar una amplia gama de metabolitos secundarios durante su fase activa de desarrollo celular, incluidas toxinas, antibióticos, ácidos grasos, alcaloides, alcoholes, cetonas, etc. Todos estos productos también generan DQO, sin embargo, al no ser considerados dentro del análisis puede ser la explicación del aumento de DQO_s lo que ocasionó una reducción en el grado de fermentación ya que este parámetro se basa en la relación entre la DQO equivalente de los metabolitos cuantificados y la DQO_s.

➤ Rendimiento de acidificación y pH

El rendimiento de acidificación aportó información valiosa sobre la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico y AGV, los cuales influyeron sobre el comportamiento del pH durante la fermentación de la FORSU. De acuerdo a la **figura 4-4**, en condiciones de fermentación con la microflora nativa (referencia), los valores más bajos de pH se registraron en las primeras 24 horas de fermentación y luego empezaron a subir paulatinamente. Un comportamiento similar fue observado en aquellas pruebas donde se dosificó levadura, donde el pH alcanzó su valor más bajo a las 24 horas de fermentación y posteriormente tendió a subir, no obstante, la caída de pH no fue tan pronunciada como en el caso de la fermentación utilizando únicamente la microflora nativa.

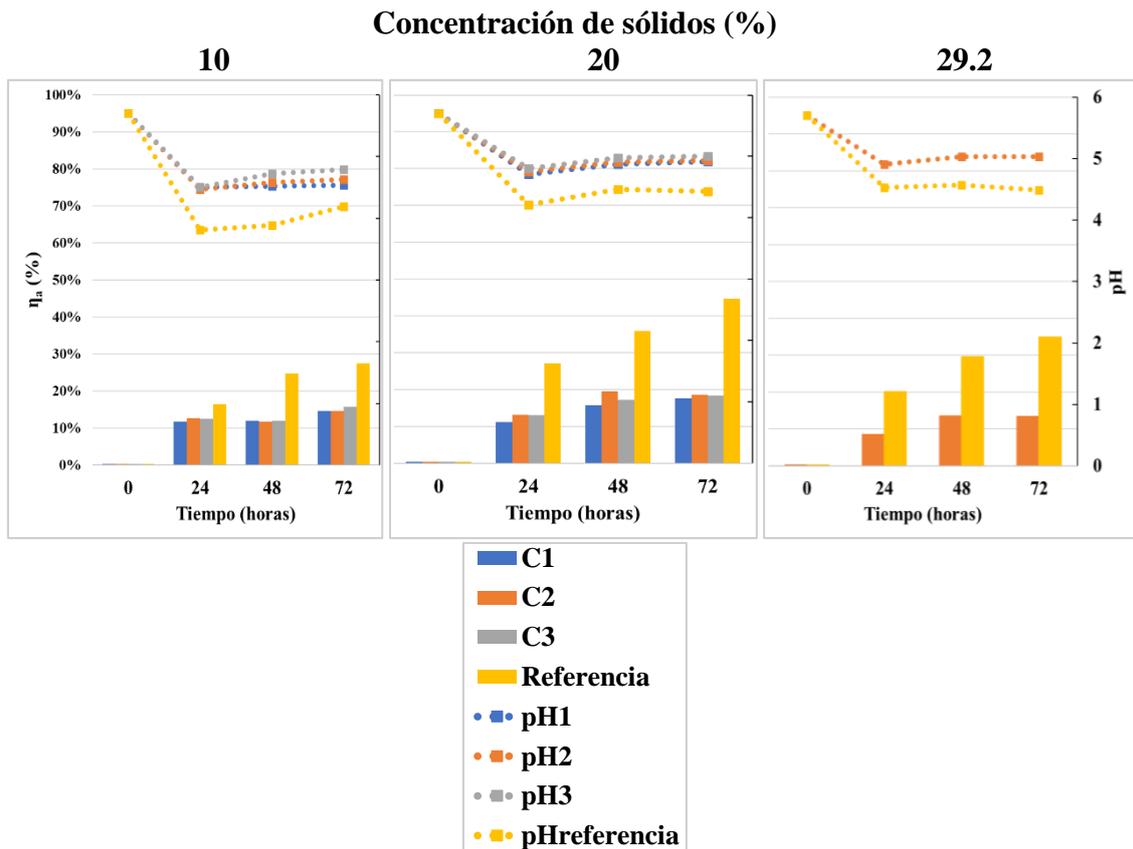


Figura 4-4. Rendimiento de acidificación (η_a) y pH

Nota: C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}, respectivamente.

Fermentación con microflora nativa. En el caso de la FORSU fermentada sin adición de *S. cerevisiae*, en 24 horas de fermentación se registraron valores de pH de 3.8, 4.2 y 4.5 para concentraciones de sólidos de 10, 20 y 29.2%, respectivamente, mismos que representaron los valores más bajos de toda la experimentación; posteriormente, se observó un incremento paulatino en el pH a medida que transcurría la fermentación (**Tabla 4-7**). Estos resultados coinciden con los observados por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) durante el ensilaje de la FORSU, sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación, estos autores reportaron que los valores de pH más bajos se lograron en 48 horas de ensilado. Esto se debe posiblemente a que en el presente estudio existió una mayor disponibilidad de carbohidratos solubles en la FORSU sin fermentar (94 – 95% de la DQO_S) que fueron aprovechados rápidamente por los microorganismos con la respectiva generación de metabolitos (principalmente ácido láctico), mientras que los autores mencionados anteriormente reportaron una DQO debida a carbohidratos del 51%; esta disponibilidad de sustrato disuelto pudo no haber

sido suficiente para que los microorganismos inicien con la fase de mayor fermentación y producción de metabolitos.

Además, con base en el análisis de la **figura 4-4**, se observó que, para concentraciones de sólidos del 10, 20 y 29.2%, la eficiencia de acidificación para la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa luego de 72 horas fue del 28, 45 y 35% lo que explicaría la reducción del pH al final de la experimentación en comparación con el pH inicial de la FORSU. Una eficiencia de solubilización similar para una concentración de sólidos del 10% fue observada por Gameiro et al. (2016), quienes lograron alcanzar eficiencias de entre el 23 y 40% durante la fermentación acidogénica de la FORSU.

Al igual que lo reportado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), la acidificación durante la fermentación de la FORSU se debe principalmente a la producción de ácido láctico y ácido acético ($pK_a = 3.86$ y 4.76 , respectivamente) los cuales se presentaron en mayor proporción con respecto al resto de ácidos generados. Aunque la eficiencia de acidificación fue mayor para 20 y 29.2%_{ST}, el pH en estos dos casos fue superior en comparación al 10%_{ST} lo que indicaría que la producción de ácidos no refleja del todo el comportamiento global del pH. Esta no correspondencia entre la generación de ácidos y el comportamiento del pH también se observó en el trabajo de los autores mencionados anteriormente quienes reportaron que, aunque la producción máxima de ácido láctico para 10, 20 y 28%_{ST} se registró a los 6 días, en el primer caso, y a los 3 días en los casos restantes, los valores más bajos de pH fueron registrados a las 48 horas en todos los casos.

De acuerdo a Kung et al. (2018), el pH final durante el ensilaje (proceso fermentativo) se ve afectado por muchos factores, pero está más relacionado con la concentración de ácido láctico y la capacidad amortiguadora del sustrato; en el caso de este último parámetro, si el sustrato tiene un alto contenido de proteínas o cenizas, el pH puede ser más alto de lo esperado. Además, según Graves et al. (2006), los materiales particulados pueden mejorar la capacidad buffer, debido a ello, un aumento en la concentración de sólidos puede incrementar el contenido de material orgánico particulado. Estudios como los de Yi et al. (2014), mencionan que este efecto podría estar relacionado con la alcalinidad del sistema ya que, durante procesos de digestión anaerobia de residuos de comida, observaron una

alta capacidad amortiguadora cuando el sistema trabajaba con elevadas concentraciones de sólidos (20%_{ST}).

Fermentación con microflora nativa más *S. cerevisiae*. Al bioaumentar la FORSU con levadura, en todas las condiciones se observó que, al igual que en el caso donde solamente se utilizó la microflora nativa, los valores mínimos de pH se observaron a las 24 horas de fermentación donde se registraron valores de 4.5, 4.7 y 4.9 para 10, 20 y 29.2%_{ST}, respectivamente; posteriormente, el pH se incrementó progresivamente hasta el final de la experimentación. Como se observa en la **tabla 4-7**, existe un claro patrón en cuanto al comportamiento del pH luego de 72 horas de fermentación, donde el aumento en la concentración de sólidos y de levadura en el biorreactor condujo a valores de pH finales más altos.

Tabla 4-7. Valores finales de pH luego de 72 horas de fermentación

Concentración de sólidos (%)	Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
	0	6	12	24
10	4.2	4.5	4.6	4.8
20	4.4	4.9	4.9	5.0
29.2	4.5	-	5.1	-

Al analizar la **figura 4-4**, se observó que la eficiencia de acidificación se redujo durante las 72 horas de fermentación respecto a las referencias en los casos donde se adicionó *S. cerevisiae*. Para concentraciones de sólidos de 10 y 20%, los rangos de eficiencia de acidificación oscilaron entre 15 – 16% y 18 – 19%, respectivamente, mientras que para el único caso de fermentación con 29.2%_{ST} fue del 13%. La reducción de este parámetro se debe principalmente a que se está propiciando una fermentación alcohólica donde el sustrato disuelto está siendo convertido principalmente en etanol (pKa = 15.7) y, además, se evidencia la producción en menor proporción de metanol (pKa = 15.2). De acuerdo a Smith (2016), estos dos compuestos son anfóteros, es decir, tienen la capacidad de actuar como bases en presencia de compuestos con un pKa significativamente menor, además, los alcoholes presentan un pH cercano a la neutralidad. Debido a ello, aunque existe la producción de ácido láctico y AGV, el predominio del etanol sobre el resto de metabolitos podría explicar la razón del porqué en los casos de la FORSU fermentada con *S. cerevisiae* las caídas de pH no fueron tan bruscas como en el caso de la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa.

➤ Pérdida de sólidos volátiles

Tras 72 horas de fermentación, se registró una pérdida de SV debido a la hidrólisis de la materia orgánica contenida en la FORSU, cuyos resultados se muestran en la **tabla 4-8**. Los valores de SV medidos en el inicio de la fermentación en cada biorreactor fueron de 7.4, 14.7 y 21.5% para concentraciones de sólidos de 10, 20 y 29.2%, respectivamente.

En todos los experimentos donde se adicionó levadura, existió una remoción mayor de sólidos volátiles alimentados al reactor en comparación con la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa. Aunque no existió una tendencia clara en cuanto al efecto de las distintas concentraciones de levadura adicionada a la FORSU se pudo notar que, al aumentar la concentración de sólidos, la pérdida de sólidos volátiles fue mayor.

Tabla 4-8. SV en el reactor luego de 72 horas de fermentación

Concentración de sólidos (%)	Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
	0	6	12	24
10	6.5	6.2	6	6.1
20	14	11	12.6	12.3
29.2	19.3	-	17.3	-

Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) observaron una pérdida de los sólidos volátiles del 10, 21 y 6% para concentraciones de sólidos del 10, 20 y 28%, durante el ensilado de la FORSU a 35°C utilizando la microflora nativa. Estos valores fueron superiores a los registrados en el presente trabajo debido principalmente a que los autores mencionados anteriormente prolongaron la fermentación durante 15 días. Por otro lado, en el trabajo realizado por Moreno et al. (2021), se pudo evidenciar apenas una reducción del 3% en el contenido de sólidos volátiles inclusive luego de que la FORSU fue sometida a un proceso de Sacarificación y fermentación simultáneas no isotérmicas.

4.3. Metanización de las fracciones sólidas de la FORSU fermentada

Luego de 72 horas de fermentación, el contenido de cada biorreactor fue retirado y centrifugado a fin de obtener dos fases, una líquida, la cual contenía metabolitos, y una sólida, la cual estuvo constituida por el material particulado sedimentable de la FORSU fermentada (**Imagen 4-1**).

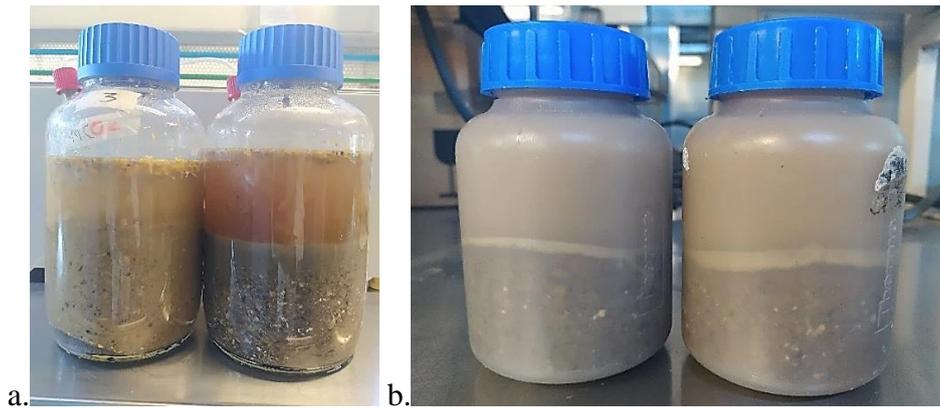


Imagen 4-1. Fermentado obtenido luego de 72 horas

Nota: La imagen 4.1a contiene la FORSU fermentada (izquierda) y sin fermentar (derecha), mientras que la imagen 4.1b contiene la fracción líquida y sólida de la FORSU luego de la centrifugación.

4.3.1. Características del digestato espesado (fracción sólida)

Previo a someter el fermentado espesado a la prueba de potencial bioquímico de metano, (PBM) se cuantificaron los sólidos totales y volátiles de las fracciones sólidas centrifugadas de la FORSU fermentada y fresca (F.S), así como del inóculo cuyos resultados se muestran en la **tabla 4-9**.

Al someter la FORSU fresca a centrifugación, se removió un 4.8% de humedad tomando en consideración los ST de la FORSU íntegra (29.2%), lo que resultó en el incremento del contenido de sólidos en la fracción sólida obtenida (F.S.) (34%). En el caso de las fracciones sólidas obtenidas a partir de la FORSU fermentada bajo las distintas condiciones, fue posible remover entre 8.2 – 11.5% y 9.2 – 14.5% de humedad mediante centrifugación para concentraciones de sólidos del 10 y 20%, respectivamente, mientras que para 29.2%_{ST} las remociones oscilaron entre 3.2 y 4.6% con respecto a los sólidos alimentados al inicio de la fermentación.

De acuerdo a Odirile et al. (2021), durante la digestión anaerobia, cuya etapa previa es la fermentación, se forma agua conduciendo a una reducción de la concentración de sólidos totales y volátiles, además, otros factores que inciden en la estimación de SV y ST es el grado de centrifugación, formación de espacios intersticiales en los sólidos debido a la

hidrólisis, retención de biogás entre los poros, entre otros. Debido a ello, la forma más efectiva de evidenciar la remoción de materia orgánica (sólidos volátiles) es con base en la relación SV/ST.

Tabla 4-9. Características del inóculo, fracciones sólidas fermentadas y fresca de la FORSU

		Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
		0	6	12	24
		Contenido de sólidos (%)			
10%_{ST}	ST	18.2 ± 0.4	21.4 ± 0.1	20.6 ± 0.2	21.5 ± 0.1
	SV	14.7 ± 0.4	15.9 ± 0.2	16.0 ± 0.1	16.9 ± 0.1
	SV/ST	0.81	0.74	0.78	0.79
20%_{ST}	ST	29.2 ± 0.4	30.4 ± 0.3	34.5 ± 0.3	29.9 ± 0.8
	SV	22.6 ± 0.5	18.7 ± 0.5	19.7 ± 0.1	22.2 ± 0.4
	SV/ST	0.77	0.62	0.57	0.74
29.2%_{ST}	ST	33.8 ± 0.6	-	32.4 ± 1.5	-
	SV	24.5 ± 0.1	-	22.3 ± 0.4	-
	SV/ST	0.72	-	0.69	-
F.S.	ST		34 ± 2.2		
	SV		23.9 ± 1.6		
	SV/ST		0.70		
Inóculo	ST		10.6 ± 0.1		
	SV		8.4 ± 0.1		

De acuerdo a la información proporcionada en la **tabla 4-9**, se observa que la relación SV/ST fue mayor en aquellas condiciones donde se fermentó la FORSU únicamente con la microflora nativa mientras que, en los casos donde se bioaumentó con levadura, esta relación disminuyó en comparación con los valores referenciales. Esta información corrobora los resultados obtenidos en la **tabla 4-8**, donde se visualizó que la bioaumentación de *S. cerevisiae* en la FORSU indujo una mayor remoción de sólidos volátiles en comparación con la fermentación realizada únicamente con la microflora nativa. Además, en el caso de los experimentos donde se adicionó levadura, se observa que, para concentraciones de sólidos del 10 y 20%, existe una relación directa entre SV/ST y la concentración de *S. cerevisiae*. Esto indicaría que a medida que se incrementa la dosis de levadura en el reactor, existe una menor remoción de material orgánico.

Adicionalmente, se observó que en los experimentos donde se fermentó la FORSU con la microflora nativa y *S. cerevisiae*, la relación SV/ST tiende a disminuir a medida que se

incrementa la concentración de sólidos alimentados al reactor, esto indicaría que la remoción de materia orgánica (sólidos volátiles) es mayor cuando la concentración de sustrato se incrementa. De acuerdo a Darvishi-Harzevili & Hiligsmann (2018), la hidrólisis de la materia orgánica particulada en sustratos sólidos está determinada por la adsorción de enzimas hidrolíticas en las superficies biodegradables. Además, Morales-Polo et al. (2018) sugieren que es necesario un buen contacto o interacción entre el sustrato y las bacterias para que la hidrólisis sea adecuada de tal modo que se permita a las enzimas desarrollar la reacción extracelular a través de la adsorción en la superficie del sustrato.

De este modo, la tendencia de los datos reportados en esta investigación posiblemente se debe a que, cuando existe un alto contenido de humedad, las bacterias se encuentran suspendidas en el medio (como sólidos suspendidos totales, SST), mientras que a medida que se incrementa la concentración de sólidos tienden a adherirse al sustrato particulado por lo que las enzimas secretadas por las bacterias actúan en la superficie adyacente, incrementando la degradación del sustrato complejo. A este comportamiento se suma el hecho de que las bacterias se desarrollaron en un medio sin sustrato disuelto ya que este fue consumido por *S. cerevisiae*, lo que pudo inducir a las bacterias hidrolítico-fermentativas a consumir el sustrato más complejo a través de la hidrólisis.

4.3.2. Potencial bioquímico de metano (PBM)

Las fracciones sólidas obtenidas de la centrifugación de la FORSU fresca, y fermentada con y sin bioaumentación de *S. cerevisiae* fueron sometidas a PBM durante 28 días con el fin de determinar la biodegradabilidad del sustrato con base en la medición de la producción específica de metano (PEM), donde la riqueza de metano en el biogás obtenido a partir de las distintas fracciones sólidas, osciló entre el 67 y 75%. Los resultados de estas pruebas se encuentran en la **tabla 4-10**.

Se observó que en el 86% de los experimentos donde se bioaumentó la FORSU con *S. cerevisiae*, existió un aumento en la producción específica de metano a partir del digestato espesado con respecto a la FORSU fresca, este mismo porcentaje se obtuvo al comparar con respecto a las fracciones sólidas obtenidas a partir de la FORSU fermentada únicamente con la microflora nativa (referencias). Con base en el análisis de los datos

reportados, respecto a los valores referenciales, existieron incrementos de la PEM entre el 3 y 34%, sin embargo, existió un experimento (10%_{ST} y 24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}) donde la producción de metano se redujo un 9%. Al comparar respecto a la FORSU fresca, considerando los experimentos con y sin adición de levadura, también se registró un incremento en la PEM cuyos valores fluctuaron entre 7 y 41%, no obstante, para la fermentación con 20%_{ST} en condiciones naturales y con adición de 24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}, la producción se redujo en 6 y 3%, respectivamente.

Tabla 4-10. Producción específica de metano de las fracciones sólidas y FORSU fresca

Concentración de sólidos (%)	Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
	0	6	12	24
	PEM (NL-CH ₄ /kg _{SV})			
10	362 ± 11	464 ± 2	385 ± 23	330 ± 26
20	308 ± 3	412 ± 15	360 ± 1	318 ± 10
29.2	352 ± 9		412 ± 3	
FORSU			329 ± 5	
F.S.			174 ± 5	

En la prueba de potencial bioquímico de metano realizada a la fracción sólida centrifugada de la FORSU fresca (F.S.), se observó que la producción de metano fue baja en comparación con la FORSU fresca, esto debido a que se extrajo un 4% de humedad al momento de centrifugar de modo que una parte de los carbohidratos disueltos y en suspensión fueron removidos conduciendo a la reducción en la producción de metano. Con base en los resultados de este experimento, que sirvió como una referencia adicional al de la FORSU fresca y fermentada con la microflora nativa, en el 100% de los casos donde se fermentó la FORSU con y sin adición de levadura hubo un incremento en la PEM de entre el 77 y 166% a partir de las fracciones sólidas fermentadas. Además, se evidenció una relación inversa entre la concentración de *S. cerevisiae* adicionada a la FORSU y la producción específica de metano para concentraciones de sólidos de 10 y 20%, solamente en los casos donde se adicionó levadura.

Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) evidenciaron que la FORSU fresca es capaz de producir 318 NL-CH₄/kg_{SV}, valor que es muy similar al registrado en el presente estudio. Además, luego de ensilar la FORSU a 35°C, estos autores visualizaron una pérdida en el contenido de sólidos volátiles lo que condujo a una producción de metano inferior al de la FORSU fresca. En el presente trabajo, se observó lo contrario ya que, con

excepción de un solo caso, los ensayos donde se adicionó levadura tendieron a producir una cantidad de metano superior al de la FORSU fresca y, también, con respecto a cada referencia salvo determinados casos. Este comportamiento diferido en la producción de metano pudo deberse al tipo de fermentación que se propició en cada estudio y el tiempo que duró la prueba.

En la presente investigación se impulsó una fermentación alcohólica durante 72 horas mediante la inoculación de una cepa de levadura a la FORSU donde el metabolito predominante fue el etanol y solamente se metanizaron las fracciones sólidas durante 28 días, mientras que en el estudio realizado por los autores mencionados anteriormente fue una fermentación heteroláctica que duró 15 días donde el metabolito dominante fue el ácido láctico, la pérdida de sólidos volátiles fue mayor y las pruebas de PBM fueron realizadas durante 21 días a la FORSU íntegra, es decir, sin centrifugar. De este modo, además de que haber generado cantidades elevadas de etanol, los digestatos producidos a partir de la fermentación selectiva a etanol fueron capaces de producir cantidades superiores de metano inclusive luego de extraer el sobrenadante.

Con excepción de los ensayos con 10%_{ST}, aunque existió una menor disponibilidad de materia orgánica (sólidos volátiles) en las fracciones sólidas extraídas de la fermentación predominantemente etanólica con respecto a las referencias, los resultados sugieren que el incremento en la producción de metano pudo verse impulsada por el contenido de etanol y ácido acético en las fracciones sólidas debido a que, inclusive luego de la centrifugación para extraer la fracción líquida, los digestatos espesados retuvieron entre el 66 y 79% de la humedad (metabolitos). De acuerdo a Jojoa-Unigarro & González-Martínez (2021), el etanol es el segundo sustrato preferido por las bacterias metanógenas durante la producción de metano después del ácido acético, mientras que el ácido láctico es uno de los menos preferidos lo que implica una menor producción específica de metano.

De acuerdo a Kreuger et al. (2011), durante la fermentación láctica (ensilaje) de distintos tipos de biomasa lignocelulosa, aunque se han evidenciado pérdidas de sólidos volátiles de entre el 18 y 35%, se han registrado mejoras en el rendimiento de metano de entre el 25 y 42%. Moreno et al. (2021), por ejemplo, evidenciaron que, inclusive luego de extraer el etanol de la FORSU fermentada con *S. cerevisiae* previa aplicación de pretratamiento

y perder 3% de sólidos volátiles en este proceso, al someter a PBM el residuo del destilado durante 28 días se produjeron 385 ± 7 L-CH₄/kg_{SV} mientras que, para la FORSU fresca, la PEM fue de 381 ± 18 L-CH₄/kg_{SV}. Los resultados de los autores mencionados anteriormente y los mostrados en la presente investigación, sugieren que la FORSU fermentada selectivamente a etanol tiene capacidad para producir metano en cantidades superiores a la FORSU fresca inclusive luego de que se han extraído metabolitos. Esto posiblemente se debe a un incremento en la digestibilidad de los sólidos de la FORSU asociado a que los materiales remanentes de la fermentación (almidones, proteínas, pectinas y lípidos) se encuentran parcialmente degradados y pueden ser consumidos con mayor facilidad por los microorganismos durante la digestión anaerobia.

Contrario a lo evidenciado por el autor mencionado anteriormente, Ebrahimian et al. (2020), luego de someter a digestión anaerobia durante 45 días la fracción sólida obtenida de la centrifugación de la FORSU pretratada previamente con una solución de etanol-agua-ácido acético e hidrólisis enzimática, evidenciaron una reducción en la producción de metano ($148 - 273$ L-CH₄/kg_{SV}) en comparación con la FORSU que solamente fue sometida a hidrólisis enzimática donde se produjeron 285 L-CH₄/kg_{SV}. Otros autores que realizaron estudios similares sobre la FORSU aplicando pretratamientos termoquímicos (Mahmoodi et al., 2018a) e hidrotermales (Mahmoodi et al., 2018b) seguidos de hidrólisis enzimática, evidenciaron producciones de metano variables que dependieron de las condiciones de pretratamiento de la FORSU. Mahmoodi et al. (2018a) registraron una producción de metano de 271 L-CH₄/kg_{SV}, mientras que Mahmoodi et al. (2018b) alcanzaron un valor de 415 L-CH₄/kg_{SV} en 50 días de digestión anaerobia de la fracción sólida de la FORSU sin pretratamiento pero hidrolizada con enzimas mientras que, al aplicar pretratamiento, las PEM logradas a partir de las fracciones sólidas obtenidas mediante centrifugación de la FORSU oscilaron entre $143 - 295$ y $281 - 662$ L-CH₄/kg_{SV}, respectivamente.

4.3.2.1. Biodegradabilidad de las fracciones sólidas (η_B)

El grado de biodegradabilidad de un sustrato (η_B) es expresado comúnmente como la relación entre el metano producido experimentalmente y el máximo teórico que puede producir un sustrato. Para evaluar la biodegradabilidad de las fracciones sólidas obtenidas de la fermentación de la FORSU, se determinó la máxima cantidad de metano teórico

generada a partir de este sustrato. En condiciones estándar, el PBM teórico máximo calculado para la FORSU de la Ciudad de México fue de 544 NL-CH₄/kg_{SV}. Además, de acuerdo a Xue et al. (2019), existe otro método por el cual también es posible determinar la cantidad de metano teórico con base en el análisis de la composición de la FORSU como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\eta_{\text{Cteórico-CH}_4} = \frac{373 \cdot \% \text{VFA} + 415 \cdot \% \text{CH} + 496 \cdot \% \text{P} + 1014 \cdot \% \text{L} + 727 \cdot \% \text{Li}}{100}$$

Donde, VFA: Ácidos grasos volátiles, CH: Carbohidratos totales, P: Proteínas, L: lípidos y Li: Lignina.

De acuerdo a Campuzano (2013), la FORSU de la Ciudad de México registró un 53% de carbohidratos, 15% proteínas, 17% de grasas y aceites, 13% lignina y el 2% restante es debido a otros componentes (con base en los sólidos volátiles), por tanto, la cantidad de metano teórico basada en la ecuación será 561 NL-CH₄/kg_{SV}, valor que es muy cercano al calculado haciendo uso de la relación DQO/SV. La pequeña diferencia que existe entre los valores de metano teórico calculado puede estar relacionada con la variabilidad temporal de la FORSU por lo que el valor de 561 NL-CH₄/kg_{SV} será considerado únicamente para verificar la validez de la información reportada en el presente trabajo con respecto a la cantidad de metano teórico del sustrato.

De acuerdo a la **tabla 4-11** se observa que, con excepción de dos casos (20%_{ST}, referencia y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}), la fermentación de la FORSU fresca previa a la metanización conduce a un incremento en la biodegradabilidad del sustrato tanto en las condiciones donde se bioaugmentó *S. cerevisiae*, así como en los casos donde solamente se dejó actuar a la microflora nativa. Con dosis de 6 y 12 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} se observaron los mayores porcentajes de biodegradabilidad que oscilaron entre el 66 y 85%, mismos que fueron superiores al rango en el que fluctuaron las referencias (57 – 67%). Los experimentos donde se adicionó 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} evidenciaron los menores valores de biodegradabilidad de entre todos los experimentos donde se adicionó levadura a la FORSU; aunque con 10%_{ST} se observó que el valor de este parámetro con respecto a la referencia fue menor, alcanzó un valor igual al de la FORSU fresca inclusive luego de extraer la fracción líquida. Lo contrario fue observado con 20%_{ST} donde el grado de

biodegradabilidad fue superior a la referencia, pero fue ligeramente menor en comparación con la FORSU fresca.

Tabla 4-11. Biodegradabilidad (η_B) de las fracciones sólidas y la FORSU

Concentración de sólidos (%)	Concentración de <i>S. cerevisiae</i> (g/kg _{FORSU})			
	0	6	12	24
10	67	85	71	61
20	57	76	66	58
29.2	65		76	
FORSU			61	
F.S.			32	

Siciliano et al. (2021), luego de aplicar oxidación con peróxido de hidrógeno alcalino (PHA) a muestras de FORSU, sometieron el digestato obtenido sin separar la fracción sólida de la líquida a digestión anaerobia durante 50 días inoculando un digestato de un proceso de digestión de lixiviados de compostaje, donde la biodegradabilidad de los sustratos tratados alcanzó entre el 70 y 77%. Aunque las eficiencias de hidrólisis de la materia orgánica fueron elevadas tomando en consideración que se removió el 28% de la DQO en un período de 3 horas de pretratamiento, en la presente investigación se obtuvieron rendimientos de metano comparables e inclusive superiores solamente utilizando el digestato espesado y, además, se obtuvo una fracción líquida rica en etanol, ácido láctico y ácido acético.

4.3.2.2. Comportamiento de las curvas de PEM

La **figura 4-5** muestra el comportamiento de la PEM de las fracciones sólidas y la FORSU fresca en el transcurso de 28 días de duración de la prueba de PBM donde todas las curvas, con excepción de la FORSU fresca, exhibieron un comportamiento diaúxico. Este comportamiento bifásico en las fracciones sólidas de la FORSU fermentada con y sin adición de levadura sugiere que, en una primera fase, las bacterias captan el sustrato disuelto (carbohidratos, AGV, ácido láctico, etc.) y, posteriormente, consumen el sustrato más complejo (proteínas, lípidos, carbohidratos) mediante la acción de hidrolasas. Por otro lado, en el caso de la FORSU fresca, se observaron 3 fases exponenciales sugiriendo que la tendencia de crecimiento bacteriano es triaúxica.

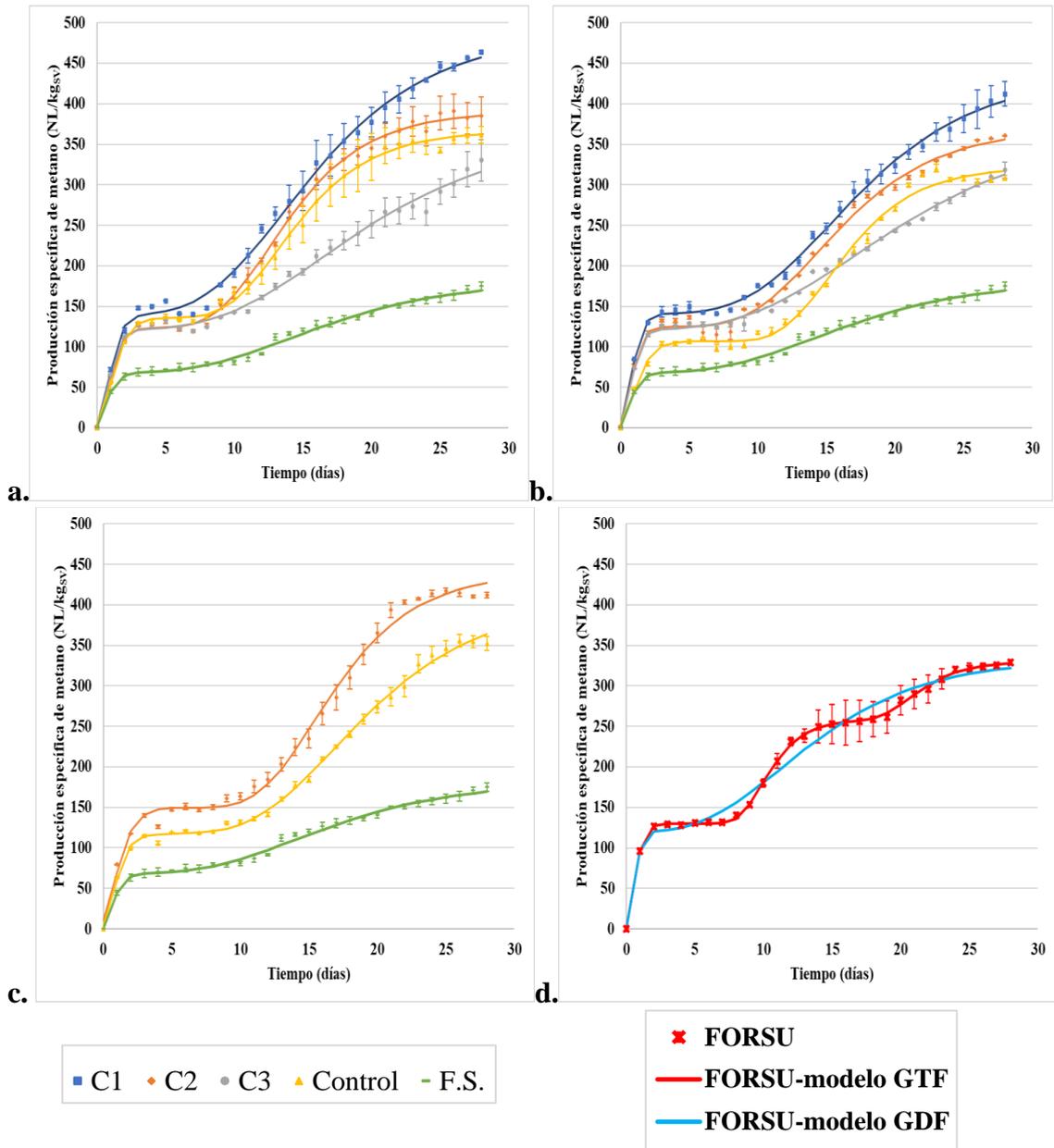


Figura 4-5. PEM y modelamiento de la FORSU fresca y fermentada

Nota: Los literales a, b y c están referidos a las concentraciones de sólidos del 10, 20 y 29.2%, mientras que las iniciales C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}, respectivamente. El literal d se refiere a la FORSU fresca modelada con Gompertz de dos fases (GDF) y de tres fases (GTF). F.S. es la fracción sólida de la FORSU fresca.

En todos los casos se observó que, durante los tres primeros días de metanización, existió una fase exponencial de producción de metano, posteriormente, para las fracciones sólidas extraídas de la fermentación con 10%_{ST} y la FORSU fresca, entre el día 3 y 7

inició la fase estacionaria donde la producción de metano se mantuvo cuasi-constante y a partir del día 8 empezó una segunda fase exponencial.

Por otro lado, en el caso de los digestatos espesados obtenidos a partir de una fermentación con 20%_{ST}, la fase estacionaria se observó entre el día 3 y 8, es decir, un día más en comparación con la prueba con 10%_{ST}, y a partir del día 9 se observó la segunda fase exponencial de producción de metano. Mientras que en las pruebas donde se utilizó una concentración de sólidos del 29.2%, la fase estacionaria fue visualizada entre el día 3 y 9; posteriormente, a partir del día 10, fue posible evidenciar la segunda fase de mayor producción de metano. A diferencia de los experimentos donde se fermenta la FORSU con y sin adición de levadura, la FORSU fresca presentó una segunda fase de latencia entre los días 14 y 19, y una tercera fase exponencial a partir del día 20 la cual fue menor en comparación con la primera y segunda fase exponencial.

Aunque no existen trabajos que analicen a profundidad el comportamiento triaúxico en curvas de metano a partir de la FORSU, Campuzano (2013) reportó dentro de sus resultados un experimento donde se visualiza que la curva de producción de metano obtenida a partir de la lixiviación de la FORSU, presenta dos fases de latencia diferenciadas entre sí las cuales tienen semejanza a las reportadas en el presente trabajo. Este tipo de crecimiento fue dilucidado por Monod (1947) a partir del estudio de *E. coli* cultivadas en una mezcla de glucosa/sorbitol/glicerol. El experimento realizado por este autor demostró los mecanismos subyacentes a la adaptación enzimática, donde los organismos consumen un sustrato A fácilmente asimilable y, solo cuando este se haya agotado, dispondrán de enzimas para degradar un compuesto B y luego un C; este mecanismo es comúnmente conocido como represión catabólica por carbono (RCC).

Trabajos previos como los de Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021), Figueroa-Escamilla (2018) y Campuzano (2013) observaron un comportamiento diaúxico en muestras de la FORSU producida en la Ciudad de México sometidas a PBM durante 21 días, sin embargo, a diferencia de los autores mencionados anteriormente, inclusive luego de someter las fracciones sólidas durante 28 días a PBM no se observó, en algunos casos, un comportamiento asintótico donde la producción diaria menor al 1% del total acumulado durante 3 días consecutivos que, de acuerdo al criterio de Holliger et al. (2016), indicaría que se alcanzó la máxima producción de metano. De acuerdo a la **figura**

4-5 se observó que, para las pruebas de 10 y 20%_{ST}, con concentraciones de levadura de 6 y 12 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU} la producción de metano continuó en el tiempo, mientras que para el resto de casos, con excepción de la FORSU fresca, a partir del día 24 ya se visualizó el inicio de la asíntota.

A diferencia de lo reportado por Castellón-Zelaya & González-Martínez (2021) y Figueroa-Escamilla (2018), para la FORSU fresca y las condiciones donde se fermentó la FORSU con y sin adición de levadura, se observó que entre el 32 y 40% del metano fue generado durante los 3 primeros días de metanización, mientras que los autores mencionados anteriormente observaron que en este mismo período se generó el 60% del metano total generado en 21 días. La diferencia con los valores reportados en este trabajo puede deberse al tiempo de duración de la prueba de PBM ya que al extenderse 7 días más la generación de metano fue mayor y, por tanto, se subestimó el porcentaje producido en comparación con los autores citados. Además, los autores mencionados anteriormente no registraron la tercera fase exponencial debido posiblemente a que ésta coincidió con la segunda fase de latencia (producción diaria <1%) lo cual fue indicativo para detener la prueba, no obstante, en la presente investigación se extendió hasta los 28 días en todos los casos ya que se observó que en algunos experimentos la producción de metano continuó sin lograr alcanzar una producción menor al 1% del acumulado inclusive luego de casi un mes de prueba de PBM.

4.3.2.3. Cinética de la metanización y modelamiento

La **figura 4-5** muestra el modelamiento de las curvas de producción específica de metano obtenidas a partir de la prueba de PBM de las fracciones sólidas obtenidas de la fermentación de la FORSU con y sin adición de *S. cerevisiae*. En todos los casos, con excepción de la FORSU fresca, se observó un coeficiente R² mayor a 0.99 sugiriendo que la aplicación del modelo modificado de Gompertz en dos fases (GDF) puede ser potencialmente extendida a sustratos que al ser metanizados exhiban una curva diaúxica como el caso de la FORSU de la Ciudad de México.

Debido a que la FORSU fresca presentó 3 fases exponenciales, al intentar aplicar el modelo de Gompertz en dos fases existieron errores en el cálculo de los parámetros cinéticos por lo cual se empleó el modelo matemático de Gompertz en tres fases (GTF)

(figura 4-5d). Esta modificación al modelo está fundamentada matemáticamente en el modelo inicial de Gompertz en dos fases propuesto por Gomes et al. (2021) con la adición de 3 coeficientes adicionales (A_3 , μ_{m3} y λ_3); el coeficiente de determinación R^2 fue inclusive mayor en comparación con los casos anteriores.

La tabla 4-12 muestra, además, el resumen de parámetros cinéticos con sus respectivas desviaciones estándar (s) obtenidos del modelamiento de las curvas de producción específica de metano para la fracción sólida y FORSU frescas, y las fracciones sólidas de la FORSU fermentada con y sin bioaumentación de *S. cerevisiae*. En el caso de la FORSU fresca, se obtuvieron 3 parámetros adicionales A_3 , μ_{m3} y λ_3 cuyos valores fueron 72.3 ± 3.5 NL/kg_{SV}, 12.2 ± 1.0 NL/kg_{SV}·día y 18.5 ± 0.3 días.

Tabla 4-12. Parámetros cinéticos para la prueba de PBM de las fracciones sólidas y la FORSU fresca

%ST		A_1	s	μ_{m1}	s	λ_1	s	A_2	s	μ_{m2}	s	λ_2	s	R^2
10	NT	136.3	2.8	68.3	9.6	0.2	0.2	230.3	4.8	22.8	0.9	9.5	0.3	0.998
	C1	139.7	6.0	94.4	30.3	0.2	0.3	346.3	14.3	21.7	0.9	7.7	0.5	0.996
	C2	123.8	3.3	84.1	22.1	0.2	0.2	266.5	5.6	25.0	1.0	8.6	0.3	0.998
	C3	121.0	5.3	99.9	51.1	0.3	0.4	241.8	23.9	11.8	0.7	8.8	0.8	0.992
20	NT	107.0	3.5	51.5	13.5	0.1	0.3	215.5	7.6	22.8	1.6	11.7	0.4	0.993
	C1	141.3	3.1	109.9	27.9	0.2	0.2	296.4	10.6	18.0	0.6	9.2	0.3	0.998
	C2	124.8	3.5	104.9	48.1	0.3	0.4	245.9	9.0	18.4	0.9	9.4	0.4	0.995
	C3	121.3	3.6	107.0	45.1	0.3	0.3	246.7	19.2	11.3	0.4	9.0	0.6	0.996
29.2	NT	117.3	2.6	70.6	13.0	0.1	0.2	286.7	11.9	17.9	0.6	11.0	0.3	0.997
	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C2	149.7	4.4	69.8	14.5	0.0	0.2	289.5	10.9	26.3	1.7	11.3	0.4	0.994
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FORSU		129.9	1.1	133.5	25.5	0.2	0.1	128.4	2.3	28.4	1.4	8.2	0.1	0.999
F.S.		68.2	2.7	55.8	17.7	0.2	0.3	113.9	7.6	6.4	0.4	7.5	0.8	0.993

Nota: NT, C1, C2 y C3 están referidos a las concentraciones de *S. cerevisiae* de 0, 6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}, respectivamente. NT se refiere a la referencia. Las dimensiones de A_i , μ_{mi} y λ_i están en NL/kg_{SV}, NL/kg_{SV}·día y días, respectivamente.

En todos los casos se observó que la máxima producción de metano durante la primera fase exponencial (A_1) fue menor a la obtenida durante la segunda fase exponencial (A_2), esto debido principalmente a que, al igual que en lo mencionado en el inciso 4.3.2.2, la cantidad de metano producido durante esta etapa comprendió entre el 32 y 40% del total

acumulado en 28 días. Además, solamente en los casos donde se adicionó levadura, para concentraciones de sólidos del 10 y 20%_{ST}, se observó que el parámetro A_1 tiende a reducirse a medida que se incrementa la concentración de *S. cerevisiae*.

Se evidenció también que la tasa máxima de producción diaria de metano (μ_{mi}) disminuye en cada fase, es decir, $\mu_{m1} > \mu_{m2}$; tomando en cuenta la FORSU, también se evidenció que $\mu_{m1} > \mu_{m2} > \mu_{m3}$ con excepción de dos casos (24 g*S. cerevisiae*/kg_{FORSU}, 10 y 20%_{ST}). La tendencia en este parámetro está relacionada de forma indirecta con el metabolismo de las bacterias, es decir, la tasa máxima de producción de metano al inicio de la prueba de PBM es mayor debido a que se consume rápidamente el sustrato disuelto lo que conduce a una rápida producción de metano. Cuando las bacterias agotan el sustrato disuelto, entran en una fase de latencia donde se secretan enzimas para hidrolizar el sustrato más complejo ocasionando que en la segunda fase exponencial la tasa disminuya debido a que el sustrato disuelto solo se encuentra disponible a medida que los compuestos complejos son hidrolizados hasta compuestos asimilables por las bacterias. En el caso de la FORSU fresca la tasa disminuye aún más debido posiblemente a que aún existe sustrato complejo susceptible de ser hidrolizado.

Al analizar el parámetro lambda (λ), se observó que en la primera fase de latencia (λ_1), los valores obtenidos fueron menores a 0.3 días sugiriendo que el inóculo tuvo una fase de adaptación pequeña de tal modo que consumió inmediatamente el sustrato disuelto contenido en las fracciones sólidas con la consecuente producción de metano. Adicionalmente, para concentraciones de sólidos del 10 y 20%, se observó que λ_2 fue mayor en las condiciones de referencia en comparación con los experimentos donde se adicionó *S. cerevisiae*, no obstante, este comportamiento fue contrario para 29.2%_{ST}.

De acuerdo a Pererva et al. (2020), a pesar de que existe una gran cantidad de publicaciones dedicadas a modelar las pruebas de PBM y numerosos intentos de estandarizar los procedimientos, no existe un modelo matemático "único para todos" para describir con precisión la cinética de formación de metano. Campuzano (2013) y Castellón (2021) han estudiado ampliamente la producción de metano a partir de la FORSU de la Ciudad de México bajo distintas condiciones; entre las variables investigadas se encuentra el efecto de la concentración de sólidos y la temperatura, el

ensilado y lixiviación de la FORSU, la relación S/I, entre otros, donde también se ha aplicado distintos modelos para explicar la tendencia de producción de metano.

Campuzano (2013) estudió la producción de metano a partir de los extractos obtenidos de la lixiviación de la FORSU donde también observó un comportamiento diaúxico e inclusive triaúxico en algunos casos. Para el modelamiento de las curvas de producción de metano, el autor seccionó la curva en varias partes y realizó el análisis de forma individual. En el caso de la fase inicial de la metanización, utilizó un modelo exponencial ($P_{CH_4} = a \cdot e^{b \cdot t}$) ya que, como se evidenció también en la presente investigación, el inóculo requirió un bajo tiempo de aclimatación ocasionado que se inicie inmediatamente con la fase exponencial. Tanto la fase de latencia como la segunda fase exponencial fueron modelados utilizando modelos lineales ($P_{CH_4} = a \cdot t + b$), mientras que la última sección de la curva, perteneciente a la fase de estabilización, fueron modelados utilizando Monod ($P_{CH_4} = \mu_m \cdot \frac{t}{K_s + t}$) y también asumiendo una cinética de primer orden ($P_{CH_4} = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t})$).

Una metodología similar fue observada en el trabajo de Castellón (2021) el cual aplicó modelos similares a las curvas de generación de metano a partir de la FORSU ensilada mediante la aplicación de diferentes relaciones S/I. Además de utilizar el modelo de Monod descrito anteriormente, aplicó el modelo de Tessier ($P_{CH_4} = \mu_m \cdot \left(1 - e^{-\frac{S}{K_T}}\right)$). En este caso, el autor no seccionó las curvas, sin embargo, realizó la modelación considerando únicamente la información recopilada durante los 10 primeros días ya que, a partir de este tiempo, se alcanzó la fase de estabilización.

Aunque en la presente investigación también se trabajó con base en el seccionamiento de las curvas de metanización, el modelo matemático utilizado para explicar las distintas fases del proceso se fundamenta en una sola ecuación matemática. De igual modo, el modelo modificado de Gompertz en dos y tres fases es robusto, de tal modo que permite estudiar los parámetros cinéticos de forma fácil y rápida ya que, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente, a partir de este modelo es posible predecir con un margen de error reducido la cantidad de metano y el tiempo en que se genera utilizando una ecuación unificada. Además, debido a que el modelo de Gompertz en dos y tres fases explicaría el comportamiento de las curvas PEM obtenidas en el presente trabajo, es

posible inclusive obtener la duración de las fases de latencia de una forma exacta mediante el cálculo de la segunda derivada como se explicó en el capítulo de metodología.

5. CONCLUSIONES

1. **Fermentación de la FORSU.** Se evaluó el efecto del aumento de la concentración de sólidos (10, 20 y 29.2%) y la bioaumentación de *S. cerevisiae* (6, 12 y 24 g/kg_{FORSU}) sobre la producción de etanol, ácido láctico y AGV.
2. **Potencial bioquímico de metano (PBM).** Se llevó a cabo la metanización de las fracciones sólidas (digestatos espesados) de la FORSU fermentada selectivamente a etanol con el fin de evaluar el potencial de producción de metano de estos sustratos previa extracción de metabolitos.

Fermentación de la FORSU

- Independientemente de las concentraciones de sólidos y levadura, el etanol fue el metabolito predominante seguido del ácido láctico y ácido acético llegando a conformar conjuntamente más del 95% de los metabolitos totales producidos.
- La bioaumentación de la FORSU con *S. cerevisiae* permitió captar rápidamente el sustrato disuelto y convertirlo a etanol, lo cual comprueba la hipótesis planteada para la fermentación de la FORSU.
- La máxima concentración de etanol (43.4 ± 0.1 g/L de etanol) fue obtenida con una concentración de 12 g *S. cerevisiae*/kg_{FORSU} y 29.2% de sólidos totales, cuyo rendimiento específico correspondiente fue 310 ± 1 g_{DQO}/kg_{ST}.
- En la FORSU fermentada solamente con la microflora nativa, entre el 64 y 92% de los carbohidratos solubles fueron consumidos en 24 horas mientras que, con bioaumentación de *S. cerevisiae*, un porcentaje similar (66 – 89%) fue consumido durante las 9 primeras horas de fermentación.
- Mas del 95% de los carbohidratos disueltos presentes en la FORSU fermentada con y sin adición de *S. cerevisiae* fueron consumidos en un período de 48 horas de fermentación.
- El ácido acético fue el metabolito predominante entre los AGV producidos en todas las condiciones de fermentación.
- Las fracciones sólidas extraídas de la fermentación de la FORSU con adición de levadura presentaron las mayores pérdidas de sólidos volátiles.

Potencial bioquímico de metano (PBM)

- Con excepción de dos casos (20%_{ST}, referencia y 24 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU}), la fermentación de la FORSU fresca previo a la metanización condujo a un incremento en el rendimiento de metano de las fracciones sólidas tanto en las condiciones donde se bioaugmentó *S. cerevisiae*, así como en los casos donde solamente se dejó actuar a la microflora nativa.
- Inclusive luego de extraer los metabolitos de la FORSU fermentada selectivamente a etanol, el 86% de las fracciones sólidas fueron capaces de producir metano (385 – 464 NL-CH₄/kg_{SV}) en cantidades superiores a la FORSU fresca (329 ± 5 NL-CH₄/kg_{SV}) y las referencias (308 – 362 NL-CH₄/kg_{SV}).
- Con dosis de 6 y 12 g_{S. cerevisiae}/kg_{FORSU} se observaron porcentajes de biodegradabilidad que oscilaron entre el 66 y 85%, mismos que fueron superiores comparados con el rango en el que fluctuaron las fracciones sólidas fermentadas con la microflora nativa (57 – 67%) y la FORSU (61%).
- Las curvas bifásicas de producción específica de metano fueron modeladas mediante la aplicación del modelo modificado de Gompertz en dos etapas logrando ajustes (R²) superiores a 0.99.

6. REFERENCIAS

1. Acton, A. (2013). *Hydroxides - Advances in Research and Application: 2013 Edition*. ScholarlyEditions.
2. Ali, M. F., & Tahir, M. (2021). An Overview on the Factors Affecting Water-soluble Carbohydrates Concentration during Ensiling of Silage. *Journal of Plant and Environment*, 3(1), 63-80. <https://doi.org/10.33687/jpe.003.01.3702>
3. APHA (Ed.). (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association.
4. Arora, D. K., Bridge, P. D., & Bhatnagar, D. (Eds.). (2004). *Handbook of fungal biotechnology* (2nd ed., rev.expanded). Marcel Dekker.
5. Babazadeh, R., Lahtvee, P.-J., Adiels, C. B., Goksör, M., Nielsen, J. B., & Hohmann, S. (2017). The yeast osmopressure response is carbon source dependent. *Scientific Reports*, 7(1), 990. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01141-4>
6. Bamforth, C., & Cook, D. (2019). *Food, fermentation and microorganisms* (Second edition). John Wiley & Sons, Inc.
7. Barampouti, E., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K., & Loizidou, M. (2019). Liquid biofuels from the organic fraction of municipal solid waste: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 110, 298-314. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.005>
8. Bhaskar, T., Varjani, S., Pandey, A., & Rene, E. (Eds.). (2021). *Waste biorefinery: Value addition through resources utilization* (1era ed.). Elsevier.
9. Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N., & Sineokii, S. P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), 755-758. <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>
10. Buckeridge, M. S., & Goldman, G. H. (Eds.). (2011). *Routes to cellulosic ethanol*. Springer.
11. Campuzano, R. (2013). *Lixiviación de residuos sólidos orgánicos urbanos para incrementar la rapidez de producción de biogás* [PhD Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2015/agosto/0732466/Index.html>
12. Campuzano, R., & González, S. (2015). Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase methane production. *Bioresource technology*, 178, 247-253.

13. Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2016). Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, 54, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>
14. Castellón, M. (2021). *Ensilado de residuos sólidos orgánicos urbanos para la producción de biogás* [PhD Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2021/septiembre/0814913/Index.html>
15. Castellón-Zelaya, M. F., & González-Martínez, S. (2021). Silage of the organic fraction of municipal solid waste to improve methane production. *Water Science and Technology*, 83(10), 2536-2548. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.148>
16. Cheah, Y.-K., Vidal-Antich, C., Dosta, J., & Mata-Álvarez, J. (2019). Volatile fatty acid production from mesophilic acidogenic fermentation of organic fraction of municipal solid waste and food waste under acidic and alkaline pH. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(35), 35509-35522. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05394-6>
17. Chen, Y., Fang, Q., Zhang, L., Zhang, K., Wei, T., & Ping, Q. (2021). Directional production of even carbon volatile fatty acids from peanut meal: Effects of initial pH and hydraulic residence time. *Environmental Engineering Research*, 27(4), 210190-0. <https://doi.org/10.4491/eer.2021.190>
18. Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>
19. Chu, D., & Barnes, D. J. (2016). The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. *Scientific Reports*, 6(1), 25191. <https://doi.org/10.1038/srep25191>
20. Dalena, F., Senatore, A., Iulianelli, A., Di Paola, L., Basile, M., & Basile, A. (2019). Ethanol From Biomass. En *Ethanol* (pp. 25-59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00002-X>
21. Darmawan, A., & Aziz, M. (2022). *Innovative energy conversion from biomass waste*. Elsevier. <http://public.eblib.com/choice/PublicFullRecord.aspx?p=6708591>
22. Darvishi-Harzevili, F., & Hiligsmann, S. (Eds.). (2018). *Microbial fuels: Technologies and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
23. Davidson, M., Sofos, J., & Branen, A. (Eds.). (2005). *Antimicrobials in food* (3rd ed.). Taylor & Francis.

24. Doelle, H., Rokem, S., & Berovic, M. (2009). *Biotechnology—Volume XIII: Fundamentals in Biotechnology* (Vol. 8). Eolss Publishers Co. Ltd.
25. Dong, L., Zhenhong, Y., & Yongming, S. (2010). Semi-dry mesophilic anaerobic digestion of water sorted organic fraction of municipal solid waste (WS-OFMSW). *Bioresource Technology*, *101*(8), 2722-2728.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.007>
26. Duarte, M. S., Oliveira, J. V., Pereira, C., Carvalho, M., Mesquita, D. P., & Alves, M. M. (2021). Volatile Fatty Acids (VFA) Production from Wastewaters with High Salinity—Influence of pH, Salinity and Reactor Configuration. *Fermentation*, *7*(4), 303. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040303>
27. Dubey, R. C. (2014). *Advanced Biotechnology*. S. Chand Publishing.
28. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
29. Durán-Moreno, A., Garcés-Rodríguez, M., Velasco, A. R., Marín-Enríquez, J. C., Gutiérrez-Lara, R., Moreno-Gutiérrez, A., & Delgadillo-Hernández, N. A. (2013). Mexico City's municipal solid waste characteristics and composition analysis. *Revista internacional de contaminación ambiental*, *29*(1), 47-57.
30. Ebrahimian, F., Karimi, K., & Kumar, R. (2020). Sustainable biofuels and bioplastic production from the organic fraction of municipal solid waste. *Waste Management*, *116*, 40-48. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.049>
31. Fernández-Domínguez, D., Astals, S., Peces, M., Frison, N., Bolzonella, D., Mata-Alvarez, J., & Dosta, J. (2020). Volatile fatty acids production from biowaste at mechanical-biological treatment plants: Focusing on fermentation temperature. *Bioresource Technology*, *314*, 123729.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123729>
32. Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., & Romero, L. I. (2014). Dry thermophilic anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid wastes: Solid retention time optimization. *Chemical Engineering Journal*, *251*, 435-440.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.067>
33. Figueroa, L. (2018). *Identificación de compuestos lignocelulósicos contenidos en residuos sólidos orgánicos municipales sobre la producción de biogás* [MSc Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México].
<http://132.248.9.195/ptd2018/diciembre/0783628/Index.html>

34. Figueroa-Escamilla, L. (2018). *Identificación de compuestos lignocelulósicos contenidos en residuos sólidos orgánicos municipales sobre la producción de biogás* [MSc Thesis]. <http://132.248.9.195/ptd2018/diciembre/0783628/Index.html>
35. Fuchs, G., Schlegel, H. G., & Eitinger, T. (Eds.). (2017). *Allgemeine Mikrobiologie: 53 Tabellen* (10 Auflage). Thieme.
36. Gaceta Oficial de la Ciudad de México. (2019). *Programa de Gestión Integral de los Residuos Sólidos para la Ciudad de México 2016-2020* (Diario Oficial N.º 183; Décima Novena Época, p. 226). Gaceta Oficial de la Ciudad de México. https://data.consejeria.cdmx.gob.mx/portal_old/uploads/gacetas/e2fbcdaadd9665d726ee6bd2195eb913.pdf
37. Gameiro, T., Lopes, M., Marinho, R., Vergine, P., Nadais, H., & Capela, I. (2016). Hydrolytic-Acidogenic Fermentation of Organic Solid Waste for Volatile Fatty Acids Production at Different Solids Concentrations and Alkalinity Addition. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(10), 391. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3086-6>
38. Gomes, C. S., Strangfeld, M., & Meyer, M. (2021). Diauxie Studies in Biogas Production from Gelatin and Adaptation of the Modified Gompertz Model: Two-Phase Gompertz Model. *Applied Sciences*, 11(3), 1067. <https://doi.org/10.3390/app11031067>
39. Grady, L., Daigger, G., & Lim, H. (1999). *Biological wastewater treatment* (2nd ed.). Marcel Dekker.
40. Grady, L., Daigger, G., Love, N., & Filipe, C. (Eds.). (2011). *Biological wastewater treatment* (3rd ed.). IWA Publishing.
41. Graves, T., Narendranath, N. V., Dawson, K., & Power, R. (2006). Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(6), 469-474. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0091-6>
42. Haller, E. J. (1995). *Simplified wastewater treatment plant operations*. Taylor & Francis.
43. Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., & Brdjanovic, D. (Eds.). (2008). *Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design* (Vol. 7). IWA Publishing.
44. Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Lacroix, H. F., Ghasimi, D. S. M., Hack, G., Hartel, M.,

- ... Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11), 2515-2522.
<https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
45. Hui, Y., & Khachatourians, G. (1995). *Food biotechnology: Microorganisms*. VCH.
 46. Inamuddin, Ahamed, M., & Prasad, R. (2021). *Recent advances in microbial degradation*. Springer.
<http://public.eblib.com/choice/PublicFullRecord.aspx?p=6676278>
 47. Jahangeer, M., Riasat, A., Mahmood, Z., Numan, M., Munir, N., Ashiq, M., Asad, M., Ali, U., & Salman, M. (2021). Secondary Metabolites from *Saccharomyces cerevisiae* Species with Anticancer Potential. En T. Peixoto Basso & L. Carlos Basso (Eds.), *Saccharomyces*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95067>
 48. Jojoa-Unigarro, G. D., & González-Martínez, S. (2021). Kinetic analysis of the methanization of the byproducts from OFMSW fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, jctb.6921. <https://doi.org/10.1002/jctb.6921>
 49. Jones, C. M., Heinrichs, A. J., Roth, G. W., & Ishler, V. A. (2004). *From harvest to feed: Understanding silage management. Special Circular. The Pennsylvania State University College of Agricultural Sciences. UD016*. Penn State.
 50. Kadhum, H. J., Rajendran, K., & Murthy, G. S. (2017). Effect of solids loading on ethanol production: Experimental, economic and environmental analysis. *Bioresource Technology*, 244, 108-116.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.047>
 51. Kamel, D., Gomma, N., Osman, D., & Hassan, A. (2018). Effect of Water Activity on Growth of Certain Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 2018(0), 97-102. <https://doi.org/10.21608/jfds.2018.77762>
 52. Kang, A. J., & Yuan, Q. (2017). Enhanced Anaerobic Digestion of Organic Waste. En F.-C. Mihai (Ed.), *Solid Waste Management in Rural Areas*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70148>
 53. Karunaratne, D. N., & Pamunuwa, G. (2017). *Food Additives*. BoD – Books on Demand.
 54. Katz, S. (2012). *The art of fermentation: An in-depth exploration of essential concepts and processes from around the world*. Chelsea Green Pub.
 55. Kayhanian, M. (1995). Biodegradability of the organic fraction of municipal solid waste in a high-solids anaerobic digester. *Waste Management & Research*, 13(2), 123-136. [https://doi.org/10.1016/S0734-242X\(95\)90114-0](https://doi.org/10.1016/S0734-242X(95)90114-0)

56. Kim, J.-H., Block, D. E., & Mills, D. A. (2010). Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: An optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1077-1085. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2839-1>
57. König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (2017). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer Berlin Heidelberg.
58. Kreith, F., & Tchobanoglous, G. (Eds.). (2002). *Handbook of solid waste management* (2nd ed). McGraw-Hill.
59. Kreuger, E., Nges, I., & Björnsson, L. (2011). Ensiling of crops for biogas production: Effects on methane yield and total solids determination. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-44>
60. Krömker, V., & Bruckmaier, R. M. (Eds.). (2007). *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene: 65 Tabellen*. Parey.
61. Kumar, S., & Sani, R. (Eds.). (2018). *Biorefining of Biomass to Biofuels: Opportunities and Perception* (1st ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67678-4>
62. Kumar, V., Ali, A., Wun, N., & Khursheed, A. (2019). *Post Treatments of Anaerobically Treated Effluents*. IWA Publishing.
63. Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020-4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
64. Kurbanoglu, E. B., & Kurbanoglu, N. I. (2003). Utilization for lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1), 29-34. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00472-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00472-5)
65. Laila, U., Nurhayati, R., Utami, T., & Rahayu, E. S. (2019). Prediction of Microbial Population in Sorghum Fermentation through Mathematical Models. *Reaktor*, 19(4), 152-161. <https://doi.org/10.14710/reaktor.19.4.152-161>
66. Lee, S., Kang, M., Bae, J.-H., Sohn, J.-H., & Sung, B. H. (2019). Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 209. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00209>
67. Li, R., Chen, S., & Li, X. (2010). Biogas Production from Anaerobic Co-digestion of Food Waste with Dairy Manure in a Two-Phase Digestion System. *Applied*

- Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 643-654. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8533-z>
68. Liguori, R., Ventorino, V., Pepe, O., & Faraco, V. (2016). Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 597-611. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7125-9>
69. Lim, S.-J., Kim, B. J., Jeong, C.-M., Choi, J., Ahn, Y. H., & Chang, H. N. (2008). Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresource Technology*, 99(16), 7866-7874. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.028>
70. Liu, S. (2017). *Bioprocess engineering: Kinetics, sustainability, and reactor design* (Second edition). Amsterdam Elsevier.
71. López-Gómez, J. P., Latorre-Sánchez, M., Unger, P., Schneider, R., Coll Lozano, C., & Venus, J. (2019). Assessing the organic fraction of municipal solid wastes for the production of lactic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 150, 107251. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107251>
72. Maddela-Raju, N., García-Cruzatty, L. C., & Chakraborty, S. (2021). *Advances in the domain of environmental biotechnology: Microbiological developments in industries, wastewater treatment and agriculture*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7>
73. Madigan, M., Martinko, J., & Bender, K. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14va ed.). Pearson Educación. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4760710>
74. Mahmoodi, P., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2018a). Efficient conversion of municipal solid waste to biofuel by simultaneous dilute-acid hydrolysis of starch and pretreatment of lignocelluloses. *Energy Conversion and Management*, 166, 569-578. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.04.067>
75. Mahmoodi, P., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2018b). Hydrothermal processing as pretreatment for efficient production of ethanol and biogas from municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 261, 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.115>
76. Malik, A., & Grohmann, E. (Eds.). (2012). *Environmental protection strategies for sustainable development*. Springer.

77. Mata-Álvarez, J. (2003). *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*. IWA Publishing.
78. Monod, J. (1947). The phenomenon of enzymatic adaptation and its. Bearings on problems of genetics and cellular differentiation. En *Symposium on Development and Growth* (Vol. 7). Princeton University Press.
79. Morales-Polo, C., del Mar Cledera-Castro, M., & Moratilla Soria, B. Y. (2018). Reviewing the Anaerobic Digestion of Food Waste: From Waste Generation and Anaerobic Process to Its Perspectives. *Applied Sciences*, 8(10), 1804.
<https://doi.org/10.3390/app8101804>
80. Moreno, A. D., González-Fernández, C., Ballesteros, M., & Tomás-Pejó, E. (2019). Insoluble solids at high concentrations repress yeast's response against stress and increase intracellular ROS levels. *Scientific Reports*, 9(1), 12236.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48733-w>
81. Moreno, A. D., Magdalena, J. A., Oliva, J. M., Greses, S., Coll Lozano, C., Latorre-Sánchez, M., Negro, M. J., Susmozas, A., Iglesias, R., Llamas, M., Tomás-Pejó, E., & González-Fernández, C. (2021). Sequential bioethanol and methane production from municipal solid waste: An integrated biorefinery strategy towards cost-effectiveness. *Process Safety and Environmental Protection*, 146, 424-431.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.09.022>
82. Narang, A., & Pilyugin, S. S. (2007). Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth. *Journal of Theoretical Biology*, 244(2), 326-348.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.08.007>
83. Navarrete, C., Nielsen, J., & Siewers, V. (2014). Enhanced ethanol production and reduced glycerol formation in *fps1Δ* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* engineered for improved redox balancing. *AMB Express*, 4(1), 86.
<https://doi.org/10.1186/s13568-014-0086-z>
84. Nayono, S. E. (2010). *Anaerobic digestion of organic solid waste for energy production*. KIT Scientific Publishing.
85. Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231-241.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00352.x>
86. Odirile, P. T., Marumoloa, P. M., Manali, A., & Gikas, P. (2021). Anaerobic Digestion for Biogas Production from Municipal Sewage Sludge: A Comparative

- Study between Fine Mesh Sieved Primary Sludge and Sedimented Primary Sludge. *Water*, 13(24), 3532. <https://doi.org/10.3390/w13243532>
87. Olsson, G. (2015). *Water and energy: Threats and opportunities* (2nd ed.). IWA Publ.
 88. Ossa, M. (2020). *Efecto de la carga orgánica sobre la producción de metano y características de digestatos durante la digestión anaerobia de forsu* [MSc Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México].
<http://132.248.9.195/ptd2020/agosto/0802409/Index.html>
 89. Owens, J. M., & Chynoweth, D. P. (1993). Biochemical Methane Potential of Municipal Solid Waste (MSW) Components. *Water Science and Technology*, 27(2), 1-14. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0065>
 90. Palmisano, A., & Barlaz, M. (Eds.). (1996). *Microbiology of solid waste*. CRC Press.
 91. Pandey, A., Larroche, C., & Soccol, C. (Eds.). (2018). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Current advances in solid state fermentation*. Elsevier.
 92. Pele, M., & Cimpeanu, C. (2012). *Biotechnology: An introduction*. Wit Press.
 93. Pererva, Y., Miller, C. D., & Sims, R. C. (2020). Existing Empirical Kinetic Models in Biochemical Methane Potential (BMP) Testing, Their Selection and Numerical Solution. *Water*, 12(6), 1831. <https://doi.org/10.3390/w12061831>
 94. Probst, M., Walde, J., Pümpel, T., Wagner, A. O., & Insam, H. (2015). A closed loop for municipal organic solid waste by lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 175, 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.034>
 95. Ramesh, K. V. (2007). *Food microbiology*. MJP Publ.
 96. Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., De la Rubia, M. A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J. C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., ... de Wilde, V. (2011). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: Evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(8), 1088-1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>
 97. Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., & Majone, M. (2011). Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. En *Comprehensive Biotechnology* (pp. 669-683). Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00464-5>
98. Salminen, S., Wright, A. von, & Ouwehand, A. (Eds.). (2004). *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects* (3rd ed., rev.expanded). Marcel Dekker.
99. Sanders, T. (2001). *Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates*. Wageningen University. <https://edepot.wur.nl/198997>
100. Schlegel, H., Zaborosch, C., & Lalucat, J. (1997). *Microbiología general* (7ma ed.). Ediciones Omega S.A.
101. SEDEMA. (2019). *Inventario de residuos sólidos de la Ciudad de México 2019* (p. 226) [Inventario]. Secretaría del Medio Ambiente. https://www.sedema.cdmx.gob.mx/storage/app/media/DGCPCA/InventarioDeResiduosSolidosDeLaCiudadDeMexico_2019.pdf
102. Semeraro, B., Summa, D., Costa, S., Zappaterra, F., & Tamburini, E. (2021). Bio-Delignification of Green Waste (GW) in Co-Digestion with the Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW) to Enhance Biogas Production. *Applied Sciences*, *11*(13), 6061. <https://doi.org/10.3390/app11136061>
103. Sharma, D., & Saini, A. (2020). *Lignocellulosic Ethanol Production from a Biorefinery Perspective: Sustainable Valorization of Waste*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4573-3>
104. Siciliano, A., Limonti, C., & Curcio, G. M. (2021). Improvement of Biomethane Production from Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW) through Alkaline Hydrogen Peroxide (AHP) Pretreatment. *Fermentation*, *7*(3), 197. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030197>
105. Smith, M. B. (2016). *Organic chemistry: An acid-base approach* (Second edition). CRC Press, Taylor & Francis Group.
106. Song, Y.-J., Oh, K.-S., Lee, B., Pak, D.-W., Cha, J.-H., & Park, J.-G. (2021). Characteristics of Biogas Production from Organic Wastes Mixed at Optimal Ratios in an Anaerobic Co-Digestion Reactor. *Energies*, *14*(20), 6812. <https://doi.org/10.3390/en14206812>
107. Soomro, A. F., Ni, Z., Ying, L., & Liu, J. (2019). The effect of ISR on OFMSW during acidogenic fermentation for the production of AD precursor: Kinetics and synergies. *RSC Advances*, *9*(32), 18147-18156. <https://doi.org/10.1039/C9RA02898F>
108. Steach, H., & Cha, M. (2018). Nutrition and Food Science. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *91*(2), 81-82.

109. Strazzera, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, 226, 278-288.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>
110. Thapa, B., Patidar, S. K., Khatiwada, N. R., Kc, A. K., & Ghimire, A. (2019). Production of Ethanol from Municipal Solid Waste of India and Nepal. In S. K. Ghosh (Ed.), *Waste Valorisation and Recycling* (pp. 47-58). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-2784-1_5
111. Tokuoka, K., & Ishitani, T. (1991). Minimum water activities for the growth of yeasts isolated from high-sugar foods. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(1), 111-119. <https://doi.org/10.2323/jgam.37.111>
112. Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., & Ballesteros, M. (2008). *Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: A review*. 67, 874-884.
113. Tripathi, G. (2010). *Cellular and Biochemical Science*. I. K. International Pvt. Ltd.
114. Troller, J. A., & Stinson, J. V. (1981). Moisture Requirements for Growth and Metabolite Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(4), 682-687. <https://doi.org/10.1128/aem.42.4.682-687.1981>
115. VDI 4630. (2016). *VDI 4630—Fermentation of organic materials—Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests*. Verein Deutscher Ingenieure (VDI). <https://www.vdi.de/richtlinien/details/vdi-4630-fermentation-of-organic-materials-characterization-of-the-substrate-sampling-collection-of-material-data-fermentation-tests>
116. Vergine, P., Sousa, F., Lopes, M., Silva, F., Gameiro, T., Nadais, H., & Capela, I. (2015). Synthetic soft drink wastewater suitability for the production of volatile fatty acids. *Process Biochemistry*, 50(8), 1308-1312.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.007>
117. Verma, P. (Ed.). (2020). *Biorefineries: A step towards renewable and clean energy*. Springer.
118. Vinderola, G. (Ed.). (2019). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (5th ed.). Taylor and Francis.
119. Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30.
<https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

120. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
121. Wilson, D. B., Sahm, H., Stahmann, K.-P., & Koffas, M. (Eds.). (2020). *Industrial microbiology*. Wiley-VCH.
122. Wilson, P., Sharvelle, S., & De Long, S. (2016). Enhanced anaerobic digestion performance via combined solids- and leachate-based hydrolysis reactor inoculation. *Bioresource Technology*, *220*, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.024>
123. Wood, B. J. B., & Holzapfel, W. H. (Eds.). (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0>
124. Wu, S., Xu, S., Chen, X., Sun, H., Hu, M., Bai, Z., Zhuang, G., & Zhuang, X. (2018). Bacterial Communities Changes during Food Waste Spoilage. *Scientific Reports*, *8*(1), 8220. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26494-2>
125. Xue, S., Zhao, N., Song, J., & Wang, X. (2019). Interactive Effects of Chemical Composition of Food Waste during Anaerobic Co-Digestion under Thermophilic Temperature. *Sustainability*, *11*(10), 2933. <https://doi.org/10.3390/su11102933>
126. Yi, J., Dong, B., Jin, J., & Dai, X. (2014). Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis. *PLoS ONE*, *9*(7), e102548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102548>
127. Záborská, J., Štěpová, J., Wachtl, R., Jeníček, P., & Dohányos, M. (2000). The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters at different loading rates. *Water Science and Technology*, *42*(9), 49-56. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0168>
128. Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., & Cai, W.-M. (2005). The Influence of pH on Hydrolysis and Acidogenesis of Kitchen Wastes in Two-phase Anaerobic Digestion. *Environmental Technology*, *26*(3), 329-340. <https://doi.org/10.1080/09593332608618563>