

TESIS DEFENDIDA POR
Karina Contreras Gómez
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Idania Valdez Vazquez
Director del Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Miembro del Comité

Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité

Dr. José Vinicio Macias Zamora
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del Programa de Posgrado
en Ciencias*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

4 de mayo de 2010.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**PRODUCCIÓN DE H₂ Y ETANOL A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE MAÍZ
EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN DOS ETAPAS**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

KARINA CONTRERAS GÓMEZ

Ensenada, Baja California, México, mayo de 2010.

RESUMEN de la tesis de **Karina Contreras Gómez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Mayo, 2010.

PRODUCCIÓN DE H₂ Y ETANOL A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE MAÍZ EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN DOS ETAPAS

Resumen aprobado por:

Idania Valdez Vazquez

Se estudió la producción de hidrógeno y etanol a partir de la fermentación en dos etapas de un sustrato lignocelulósico. Se montaron reactores acidogénicos para estudiar el efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH, 60, 120 y 240 h) y la concentración de sustrato (25, 50 y 100 g/L) sobre la producción de hidrógeno mediante un diseño factorial completo, 3². Se encontró que estos dos factores tuvieron un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento, productividad de H₂ y productividad específica de H₂.

La concentración de sustrato tuvo un efecto positivo sobre las variables de respuesta, por lo que los mejores resultados se obtuvieron con una alimentación de 100 g/L. El TRH tuvo un efecto inverso, donde la mayor tasa de crecimiento y productividades de H₂ se lograron a un TRH de 60h. Es por ello, la mayor productividad de hidrógeno (482 mLH₂/(kg*d)) y productividad específica de hidrógeno (58 mLH₂/(μg*d)) se alcanzaron a un TRH de 60 h y 100 g/L. Bajo estas mismas condiciones, se obtuvieron las mayores velocidades de remoción de sustrato donde hubo un mayor consumo de celulosa por sobre la hemicelulosa, a pesar de que la actividad xilanolítica fue mayor a la celulolítica. En esta etapa, los reactores con mayores productividades de hidrógeno lograron una remoción de sustrato del 50% de los carbohidratos presentes.

Se demostró que fue posible continuar la biotransformación del sustrato residual a través de una segunda etapa de fermentación de tipo solventogénica, donde se logró una producción máxima de 104 mg etanol/g sustrato en reactores alimentados con 80 g/L de sustrato residual y operados a un TRH de 120h.

Con estas dos etapas de producción de biocombustibles, se logró recuperar 3.3 kJ/g_{sustrato}, correspondiente al 24.64% de la energía contenida en los residuos de maíz.

Palabras Clave: acidogénesis, solventogénesis, tiempo retención hidráulico.

ABSTRACT

HYDROGEN AND ETHANOL PRODUCTION FROM CORN BYPRODUCTS IN A TWO-STAGE FERMENTATION PROCESS

Hydrogen and ethanol production in two-stage fermentation from a lignocellulosic substrate was studied. Acidogenic reactors were operated to study the effect of the hydraulic retention time (TRH, 60, 120 y 240 h) and substrate concentration (25, 50 y 100 g/L) on hydrogen production using a complete factorial design, 3^2 . It was found that these two factors had a significant effect on the growth rate, H_2 productivity and H_2 specific productivity.

Substrate concentration had a positive effect on the response variables, where the highest results were obtained with a feeding of 100 g/L. On the other hand, the TRH had an inverse effect, where the highest growth rates and hydrogen productivities were reached at 60h TRH. The highest hydrogen productivity (482 mL H_2 /(kg*d)) and specific hydrogen productivity were reached at 60h TRH and 100 g/L. Under the same conditions, the highest substrate removal rates were obtained; where the main removed substrate was cellulose instead hemicellulose, although xylanolytic activity was higher than cellulolytic ones. At this stage, the reactors with the highest hydrogen productivities achieved a substrate removal around 50%.

It was shown that it was possible to continue the biotransformation of residual substrate through a second type-solventogenic fermentation, which the ethanol production was 104 mg/g in reactors fed with 80 g/L of residual substrate and operated at 120 h HRT.

With a two-stage fermentation for biofuel production, it was recovered 3.3 kJ/g_{substrate}, corresponding to 24.64% of the energy contained in the substrate.

Keywords: acidogenesis, hydraulic retention time, solventogénesis.

Dedicatorias

A la persona que más quiero, esta tesis es para ti mamá. Porque has vivido junto conmigo desde el teléfono todos mis altibajos académicos y personales. Gracias por creer en mí.

Agradecimientos

Al CONACYT por haberme proporcionado el medio para realizar un posgrado.

A todos los amigos y personas cercanas que vivieron junto conmigo el reto de realizar y culminar esta maestría.

A macakui porque no tengo palabras para agradecer todo lo que tan dulcemente siempre hiciste por mí, para agradecer tu apoyo incondicional.

A Salomone que de igual forma apoyó siempre mi trabajo, por pasar noches en el laboratorio desvelándose junto conmigo sin dudarlo.

Y sobre todo a mi directora de tesis por todo su apoyo que tan amablemente siempre me brindó y por ser un ejemplo para mí.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
I. Introducción.....	1
I.I Biomasa.....	1
I.I.I. Clasificación de la biomasa y potencial.....	2
I.I.II. Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	3
I.II Etanol.....	4
I.II.I Producción de etanol vía fermentación.....	4
I.III Hidrógeno.....	8
I.III.I Producción de H ₂ vía fermentación.....	9
II. Antecedentes.....	13
III. Justificación.....	17
IV. Hipótesis.....	19
V. Objetivos.....	19
VI. Metodología.....	20
FASE I.....	21
VI.I Preparación y caracterización del sustrato.....	21

CONTENIDO (continuación)

	Pág.
VI.I.I Determinación de sólidos totales (ST)	22
VI.I.II Determinación de sólidos volátiles totales (SVT) y cenizas	22
VI.I.III Determinación de fibra detergente neutro (FDN)	23
VI.I.IV Determinación de fibra detergente ácido (FDA)	24
VI.II Reactor semilla.	24
VI.III Ensayo Presuntivo	25
FASE II	27
VI.IV Estudio del TRH y concentración de sustrato en reactores acidogénicos.	27
VI.IV.I Reactores e inóculo.....	27
VI.IV.II Diseño experimental.....	27
VI.IV.III Parámetros de seguimiento y métodos analíticos.	28
Notas: ^a cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica; ^b fibra detergente neutro; ^c fibra detergente ácida. VI.IV.IV Volumen y composición de biogás.	28
VI.IV.IV Volumen y composición de biogás.....	29
VI.IV.V pH y metabolitos solubles	29
VI.IV.VI Consumo de sustrato y crecimiento celular	29
VI.IV.VII Análisis estadístico	30
VI.V Estudio del TRH y concentración de sustrato en reactores solventogénicos.....	30
VI.V.I Reactores, inóculo y sustrato	30
VI.V.II Parámetros de seguimiento y métodos analíticos.	31
VI.V.III Volumen de biogás.....	31
VI.V.IV pH	31

CONTENIDO (continuación)

	Pág.
VI.V.V Determinación de la presencia de alcoholes.....	32
VI.V.VI Sustrato Residual.....	32
VI.V.VII Crecimiento celular	32
VI.V.VIII Análisis estadístico	32
FASE III.....	33
VI.VI Actividades enzimáticas	33
VI.VI.I Precipitación de proteínas totales	33
VI.VI.II Actividad xilanolítica.....	34
VI.VI.III Actividad celulolítica	34
VII. Resultados y Discusión	35
FASE I.....	35
VII.I Caracterización del sustrato.....	35
VII.II Reactor Semilla.....	37
VII.III Ensayo Presuntivo	39
FASE II.....	42
VII.IV Operación de reactores acidogénicos	42
VII.IV.I Desempeño de los reactores.....	42
VII.IV.II Efecto del TRH y concentración de sustrato sobre la producción de H ₂	46
VII.IV.III Consumo de sustrato	52
VII.IV.IV Acumulación de ácidos orgánicos.....	53
VII.V Reactores solventogénicos para la producción de etanol.....	55
VII.V.I Desempeño de los reactores.....	55

CONTENIDO (continuación)

	Pág.
VII.VI Proceso de fermentación en dos etapas	56
FASE III	60
VII.VII Actividades enzimáticas	60
VIII. Conclusiones	62
IX. Referencias	63

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 TIPOS DE FERMENTACIÓN PRESENTES EN CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM.....	12
FIGURA 2. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	20
FIGURA 3. EVOLUCIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE BIOGÁS EN LOS REACTORES SEMILLA.....	39
FIGURA 4. DINÁMICAS DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA Y PRODUCTIVIDAD DE BIOGÁS EN LOS REACTORES ACIDOGÉNICOS.	43
FIGURA 5. GRÁFICAS DE EFECTOS PRINCIPALES DEL TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO Y CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO SOBRE A) TASA DE CRECIMIENTO, B) PRODUCTIVIDAD DE H ₂ Y C) PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA DE HIDRÓGENO.	48
FIGURA 6. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO (CARGA ORGÁNICA INICIAL, CO ₀) Y EL TRH SOBRE LA REMOCIÓN DE SUSTRATO (VELOCIDAD DE CARGA ORGÁNICA CONSUMIDA, VCO _c).....	52
FIGURA 7. ACUMULACIÓN PROMEDIO DE A) ÁCIDO ACÉTICO Y B) ÁCIDO BUTÍRICO EN LOS REACTORES ACIDOGÉNICOS.....	54
FIGURA 8. GRÁFICAS DE EFECTOS PRINCIPALES DEL TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO Y CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA Y CELULOLÍTICA.....	60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA I. MÉTODOS PROPUESTOS PARA EL PRE-TRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	5
TABLA II. MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL VÍA FERMENTACIÓN.....	7
TABLA III. CONTENIDO ENERGÉTICO DE DIFERENTES TIPOS DE COMBUSTIBLES.....	8
TABLA IV. PRODUCCIÓN DE H ₂ MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS COMPLEJOS.	10
TABLA V. GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES EN CONSORCIOS PRODUCTORES DE H ₂	11
TABLA VI. CO-PRODUCCIÓN INDIRECTA DE HIDRÓGENO Y ETANOL EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	14
TABLA VII. DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 3 ² PARA ESTUDIAR EL EFECTO DEL TRH Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.....	28
TABLA VIII. PARÁMETROS DE SEGUIMIENTO DE LOS REACTORES ACIDOGÉNICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.....	28
TABLA IX. PARÁMETROS DE SEGUIMIENTO DE LOS REACTORES SOLVENTOGÉNICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.	31
TABLA X. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE FIBRA DETERGENTE EN EL SUSTRATO MODELO Y COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS....	37
TABLA XI. PARÁMETROS DE SEGUIMIENTO PROMEDIO PARA LOS REACTORES ACIDOGÉNICOS.....	44
TABLA XII. RESULTADOS EXPERIMENTALES PROMEDIO PARA LOS REACTORES SOLVENTOGÉNICOS.	56
TABLA XIII. ESTUDIOS DE FERMENTACIÓN EN DOS ETAPAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	57
TABLA XIV. RENDIMIENTOS DE H ₂ Y ETANOL EN REACTORES ACIDOGÉNICOS Y SOLVENTOGÉNICOS, RESPECTIVAMENTE.....	58

I. Introducción

A través de las investigaciones realizadas por el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC), se reconoce que la composición natural de la atmósfera terrestre se ha alterado debido a la emisión de gases de efecto invernadero a consecuencia de las actividades antropogénicas (Bogner, et al., 2008; Keller, 2007). Los seres humanos estamos expuestos al cambio climático de manera directa por cambios en la frecuencia e intensidad de fenómenos meteorológicos, e indirectamente por cambios en la disponibilidad de agua, calidad del aire, alteración de los ecosistemas, la cantidad y calidad de alimentos lo que finalmente influye en la agricultura y economía (IPCC, 2007). En esta fase inicial, los efectos parecen ser imperceptibles, sin embargo, de seguir el mismo patrón, las consecuencias del calentamiento global podrían ser catastróficas, cambiando el clima regional y global junto con los parámetros relacionados con el clima, tales como la temperatura, precipitación, humedad de suelos y el nivel del mar; algunas comunidades humanas se volverán más vulnerables a riesgos como tormentas, inundaciones y sequías por mencionar algunas (BBC, 2007). Este escenario está aunado a la problemática de la reducción de los recursos energéticos petroleros debido su sobreexplotación, que ha llevado al incremento de precio de los combustibles fósiles hasta niveles nunca antes vistos. Estos dos hechos, han estimulado el desarrollo de nuevas alternativas energéticas que sirvan como sustituto parcial o total a los combustibles fósiles, con el fin de detener el calentamiento global y asegurar el suministro energético. Según Hill y colaboradores (2006), estas nuevas tecnologías deben cumplir los siguientes requisitos para ser viables: ser renovables, proporcionar una ganancia neta de energía, tener beneficios para el medio ambiente, y ser económicamente competitivas, además de ser generadas en grandes cantidades sin reducir el suministro de alimentos. Entre las diversas opciones disponibles, la biomasa es una fuente que cumple con las requisiciones anteriores.

I.1 Biomasa

La biomasa desde un sentido amplio se define como toda la materia viva o recién muerta que tiene su origen de un proceso biológico (Ramos, 2008), no incluye petróleo. En los últimos años, ha cobrado importancia debido a su potencial como fuente de energía alternativa. Este potencial radica en su capacidad de almacenar energía solar capturada a través de las plantas durante la

fotosíntesis, de esta forma la energía solar se convierte en moléculas orgánicas portadoras de electrones y energía. Las moléculas orgánicas pueden ser homogéneas en forma de carbohidratos simples como los presentes en el maíz y la caña de azúcar y en otros casos estas moléculas orgánicas pueden formar matrices complejas heterogéneas formadas por celulosa, hemicelulosa y lignina (Rittman, 2008). Debido a que la biomasa se produce a través de una influencia directa de la energía solar, es renovable y rica en carbohidratos lo cual le brinda la posibilidad de ser convertida de manera eficiente en biocombustibles a través de una gran variedad de microorganismos. Se ha manifestado que el uso de biomasa como fuente de energía contribuye a la reducción de gases de efecto invernadero y la energía recuperada contribuye al desarrollo sustentable (Lin y Tanaka, 2006).

I.I.I. Clasificación de la biomasa y potencial

Según Castells (2005), la biomasa puede ser clasificada por su origen como sigue:

- Biomasa natural: es aquella producida en los ecosistemas naturales, como bosques.
- Biomasa residual: son aquellos subproductos derivados de las actividades agrícolas, ganaderas y forestales. También se incluyen en este grupo los materiales biodegradables de origen doméstico como residuos sólidos, aguas residuales y lodos generados de las plantas de tratamiento.
- Cultivos energéticos: aquellos constituidos por cultivos vegetales que están destinados exclusivamente a su aprovechamiento energético.

En México se estima que se generan alrededor de 150 millones de toneladas de biomasa, de las cuales el 71% corresponde a residuos agrícolas e industriales de cultivos de maíz, cebada, trigo, caña de azúcar, frijol, sorgo y girasol (Maser, et al., 2005); con un contenido fibroso de material lignocelulósico que va del 60-90% aproximadamente (González-Muñoz, s/a). Este trabajo se ha centrado en el uso de biomasa residual, específicamente en los subproductos agrícolas para la generación de biocombustibles.

La utilización de este tipo de biomasa tiene un doble beneficio, ya que el producto de la cosecha puede ser destinado para alimentación humana mientras que los subproductos son destinados a la producción de energéticos. Actualmente, la biomasa residual tiene como principales usos la alimentación de ganado, combustión directa, gasificación y pirólisis. Sin embargo, no toda la

biomasa residual es aprovechada y en algunos casos ésta es abandonada en campo (Maki, et al., 2009) y en muchas ocasiones son quemados para evitar incrementar los costos procedentes de su disposición (Quintero-Montero y Moncada-Aguilar, 2008; Cortez, 2009).

I.I.II. Estructura de la biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa es el componente estructural de todas las plantas, tiene 3 componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. En menor proporción, también contiene cenizas, proteínas, pectinas, almidón y lípidos.

La celulosa o β -1-4-glucano es un homopolímero lineal de glucosa compuesto de unidades de celobiosa. Las cadenas de celulosa están unidas por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y por puentes de van der Waals, el alineamiento paralelo de estas cadenas lleva a una estructura cristalina conocida como microfibrillas (Dashtban, et al., 2009). Estas microfibrillas están entrelazadas con cadenas de hemicelulosa, pectinas y están cubiertas por lignina. La hemicelulosa, el segundo polímero importante en la lignocelulosa, es un heteropolímero de pentosas que contiene como azúcar predominante manosa en maderas blandas y xilosa en maderas duras y residuos agrícolas. Otros azúcares presentes en la hemicelulosa son arabinosa, galactosa, glucosa y ramnosa, además de pequeñas cantidades de ácido glucurónico, ácido metil glucurónico y ácido galacturónico. En contraste a la celulosa, la cual es cristalina y fuerte, la hemicelulosa tiene una estructura mixta, amorfa y ramificada (Tahezadeh y Karimi, 2008; Dashtban, et al., 2009). Finalmente, la lignina es un heteropolímero amorfo formado de unidades de fenilpropano con grupos aromáticos como guaiacil, siringil y fenilpropano (Morán, et al., 2008) y está unida a los polisacáridos de la planta a través de enlaces covalentes (Puri, 1983). La estructura tridimensional de la lignocelulosa le confiere una alta resistencia a la biodegradación, donde la lignina es el componente más recalcitrante de la pared celular (Tahezadeh y Karimi, 2008).

La composición predominante de carbohidratos en la biomasa lignocelulósica le confiere un gran potencial para la producción de biocombustibles líquidos como el bioetanol y gaseosos como el biohidrógeno, ambos obtenidos mediante su fermentación anaerobia. Por su origen biológico, ambos biocombustibles ofrecen una diversidad de ventajas sobre los combustibles fósiles: provienen de una fuente renovable que no compite con la alimentación humana ni bovina y ofrece una alternativa para reducir las emisiones de CO₂.

I.II Etanol

El etanol o alcohol etílico (C_2H_5OH), es un líquido incoloro, biodegradable, y de baja toxicidad. En la actualidad es el combustible más importante en términos de valor en el mercado (Taherzadeh y Karimi, 2008). Al quemarse produce dióxido de carbono y agua siendo un combustible de alto octanaje. Cuando se combina con gasolina tiene la capacidad de incrementar el octanaje de la mezcla, haciendo más eficiente la combustión debido a una mejor oxigenación, lo que resulta en una reducción de las emisiones contaminantes. Otras ventajas que presenta el uso del etanol como biocombustible es que en caso de derrame, su característica biodegradable reduce el impacto al ambiente en comparación con el petróleo. También al ser un aditivo oxigenante que sustituye a otros aditivos nocivos para la salud como el plomo y el etil-terbutil-éter, se disminuyen los riesgos de cáncer y los efectos nocivos a las capacidades mentales en niños (BBC, 2007; IICA, 2007).

I.II.I Producción de etanol vía fermentación

La generación, comercialización y aprovechamiento de etanol a partir de biomasa o bioetanol ha cobrado auge en años recientes en países como Brasil y Estados Unidos, principales productores a nivel mundial. El bioetanol es generado vía fermentación de glucosa proveniente de la caña de azúcar en el caso de Brasil, y almidón de maíz en Estados Unidos (Lin y Tanaka, 2006). El bioetanol es utilizado en mezclas con gasolina que van del 5% hasta el 15%. Estas mezclas son utilizadas en vehículos automotores sin requerir de grandes modificaciones en el tren motriz, lo cual ha sido la razón por la cual el bioetanol es el principal biocombustible utilizado en nuestros días.

El empleo de celulosa como sustrato para la producción de bioetanol ha cobrado importancia debido a que este tipo de biomasa es la más abundante y menos utilizada en el mundo. Anualmente, se generan alrededor de 200 billones de toneladas de biomasa lignocelulósica, de las cuales entre 8 y 20 billones de toneladas son accesibles para su conversión en biocombustibles (Lin y Tanaka, 2006). Como se mencionó anteriormente, la lignocelulosa es un sustrato muy complejo de estructura cristalina y altamente compacta, por lo que es resistente al ataque biológico. Por otra parte, las uniones fuertes de tipo covalente de la lignina con la hemicelulosa favorecen la compactación de la molécula (Gray, et al., 2006) e impide su degradación por parte de microorganismos. Es por ello que una gran variedad de estudios realizados en todo el mundo se han

centrado en superar la limitante más importante en el uso de este sustrato, su alto grado de complejidad. El proceso propuesto para la conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol comúnmente incluye las siguientes etapas: i) pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica, ii) hidrólisis o sacarificación de la celulosa recuperada a monómeros de glucosa y por último, iii) la fermentación de la glucosa mediante cultivos axénicos (Sánchez y Cardona, 2008).

1.1.1.1 Pre-tratamiento de la biomasa

Durante el pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica, la hemicelulosa es hidrolizada y la lignina es liberada o degradada logrando disminuir el grado de cristalinidad, de forma que se hace más accesible al ataque enzimático (Olofsson, et al., 2008). En la Tabla I se resumen las propuestas para el pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos lo cuales abarcan métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos (Olofsson, et al., 2008; Sánchez y Cardona, 2008; Taherzadeh y Karimi, 2008).

Tabla I. Métodos propuestos para el pre-tratamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol.

Pre-tratamiento	Descripción
Físico	Consiste en moler la biomasa para reducir la cristalinidad de la celulosa, facilitando su acceso. Es un método caro.
Químico	Emplea químicos como ozono, ácidos, bases, peróxido y solventes orgánicos. En el caso del pre-tratamiento con ácido sulfúrico, hidrolizan una fracción de hemicelulosa mientras que dejan intacta a la celulosa y a la lignina. Los tratamientos alcalinos tienen un efecto sobre la lignina pero dejan intacta a la hemicelulosa y celulosa. El uso de estos tratamientos puede formar productos con posibles efectos inhibitorios sobre los microorganismos fermentativos.
Fisicoquímico	El método más usado es la explosión a vapor. El vapor saturado a altas presiones causa una reacción de autohidrólisis, en la cual parte de la hemicelulosa y lignina se convierten en oligosacáridos solubles. Los factores como el tiempo de residencia, temperatura, tamaño del sustrato y humedad tienen un efecto sobre los resultados.
Biológico	Se utilizan microorganismos para degradar a la lignina como <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Sin embargo, el proceso es lento, y depende del contenido de lignina y hemicelulosa los cuales están asociados al tipo de planta, edad, método de cosecha, etc.

Gray, et al., 2006; Olofsson, et al., 2008; Sánchez y Cardona, 2008; Taherzadeh y Karimi, 2008.

1.11.1.11 Hidrólisis o sacarificación de celulosa

Una vez aplicado el pre-tratamiento a la biomasa lignocelulósica, se recupera la fracción sólida que corresponde a la celulosa que posteriormente debe hidrolizarse para romper su estructura compleja y producir monómeros de glucosa que finalmente serán metabolizados por los microorganismos. Los métodos comúnmente utilizados son la hidrólisis ácida y biológica (Guarnizo, et al. 2009), donde ésta última puede realizarse con enzimas provenientes de microorganismos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Clostridium botyricum*. Estas enzimas llamadas celulasas comprenden 3 tipos: *i*) endoglucanasas quienes rompen enlaces internos β -1,4 glucosídicos, *ii*) exoglucanasas que actúan en los extremos de las cadenas de celulosa para liberar cadenas cortas de oligosacáridos, y *iii*) β -glucosidasas que hidrolizan celooligosacáridos solubles a glucosa (Gray, et al., 2006).

1.11.1.12 Fermentación del hidrolizado

Los principales carbohidratos fermentables a etanol son glucosa y xilosa, obtenidos de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente (Lin y Tanaka, 2006; Olofsson, et al., 2008). La fermentación de glucosa se realiza eficientemente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada en forma casi generalizada (ver Tabla II). En contraste, el aprovechamiento de la xilosa resulta un reto, ya que a pesar de que muchos microorganismos la pueden utilizar como fuente de carbono, pocos pueden fermentarla a etanol. Se han probado una gran variedad de microorganismos y se ha comenzado a utilizar nuevos géneros en la producción de bioetanol a partir de xilosa como los son: *Zymomonas*, *Spirochaeta*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Clostridium*, éste último cuenta con especies capaces de hidrolizar la celulosa para después fermentarla a etanol (Lin y Tanaka, 2006).

Tabla II. Microorganismos utilizados para la producción de etanol vía fermentación.

Especie/cepa	Temperatura (°C)	pH	Fuente de carbono	Etanol (g/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 27817	30	5.5	Glucosa	5.1-91.8
<i>S. cerevisiae</i> L-041	30-35	-	Sacarosa	25-50
<i>S. cerevisiae</i> 181	27	6.0	Glucosa	-

<i>S. cerevisiae</i> UO-I (aerobia)	30	5.0	Sacarosa	-
<i>S. cerevisiae</i> V5	24	-	Glucosa	-
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24860	30	4.5	Melaza	5-18.4

<i>S. cerevisiae</i> Baker	30	4.5	Azúcar	53
<i>S. cerevisiae</i> Baker	28	5.0	Sacarosa	96.71
<i>S. cerevisiae</i> Fiso	30	5.0	Galactosa	4.8-36.8

<i>S. cerevisiae</i> L52	30	5.0	Galactosa	2.4-32.0
<i>S. cerevisiae</i> A3	30	5.0	Galactosa	27
<i>S. cerevisiae</i> KR ₁₈	30	6.0	Sacarosa	42

<i>S. cerevisiae</i> GCA-II	30	6.0	Sacarosa	22.5
<i>S. cerevisiae</i> GCB-K5	30	6.0	Sacarosa	70
<i>S. cerevisiae</i> CM1237	30	6.0	Sacarosa	13.7

<i>S. cerevisiae</i> 2.399	30	5.5	Glucosa	48
<i>Kluyveromyces fragilis</i> 27774	30	5.5	Glucosa	48.96
<i>K. fragilis</i> 30017	30	5.5	Glucosa	48.96

<i>K. marxianus</i> 30016	30	5.5	Sacarosa	44.4
<i>Candida utilis</i> 30091	30	5.5	Glucosa	44.4
<i>Pachysolen tannophilus</i> ATCC-32691	30	4.5	Glucosa/xilosa	7.8

Adaptado de Lin y Tanaka, 2006

Como se ha aludido, en la producción de bioetanol a partir de la fermentación de biomasa lignocelulósica, son requeridos una serie de pasos; primero, se separan los carbohidratos de la lignina mediante una hidrólisis, y dentro de este mismo paso o por separado, se realiza la sacarificación que permite hidrolizar los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) hasta sus unidades monoméricas, segundo, continúa la fermentación (unidades separadas de hidrólisis/sacarificación y fermentación). Alternativo a este proceso, se han desarrollado otros trabajos en los cuales la

hidrólisis/sacarificación y fermentación se llevan a cabo de forma simultánea (Hahn, et al., 2006), lo que permite optimizar el proceso a través de beneficios en tiempo y costo.

I.III Hidrógeno

El hidrógeno es un gas diatómico que bajo condiciones normales es incoloro, inodoro e insípido. Es uno de los constituyentes principales del agua y de toda la materia orgánica, y está distribuido ampliamente en la Tierra y en el universo (BBC 2007; IICA, 2007). Tiene el contenido energético más alto que cualquier otro combustible, siendo casi tres veces mayor en comparación con la gasolina (Turner, et al. 2008, ver Tabla III). Como combustible, tiene ventajas ambientales notables ya que su único producto teórico de combustión es el agua y bajo ciertas condiciones, óxidos de nitrógeno que pueden ser fácilmente controlables (Saratale, et al., 2008). Se considera que el hidrógeno jugará un papel importante en el abastecimiento energético en las décadas venideras. Su explotación comercial se mantiene a la expectativa del desarrollo e implementación de nuevas tecnologías de uso, almacenamiento y transporte (Antoni, et al., 2007).

Tabla III. Contenido energético de diferentes tipos de combustibles.

Combustible	Contenido energético (MJ/Kg)
Hidrógeno gaseoso	120
Hidrógeno líquido	120
Carbón (antracita)	15-19
Gas Natural	33-55
Gasolina	42-45
Diesel	42.8
Petróleo (Nafta)	40-43
Bio-diesel	37
Etanol	21

Saratale, et al., 2008

I.III.I Producción de H₂ vía fermentación.

El hidrógeno puede producirse a través de una gran variedad de procesos: de tipo físico, químico y biológico. El proceso biológico ha llamado la atención puesto que ofrece la posibilidad de obtenerse a través de biomasa, tanto de carbohidratos simples como complejos. Estos últimos son una fuente potencial de producción de hidrógeno por su elevada disponibilidad y bajo costo, sin embargo, el contenido principal de lignocelulosa retarda el proceso de producción. Es por ello que es necesario realizar una serie de pasos como los descritos en la producción de etanol, donde se inicia con el pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica, seguido de la hidrólisis o sacarificación de carbohidratos para su posterior fermentación. Algunos microorganismos reportados para la producción de hidrógeno vía fermentación pertenecen a los géneros de: *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Thermoanaerobacterium*, *Staphylococcus*, y *Megasphaera* (Xing, et al., 2008). A diferencia de los estudios de producción de etanol, en el caso de hidrógeno se ha propuesto la utilización de cultivos mixtos y/o consorcios anaerobios capaces de degradar sustratos complejos como hemicelulosa y celulosa a través de diversas rutas metabólicas y complejos enzimáticos, teniendo como producto final una corriente gaseosa rica en hidrógeno (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Con la utilización de estos cultivos microbianos no definidos ha sido posible utilizar una gran variedad de sustratos residuales para la generación de H₂ (Tabla IV).

Tabla IV. Producción de H₂ mediante la fermentación de sustratos orgánicos complejos.

Inóculo	Fuente de carbono	Higrógeno (mL/g SV _{adicionado})
Fluido ruminal vacuno	cascarilla de chícharo	45
Bacterias productoras de H ₂	residuos orgánicos municipales	180
Lodos anaerobios tratados con choque térmico	arroz	96
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	caparazón de langosta	190
Escreta porcina tratada con choque térmico	arroz y papa	53
Lodos anaerobios tratados con choque térmico	residuos de alimento y lodos residuales	69
Composta de hierba tratada con choque térmico	residuos deshidratados de cervecería	30
Composta de hierba tratada con choque térmicos	residuos de alimento	107
Microflora inhibida con acetileno	residuos de industria papelera	40
Lodos residuales municipales	Residuos de piña	85
Composta de escreta vacuna	Residuos de trigo tratados con HCl	68
Lodos anaerobios tratados con choque térmico	Residuos orgánicos municipales	23

Adaptado de Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009.

La degradación de sustratos complejos mediante el uso de cultivos no definidos, se da gracias a que éstos están conformados por diversas poblaciones que interactúan entre sí de manera interdependiente, logrando incrementar las capacidades metabólicas del cultivo en conjunto logrando en un solo paso, hidrolizar, sacarificar y fermentar el sustrato complejo, como biomasa lignocelulósica. Los microorganismos involucrados en la degradación de sustratos complejos para la producción de H₂ se describen en la Tabla V.

Tabla V. Grupos microbianos presentes en consorcios productores de H₂.

<i>Tipo de población</i>	<i>Descripción</i>
Microorganismos hidrolíticos	Producen monómeros a partir de moléculas complejas como celulosa, hemicelulosa y almidón.
Microorganismos fermentativos/acidogénicos	Generan hidrógeno y ácidos orgánicos a partir de compuestos orgánicos producidos previamente

Adaptado de Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2007.

Estos microorganismos utilizan diversas vías para la producción de hidrógeno, el proceso ocurre en la acidogénesis, con la acumulación de ácidos orgánicos como acetato y butirato. Se ha visto que los factores que limitan la producción de hidrógeno son las altas concentraciones de ácidos orgánicos, ya que pueden resultar tóxicas para la célula. Los ácidos no disociados actúan como desacopladores y permiten la entrada de protones a la célula cuando están presentes en altas concentraciones y en consecuencia se genera un colapso en el gradiente de pH a través de la membrana celular. Como mecanismo de destoxificación para evitar este efecto inhibitorio por la acumulación de ácidos orgánicos, la célula cambia de una fermentación acidogénica caracterizada por la acumulación de H₂, a una fermentación solventogénica caracterizada por la acumulación predominante de alcoholes con una consecuente disminución de hidrógeno (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

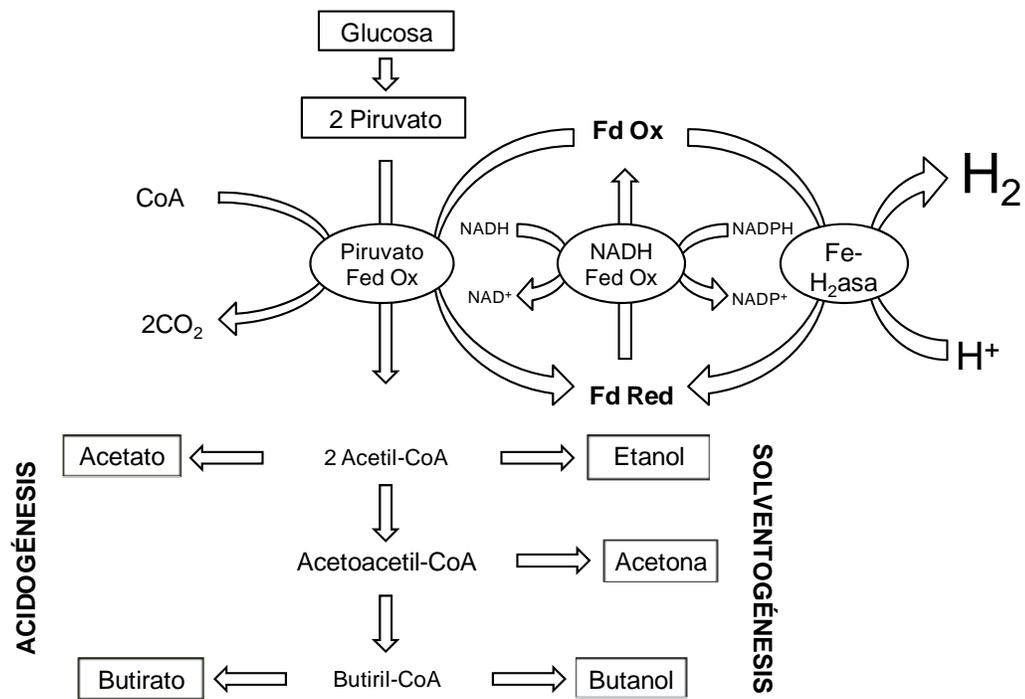


Figura 1 Tipos de fermentación presentes en *Clostridium acetobutylicum*.

II. Antecedentes

Mediante una gran variedad de investigaciones desarrolladas con la finalidad de obtener H₂ o etanol a través de procesos biológicos, se encontró que es posible obtener más de un combustible (como hidrógeno, metano y etanol) dentro de la fermentación del sustrato, además de otros productos de interés como ácidos orgánicos volátiles (ácido acético, butírico). Este proceso simultáneo es posible debido a la naturaleza de la biomasa lignocelulósica y a sus limitaciones termodinámicas y biológicas (Ahring y Westermann, et al., 2007). Por ejemplo, durante el proceso de producción de hidrógeno, factores como la inhibición por producto (H₂ y ácidos) provocan que las rutas metabólicas se desvíen hacia la generación de alcoholes (solventogénesis), disminuyendo el rendimiento de hidrógeno y ocasionando que el sustrato no se aproveche totalmente. Por lo tanto, se genera tanto hidrógeno en la fase gaseosa, como una pequeña proporción de alcoholes como etanol en el medio de cultivo.

Tras la búsqueda de un proceso económico, eficiente y sustentable para la producción de biocombustibles por métodos biológicos, han surgido perspectivas para el máximo aprovechamiento del sustrato en las que se busca generar diversos productos durante la fermentación. Se ha visto que una gran variedad de microorganismos tienen la capacidad de producir más de un producto de interés energético durante el metabolismo de carbohidratos. En la Tabla VI se muestran los microorganismos utilizados en estudios independientes para la generación de hidrógeno o etanol. Comúnmente, durante el proceso de producción de hidrógeno se co-produce de manera indirecta etanol en cantidades reducidas, y viceversa.

Tabla VI. Co-producción indirecta de hidrógeno y etanol en procesos de fermentación.

Microorganismo	Producción de hidrógeno				Producción de etanol			
	Sustrato	Rendimiento de H ₂ ^a (mol/mol)	Rendimiento de co-productos ^b (mol/mol)		Referencia	Sustrato	Rendimiento de etanol ^a (mol/mol)	Referencia
<i>Citrobacter malonaticus</i> Y19	Glucosa	0.52	Etanol: 1.3 Succinato: 0.1 Lactato: 0.2 Acetato: 0.6	You, et al., 2008		Aspartato Arginina	1.2 mmol/L	Obst, et al., 2005
<i>Candida utilis</i>	Sacarosa	1.34	--	Woodward, et al., 1998		Glucosa (100g/L)	18-94 (g/L)	Vallet, et al., 1996
<i>Escherichia coli</i> K12	Glicerol	0.94	*Etanol: 0.923 Succinato: 0.015 Acetato: 0.012	Murarka, et al., 2008		Arabinosa y xilosa	49.8	Dien, et al., 2003
consorcio microbiano	Desechos sólidos orgánicos	20 mmol	Etanol: 350 mmol/Kg mh ^c Acetato: 45 mmol/Kg mh ^c Butirato: 30 mmol/Kg mh ^c	Valdez-Vazquez, et al., 2006a		Bagazo de caña	En proceso	Chaudhry, 2008
<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>	Glucosa Xilosa	1.2 1.0	*Etanol: 1.6 *Etanol: 1.1	Perttu, et al., 2008		Variedad de carbohidratos	Presencia de etanol	Kublanov, et al., 2007

Notas: ^a producto principal; ^b co-productos acumulados de forma indirecta en el cultivo líquido; ^c mh, materia húmeda

Los siguientes trabajos de procesos de producción de un tipo de biocombustible (hidrógeno o etanol), reportan la co-producción indirecta de un segundo biocombustible a rendimientos claramente inferiores. A continuación se mencionan algunos de ellos:

- Kyazze y colaboradores (2008), estudiaron la producción de hidrógeno por fermentación directa de forraje de maíz, de fructooligosacáridos y de *Lolium perenne* en cultivos en lote (pH 5.2 - 5.3, 35°C, inóculo de lodos anaerobios tratados con calor). A través de este proceso se obtuvo hidrógeno, al igual que otros productos como butirato, acetato y etanol.
- En trabajos realizados por Perttu y colaboradores (2008) se aislaron dos microorganismos, *Clostridium uzonii* AK15 y *Thermoanaerobacterium aciditolerans* AK17 para estudiar la producción de H₂ y etanol. Durante cultivos en lote se encontró que *T. aciditolerans* AK17 produjo principalmente etanol con rendimientos cercanos al 80% del máximo, mientras que la producción de hidrógeno sólo fue del 30% respecto al máximo. La cepa *C. uzonii* AK15 produjo principalmente hidrógeno. Ambas cepas fueron utilizadas en un co-cultivo para la producción simultánea de hidrógeno y etanol.
- En trabajos realizados por Jianlong y Wei (2008), se estudió la influencia de la concentración de Ni²⁺ en la producción de hidrógeno, el cual se varió de 0 a 50 mg/L en cultivos en lote. Se encontró que a 35°C, un pH inicial de 7.0 y el aumento de Ni²⁺ favoreció producción de hidrógeno. En este trabajo se reporta la generación de etanol, dentro de los productos finales de la fermentación.
- En el trabajo desarrollado por Valdez-Vazquez y colaboradores (2006a,b), se observó que durante las primeras etapas de la fermentación acidogénica la producción de hidrógeno fue máxima. Sin embargo, conforme aumentó la acumulación de ácidos orgánicos como butirato, propionato y acetato en el reactor, la producción de H₂ disminuyó y la producción de etanol comenzó a incrementarse.

Trabajos especialmente dirigidos a la co-producción de biocombustibles son recientes y escasos. Un antecedente es el estudio realizado por Pan et al., (2009), quien produjo dos biocombustibles a partir de la fermentación de un sustrato complejo (paja de maíz) pretratado químicamente. En aquel trabajo se desarrolló una fermentación en dos etapas: en la primera, se obtuvo etanol mediante la levadura *Pachysolen tannophilus*, y en la segunda etapa; el sustrato

gastado proveniente de la corriente de salida se continuo fermentando para obtener H_2 mediante un cultivo mixto. El principal objetivo de llevar a cabo una fermentación en dos etapas con biomasa lignocelulósica fue incrementar la producción de biocombustibles por unidad de sustrato, es decir mejorar el rendimiento total. Sin embargo en el trabajo de Pan y colaboradores, el pretratamiento químico utilizado podría incrementar los costos de producción.

Por lo anterior, en este trabajo se propuso la co-generación de H_2 y etanol a partir de subproductos de maíz mediante un proceso de fermentación en dos etapas. En la primera etapa, el sustrato sin pretratamiento se usó en un fermentador en fase acidogénica para que ocurriera la hidrólisis, sacarificación y fermentación a hidrógeno. La corriente de salida, que llevó el sustrato parcialmente hidrolizado se alimentó a un segundo fermentador en fase solventogénica para la generación de etanol consumiendo al máximo el sustrato. La finalidad fue mejorar el rendimiento total de biocombustible por unidad de sustrato (MJ/kg sustrato) al operar dos fermentadores en serie. Como parte integral del estudio de estos sistemas, se planeó el seguimiento de las actividades enzimáticas clave dentro de la degradación del sustrato lignocelulósico: celulasas y xilanasas.

III. Justificación

- El uso de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles hace que el proceso sea sustentable y no reduce el suministro de alimento de humanos ni de ganado. En este trabajo se utilizó subproductos de maíz (hojas y tallos) como sustrato lignocelulósico modelo. El uso de residuos agrícolas y agroindustriales podría tener un beneficio medioambiental y económico, al aprovechar los subproductos de difícil disposición para los productores y destinados en algunos casos a su quema incontrolada (Quintero-Montero y Moncada-Aguilar, 2008; Cortez, 2009). El costo de estos residuos por tanto, es más económico que la biomasa rica en carbohidratos simples. Por otra parte, la producción de biocombustibles a partir de subproductos permite la consecuente reducción de tierras aradas, al evitar los cultivos energéticos, así se mantendrían las tierras destinadas para la producción de alimento. De igual modo, se reduce la cantidad de agua usada, fertilizantes, pesticidas, maquinaria (Hankamer, et al., 2007).
- La producción de H₂ y etanol a partir de biomasa lignocelulósica como fuente renovable, permitirá minimizar y/o eliminar la emisión de gases de efecto invernadero y así reducir el calentamiento global al conservar las reservas energéticas fósiles (Lin y Tanaka, 2006).
- El uso de consorcios microbianos especializados como inóculo, permite reducir el número de pasos en la producción de biocombustibles. El inóculo posee un amplio conjunto de rutas metabólicas, lo que hace posible realizar la hidrólisis, sacarificación y fermentación de un sustrato complejo en un solo paso para la generación de hidrógeno y/o etanol.
- De todos los combustibles, el hidrógeno posee el contenido energético más alto (120 MJ/Kg), superando al contenido energético de la gasolina (42-45 MJ/Kg) y del gas natural (33-55 MJ/Kg). El hidrógeno es 100% limpio, versátil, se puede quemar sin generar gases contaminantes, pero sobre todo, su uso está dirigido en las celdas de combustible donde la energía química se convierte en energía eléctrica con altas eficiencias y sin emisiones contaminantes (Saratele, et al., 2008)
- El etanol produce 25% más energía que la invertida en su producción. En relación con los combustibles fósiles que desplaza, las emisiones de gases de efecto invernadero se reducen un 12% considerando la producción y la combustión de etanol (Hill, et al., 2006).

- El CO_2 generado durante el proceso de fermentación tanto de H_2 como de etanol puede ser controlado e inclusive aprovechado para recuperar eficientemente combustibles fósiles al inyectarse en pozos petroleros.
- La co-producción de biocombustibles posibilita que el proceso fermentativo sea más eficiente al incrementar la ganancia neta de energía por unidad de sustrato. Los estudios en este sentido aún son limitados por lo que es necesario enfocar las investigaciones hacia la obtención información que permitan dilucidar los parámetros óptimos para este proceso, de tal forma que se beneficie la viabilidad económica de esta tecnología energética para colaborar con la sustitución de combustibles fósiles y con la independencia energética de nuestro país.

IV. Hipótesis

GENERAL

Un proceso de fermentación en dos etapas para la producción de hidrógeno y etanol, incrementará la energía total recuperada por unidad de sustrato.

PARTICULAR

Se tendrá una mayor producción de hidrógeno/etanol a partir de sustratos complejos ricos en lignocelulosa al incrementar el tiempo de retención hidráulico (TRH) y disminuir la concentración de sustrato.

V. Objetivos

GENERAL

Desarrollar un sistema de fermentación en dos etapas para la generación de hidrógeno y etanol a partir de los subproductos de maíz.

PARTICULARES

- 5.1 Caracterizar los subproductos obtenidos del cultivo de maíz (hojas y tallos) en términos de contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina.
- 5.2 Operar un reactor continuo de mezcla completa en fase acidogénica para la producción de hidrógeno mediante la conversión de los subproductos del maíz utilizando un consorcio microbiano.
- 5.3 Evaluar el efecto del tiempo de retención hidráulica (TRH) y concentración de sustrato sobre la producción de hidrógeno y etanol, en un proceso en serie de fermentación acidogénica y solventogénica utilizando consorcios microbianos.
- 5.4 Estudiar las actividades enzimáticas clave dentro del proceso (celulasas y xilanasas) presentes en los reactores acidogénicos y solventogénicos.

VI. Metodología

El desarrollo del trabajo experimental se planeó en tres fases medulares que incluyeron las siguientes 6 actividades, como se muestra en la Figura 2.

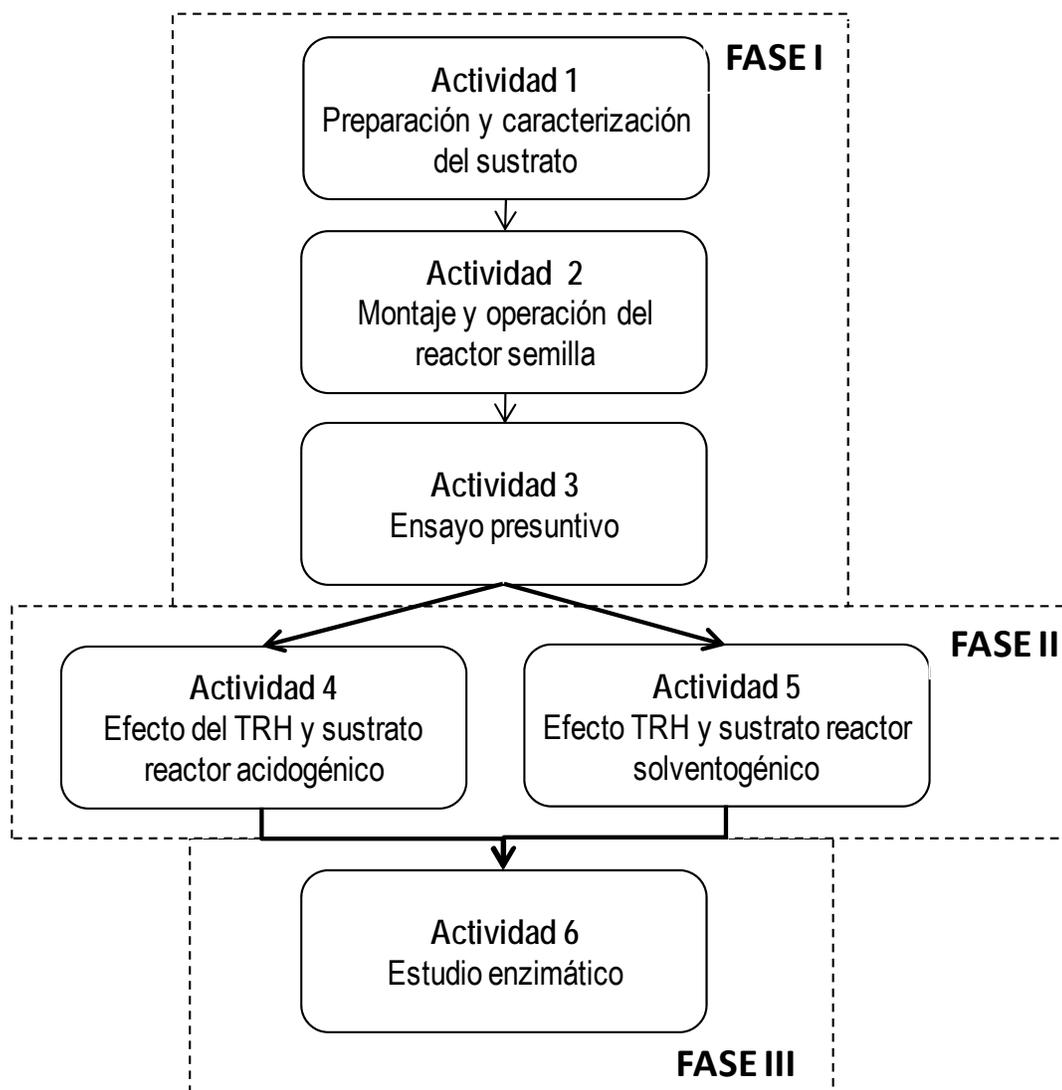


Figura 2. Diagrama experimental.

FASE I

La Fase I del trabajo experimental consistió en las actividades de: 1) preparación y caracterización de un sustrato lignocelulósico modelo, 2) y 3) el montaje de reactores semilla que permitieron obtener un inóculo anaerobio acidogénico para la producción de hidrógeno y alcoholes a partir de la fermentación del sustrato lignocelulósico modelo.

VI.I Preparación y caracterización del sustrato

El sustrato lignocelulósico modelo consistió de hojas y tallos de un cultivo de maíz de la región agrícola de San Quintín, Ensenada. Los subproductos fueron recolectados en el mes de agosto de 2008, semanas después de que el agricultor realizó la cosecha respectiva. La preparación de los residuos consistió en su deshidratación al sol hasta reducir al mínimo el contenido de humedad para evitar el crecimiento de microorganismos. Después, se realizó una pre-molienda en un molino de martillos hasta un tamaño de partícula de aprox. 1 cm para su almacenamiento a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una molienda en seco con una licuadora casera y un cribado hasta obtener un tamaño de partícula menor a 250 micras.

Finalmente, la caracterización del sustrato lignocelulósico modelo se realizó mediante dos métodos principales. Un método gravimétrico por el cual se determinó el contenido de sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y cenizas y un método reportado para el análisis de materiales fibrosos por el cual se determinó la cantidad de fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN), datos que fueron utilizados para conocer el porcentaje de hemicelulosa y celulosa en el sustrato.

Estos análisis tuvieron como finalidad conocer la cantidad de material potencialmente aprovechable para la producción de hidrógeno y etanol en los ensayos de fermentación posteriores; así como también determinar por comparación con el sustrato utilizado, la cantidad de sustrato consumido.

VI.I.I Determinación de sólidos totales (ST)

El desarrollo de este protocolo permitió llevar a cabo la determinación del peso seco de las muestras, ya sea del sustrato modelo alimentado o del sustrato gastado (purgas) de los reactores biológicos (NMX-AA-034-SCFI-2001).

Se pesó alrededor de 1 g de muestra (M) en una cápsula de porcelana a peso constante (W1) y se colocó en una estufa a 110°C por 24 h. Después, las muestras secas se colocaron en un desecador a temperatura ambiente por 1 h y se registro el peso sin humedad (W2). El porcentaje de ST se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%ST = \frac{W2 - W1}{M} \times 100 \quad [1]$$

VI.I.II Determinación de sólidos volátiles totales (SVT) y cenizas

Este protocolo fue utilizado para determinar la cantidad de materia orgánica capaz de volatilizarse por efecto de la calcinación a 550°C, ya sea en el sustrato modelo alimentado o en el sustrato gastado (purgas) de los reactores biológicos (NMX-AA-034-SCFI-2001).

Las muestras libres de humedad obtenidas del punto anterior (W2) se introdujeron en una mufla y fueron calcinadas a 550°C por 1 h. Pasado este tiempo, se permitió disminuir la temperatura hasta los 110°C, para transferir las muestras calcinadas a un desecador a temperatura ambiente por 1 h, para posteriormente registrar su peso (W3). El porcentaje de SVT en base seca se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%SVT \text{ (base seca)} = \frac{W3 - W2}{M} \times 100 \quad [2]$$

El porcentaje de cenizas en base seca se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas (base seca)} = \frac{W3 - W1}{M} \times 100 \quad [3]$$

VI.I.III Determinación de fibra detergente neutro (FDN)

El método de fibra detergente neutro es utilizado para determinar el contenido de fibra en materiales utilizados como alimento a rumiantes. Se basa en solubilidad en un agente tensoactivo, de ciertos componentes presentes en las muestras analizadas como son: pectinas, proteínas, azúcares y lípidos, dejando un residuo fibroso con los componentes de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y lignina más la porción de minerales (Goering y Van Soest, 1970; Mertens, 1992; van Soest, et al., 1991). Las muestras analizadas fueron tanto el sustrato modelo alimentado como el sustrato gastado (purgas) de los reactores biológicos.

Se pesó entre 0.45-0.55 g de muestra libre de humedad (W2) en un matraz de bola y se adicionaron 0.5 g de sulfito de sodio y 50 mL de solución de detergente neutro (que contenía por litro; 30 g de lauril sulfato de sodio, 18.61 g de EDTA, 6.81 g de borato de sodio decahidratado, 4.56 g de fosfato de sodio dibásico, 10 mL de trietilenglicol). El matraz se colocó en una parrilla precalentada para lograr su rápida ebullición y se mantuvo bajo reflujo por 5 min, después se adicionaron 2 mL de solución de amilasa termoestable al 3% (amilasa A3306 de *Bacillus licheniformis* de Sigma Aldrich). Después de 25 min, se enjuagaron las paredes del matraz con solución de detergente neutro y se permitió que terminara el tiempo de reflujo total de 1h. Se retiró el matraz de la parrilla y se dejó sedimentar las partículas durante 30-60 s. La solución fue filtrada en crisoles de vidrio tipo Gooch de 50 mL de porosidad media previamente puestos a peso constante (W1). Se vertió la solución y se decantó cuidadosamente con una mínima cantidad de vacío, se recuperaron las partículas del matraz con agua hirviendo y se colocaron en el crisol. Inmediatamente después se llenó el crisol a la mitad con agua caliente y se adicionaron 2 mL de la solución estándar de amilasa y se dejó reaccionar por 60 s. Después se enjuagó 2 veces con agua hirviendo y se dejó reposar 2 min. Se repitió la misma operación con acetona. Los crisoles más el residuo fueron secados en una estufa a 110°C durante toda la noche, posteriormente fueron enfriados en un desecador y finalmente se registró su peso (W3).

El porcentaje de fibra detergente neutro en base seca se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% FDN(\text{base seca}) = \frac{W3 - W1}{W2} \times 100 \quad [4]$$

VI.I.IV Determinación de fibra detergente ácido (FDA)

El procedimiento de fibra detergente ácida disuelve principalmente hemicelulosa presente en la muestra analizada, dejando un residuo que contiene celulosa más lignina, así como una porción de proteínas dañadas por calor y minerales (cenizas). Las muestras analizadas con este protocolo fueron el sustrato modelo alimentado, así como el sustrato gastado (purgas) de los reactores biológicos.

Se pesó alrededor de 1 g de muestra libre de humedad (W2) en un matraz de bola, y se colocaron 100 mL de solución detergente ácida (que contenía 1L de ácido sulfúrico 1.0 N y 20 g de bromuro de cetiltrimetilamonio). Después, se dejó en reflujo por 1 h, evitando la formación de espuma mediante la regulación de la temperatura, además de agitar constantemente para resuspender las partículas adheridas a las paredes del matraz. Después de 30 min se lavó el matraz con un poco de solución ácida detergente y la solución fue filtrada con un mínimo de vacío en crisoles de vidrio tipo Gooch de 50 mL de porosidad media previamente puestos a peso constante (W1). Los crisoles fueron lavados dos veces con agua hirviendo con reposo intermedio de 1 min luego se lavaron dos veces con 30 mL de acetona y dejando reposar 1 min. Los crisoles más el residuo fueron secados en una estufa a 110°C durante toda la noche, posteriormente fueron enfriados en un desecador y finalmente se registró su peso (W4) (OMA, 1990).

El porcentaje de fibra detergente ácida en base seca se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ FDA (base seca)} = \frac{W4 - W1}{W2} \times 100 \quad [5]$$

El porcentaje de hemicelulosa en base seca, se determinó por diferencia entre FDN y FDA:

$$\% \text{ hemicelulosa (base seca)} = \text{FDN} - \text{FDA} \quad [6]$$

VI.II Reactor semilla.

Se montó un reactor semilla el cual tuvo como objetivo obtener un inóculo anaerobio acidogénico aclimatado a un sustrato lignocelulósico, el cual sería utilizado en los ensayos posteriores de producción de hidrógeno. El reactor consistió de un recipiente de vidrio de 1 L de capacidad cerrado herméticamente con un tapón de hule con dos salidas, una para la salida del biogás y otra para la entrada y salida de la alimentación y purgas, respectivamente. El reactor fue cargado inicialmente con 500 g de una mezcla en partes iguales de: excreta de vaca, lodos

activados y suelo de jardín de 20 cm de profundidad (Poggi-Varaldo, et al., 1997). Posteriormente, el reactor fue cerrado y el aire contenido fue desplazado con un flujo de nitrógeno durante 3 min para favorecer condiciones anaerobias. Inicialmente, el reactor fue alimentado con 3 g de sacarosa para inducir el consumo de oxígeno remanente como parte del metabolismo de los microorganismos y gradualmente permitir la selección de comunidades microbianas anaerobias. Luego de 7 períodos de alimentación con sacarosa se cambió el sustrato por una mezcla de celulosa cristalina y el sustrato lignocelulósico modelo previamente preparado. Las condiciones de operación fueron 47°C, 0.05 L de volumen útil y pH entre 5.5 - 6.5 mantenido mediante la adición de un amortiguador de fosfatos. La concentración de sustrato y el tiempo de retención hidráulico fueron variadas según el comportamiento en la producción de biogás teniendo como finalidad adaptar el inóculo a las condiciones reportadas para la producción de H₂, CO₂, ácidos orgánicos, alcoholes y solventes. Los análisis de seguimiento para esta etapa incluyeron la medición de pH y volumen de biogás mediante desplazamiento de salmuera acidificada a pH 3.0 (Valdez-Vazquez, 2007)

VI.III Ensayo Presuntivo

El desarrollo del ensayo presuntivo tuvo la finalidad de implementar la estrategia a seguir para la alimentación del sustrato semisólido y adquirir experiencia en la operación de reactores biológicos anaerobios. Además, el ensayo fue utilizado para montar diferentes combinaciones de inóculo/alimentación que sirvieran como reactores semilla semi-continuos y obtener aquel con mayor producción de biogás a partir del sustrato lignocelulósico modelo. Los reactores semilla que se montaron fueron 4 con las siguientes combinaciones:

R1: se cargo inicialmente con un inóculo que consistió de 160 g de una mezcla en partes iguales de excreta de vaca, suelo de jardín y lodos residuales y 40 mL de amortiguador de fosfatos (70 g/L) pH 6.5. Se alimentó con 2 dosis de sacarosa de 3 g y finalmente 5 g del sustrato lignocelulósico modelo.

R2: se cargo inicialmente con un inóculo que consistió de 100 g de una mezcla en partes iguales de excreta de vaca, suelo de jardín y lodos residuales y 100 mL de amortiguador de de fosfatos (70 g/L) pH 6.5. Se alimentó con 1 dosis de sacarosa 3 g y finalmente 5 g del sustrato lignocelulósico modelo.

R3: se cargo inicialmente con un inóculo que consistió de 100 g de una mezcla en partes iguales de excreta de vaca, suelo de jardín y lodos residuales y 40 g de sustrato (pretratado en autoclave a 121°C con ácido sulfúrico al 1% w/v) con amortiguador de fosfatos (70 g/L) pH 6.5 aforado a 100 mL.

R4: se cargo con un inóculo que consistió de 100 g de una mezcla en partes iguales de excreta de vaca, suelo de jardín y lodos residuales y 40 g de sustrato lignocelulósico fresco licuado con amortiguador de fosfatos (70 g/L) pH 6.5 aforado a 100 mL.

El análisis de seguimiento para esta etapa incluyó la medición del volumen de biogás mediante desplazamiento de salmuera acidificada a pH 3.0 (Valdez-Vazquez, 2007).

FASE II

La Fase II del trabajo experimental consistió en las actividades 4 y 5 enfocadas al estudio del efecto del tiempo de retención hidráulico (tiempo de permanencia del contenido de un reactor antes de realizar un recambio) y la concentración del sustrato sobre la producción de hidrógeno y alcoholes en reactores acidogénicos y solventogénicos, respectivamente.

VI.IV Estudio del TRH y concentración de sustrato en reactores acidogénicos.

Durante esta actividad se monitoreó la producción de hidrógeno mediante una fermentación acidogénica utilizando residuos de maíz como sustrato. Los factores estudiados fueron el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración de sólidos en la alimentación.

VI.IV.I Reactores e inóculo

Los reactores semi-continuos se montaron con botellas de vidrio de 1 L de capacidad, cerrados herméticamente con un tapón de hule con una salida para el biogás acoplada a la entrada de un salmuerómetro. El inóculo fue obtenido de los reactores semilla que dieron mejores resultados, cargando 400 g aforados a 500 mL con amortiguador de fosfatos pH 6.5. Posteriormente, el reactor fue cerrado y el aire contenido fue desplazado con un flujo de nitrógeno durante 3min para favorecer condiciones anaerobias. Durante los primeros días de operación, los reactores se alimentaron con una dosis de sacarosa y posteriormente con la cantidad de sustrato correspondiente a cada reactor. Las condiciones de operación fueron 47°C, 0.5 L de volumen útil y pH se mantuvo entre 5.5 - 6.5 con un amortiguador de fosfatos pH 6.5.

VI.IV.II Diseño experimental

El diseño experimental empleado para estudiar el efecto del TRH y concentración de sustrato sobre diversas variables fue un factorial completo para dos variables a tres niveles, 3^2 . Las variables independientes fueron TRH y concentración de sustrato cada uno con 3 niveles (ver Tabla VII). La clave de cada reactor se formó con la letra R, seguida del TRH, finalizando con la concentración de sustrato alimentado.

Tabla VII. Diseño factorial completo 3² para estudiar el efecto del TRH y concentración de sustrato sobre la producción de hidrógeno.

Sustrato (g/L)	Tiempo de retención hidráulico (h)		
	240	120	60
100	R240-100	R120-100	R60-100
50	R240-50	R120-50	R60-50
25	R240-25	R120-25	R60-25

VI.IV.III Parámetros de seguimiento y métodos analíticos.

En la Tabla VIII se muestran los parámetros de seguimiento de los reactores, así como los métodos empleados. Éstos consistieron en el monitoreo del volumen y composición del biogás, pH, ácidos orgánicos, sustrato residual, sólidos totales, sólidos volátiles, proteína total y soluble.

Tabla VIII. Parámetros de seguimiento de los reactores acidogénicos para la producción de hidrógeno.

Parámetro	Método	Referencia
Biogás	Desplazamiento de salmuera	(Valdez-Vazquez, 2007)
Composición biogás (H ₂ , CO ₂)	CG-TCD ^a	(Acevedo-Benitez, 2008)
pH	Potenciómetro	(APHA, 2005)
Ácidos orgánicos	HPLC	(Ahring y Westermann, 2007; Romero-Rodriguez et al., 1992)
Sustrato residual, sólidos totales sólidos volátiles	Gravimétrico	(APHA, 2005)
Sustrato residual	FDN ^b y FDA ^c	(Goering y Van Soest, 1970; Mertens, 1992; van Soest, et al., 1991)
Proteína total y soluble	Bradford	(Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990)

Notas: ^a cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica; ^b fibra detergente neutro; ^c fibra detergente ácida.

VI.IV.IV Volumen y composición de biogás.

El biogás se midió por desplazamiento de salmuera. Los reactores tuvieron una salida para el biogás generado, esta estaba conectada a un salmuerómetro cerrado herméticamente y diseñado con una entrada y una salida, para el biogás y el desplazamiento de salmuera respectivamente. La salmuera consistió en una solución saturada de NaCl a pH 3.0 (H_2SO_4) para evitar la solubilización del CO_2 (Valdez-Vazquez, 2007). El análisis de la composición del biogás (H_2 , CO_2 , CH_4) se realizó a través de cromatografía de gases con un detector tipo TCD, se utilizó una columna empacada de silica gel (60/80) 18ft x 1/8", se utilizó argón a 0.6 mL/s como gas conductor, las temperaturas de la columna, detector e inyector fueron 70°C, 160°C y 40°C, respectivamente (Acevedo-Benítez, 2008).

VI.IV.V pH y metabolitos solubles

El pH de las purgas de los reactores se midió con ayuda de un potenciómetro marca HANNA modelo HI9803 (APHA, 2005) con cada frecuencia de alimentación.

Para la determinación de metabolitos solubles, se tomó alrededor de 5 g de purga de los reactores las cuales fueron centrifugadas a 15,600 *g* durante 15 min. El sobrenadante resultante fue recuperado para su posterior análisis. A las muestras provenientes de los reactores alimentados con 100 g/L y 50 g/L de sustrato se les realizó una dilución 1:10 con agua destilada. La determinación de metabolitos solubles se realizó inyectado una muestra del sobrenadante recuperado en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector UV, equipado con una columna ZORBAX ECLIPSE XDB-C8 4.6x150 mm 5- μ m. Las condiciones de operación fueron: temperatura de 40°C, 80 % de agua pH 2.1 (H_2SO_4) y 20 % de acetonitrilo, velocidad de flujo de 0.5 mL/min, volumen de inyección 20 μ L (modificado de Ahring y Westermann, 2007; Romero-Rodriguez, et al., 1992).

VI.IV.VI Consumo de sustrato y crecimiento celular

Las purgas de los reactores fueron analizadas como se describe en 6.1.1. Esto permitió conocer el consumo de sustrato en términos de sólidos volátiles, FDN y FDA.

El crecimiento microbiano fue monitoreado mediante el análisis de la proteína total en las purgas de los reactores mediante un método colorimétrico. Para ello se pesó 0.2 g de purga de los reactores y se adicionaron 5 mL de NaOH 0.5 N incubando durante 30 min a 37°C en agitación

constante. Después, se neutralizó con HCl y se tomó 50 μ L del sobrenadante y se mezcló con 2.5 mL del agente colorante Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit). Se dejó reposar por 5 min y se procedió a leer en un espectrofotómetro Hach DR/4000U a 595 nm. El ensayo se realizó por duplicado, la curva de calibración se preparó con albúmina de suero bovino, con un rango lineal de 0.05-4 mg/mL y una R^2 de 0.9945.

VI.IV.VII Análisis estadístico

Los valores promedio de los parámetros de seguimiento o variables de respuesta, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza mínimo del 95 % para determinar diferencias significativas entre tratamientos. De esta forma, se determinó la significancia de los efectos principales (TRH y concentración de sustrato) y las interacciones para un factorial completo de dos factores a tres niveles, 3^2 (Montgomery, 2002).

VI.V Estudio del TRH y concentración de sustrato en reactores solventogénicos.

En esta actividad se operaron fermentadores en fase solventogénica (pH 4.5 – 5.5) para la producción de etanol a partir de los sólidos gastados generados de los fermentadores productores de hidrógeno.

VI.V.I Reactores, inóculo y sustrato

Se montaron 2 fermentadores con botellas de vidrio de 1 L de capacidad, cerrados herméticamente con un tapón de hule con una salida para el biogás acoplada a la entrada de un salmuerómetro. El inóculo fue obtenido de las purgas de los reactores productores de hidrógeno cargando 200 g aforados a 500 mL con amortiguador de fosfatos pH 5.5. Posteriormente, el reactor fue cerrado y el aire contenido fue desplazado con un flujo de nitrógeno durante 3 min para favorecer condiciones anaerobias. Durante los primeros días de operación, los reactores se alimentaron con una dosis de sacarosa. Las condiciones de operación fueron 47°C, 0.5 L de volumen útil, TRH de 120 h, el pH se mantuvo entre 4.5 - 5.5 con un amortiguador de fosfatos pH 5.5.

Se utilizaron dos concentraciones de sólidos alimentados: 50 y 80 g/L. Los sólidos alimentados fueron aquellos obtenidos de las corrientes de salida de los reactores acidogénicos; los sólidos gastados fueron recuperados por decantación y posteriormente lavados con agua destilada

hasta aclarar y secados en una estufa a 60°C durante varios días. Estos reactores, al igual que los acidogénicos se operaron a una temperatura de 47°C.

VI.V.II Parámetros de seguimiento y métodos analíticos.

En la Tabla IX se muestran los parámetros de seguimiento de los reactores productores de etanol, así como los métodos empleados. Éstos consistieron en el monitoreo del volumen de biogás, pH, etanol, sustrato residual, sólidos totales, sólidos volátiles, proteína total y soluble.

Tabla IX. Parámetros de seguimiento de los reactores solventogénicos para la producción de etanol.

Parámetro	Método	Referencia
Biogás	Desplazamiento de salmuera	(Valdez-Vazquez, 2007)
Ph	Potenciómetro	(APHA, 2005)
Presencia de alcoholes	Oxidación química	(Magrí, et al., 1997)
Sustrato residual, sólidos totales sólidos volátiles	Gravimétrico	(APHA, 2005)
Sustrato residual	FDA ^a y FDN ^b	(Goering y Van Soest, 1970; van Soest, et al., 1991; Mertens, 1992)
Proteína total y soluble	Bradford	(Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990)

Notas: ^a fibra detergente neutro; ^b fibra detergente ácida.

VI.V.III Volumen de biogás

Tal como se describe en el punto 6.2.1.2.

VI.V.IV pH

Se describió en el punto 6.2.1.3.

VI.V.V Determinación de la presencia de alcoholes

El uso de una solución sulfocrómica permitió identificar la presencia de etanol en las muestras de los reactores mediante un cambio de coloración en la mezcla; el Cr^{+7} reacciona selectivamente con etanol formando Cr^{+3} y ácido acético (Magrí, et al., 1997). Para esto se preparó una solución sulfocrómica disolviendo 15 mL de dicromato potásico en 60 mL de agua y 60 mL de ácido sulfúrico. Se tomó 1 mL del sobrenadante de los reactores y se colocó en un tubo de ensayo, luego se le adicionó 4.5 mL de solución sulfocrómica para observar cambios de coloración (de naranja a azul) después de 1 h que permitiera confirmar la presencia de etanol en los reactores. Además de este análisis cualitativo, muestras de cada reactor solventogénico fueron analizadas mediante HPLC para la determinación cualitativa de etanol mediante servicio externo con la empresa Laboratorio Ambiental Sigma S.de R. L. de C.V.

VI.V.VI Sustrato Residual

Descrita en el punto 6.1.

VI.V.VII Crecimiento celular

Descrita en el punto 6.4.6.

VI.V.VIII Análisis estadístico

Los valores promedio de los parámetros de seguimiento o variables de respuesta, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza mínimo del 95 % para determinar diferencias significativas entre tratamientos (dos concentraciones de sólidos alimentados, Montgomery, 2002).

FASE III

En esta fase se analizó 2 actividades enzimáticas clave (celulasas y xilanasas) en el proceso de hidrólisis del sustrato lignocelulósico modelo, tanto en los reactores acidogénicos como solventogénicos. El análisis consistió en ensayos de actividad enzimática, en donde se recuperó las enzimas excretadas en el sobrenadante de los reactores e incubándolas con el sustrato blanco, para determinar la cantidad de azúcares reductores liberados por unidad de tiempo.

VI.VI Actividades enzimáticas

Los carbohidratos predominantes en el sustrato utilizado en los ensayos de fermentación fueron hemicelulosa y celulosa, por lo que los microorganismos presentes en el consorcio microbiano tuvieron que expresar y excretar enzimas hidrolíticas para romper estos dos polisacáridos antes de su fermentación. Las xilanasas y celulasas son enzimas extracelulares encargadas de hidrolizar hasta monómeros estos dos polisacáridos. La determinación de la cantidad total de enzimas excretadas, así como su actividad específica nos proporciona información importante sobre el proceso de hidrólisis que antecede a la fermentación. Junto con el consumo de sustrato, provee una perspectiva más completa sobre el tipo de carbohidratos preferentemente consumido por el consorcio microbiano, y de esta manera estar en posibilidad de su optimización en estudios posteriores.

VI.VI.I Precipitación de proteínas totales

Debido a que las enzimas a estudiar son excretadas al medio, su estudio tiene como primer paso su recuperación mediante precipitación con solventes. Una vez precipitadas, se realizan los ensayos enzimáticos con el sustrato blanco, carboximetilcelulosa para determinar actividad celulolítica o xilano para determinar actividad xilanolítica.

Para la precipitación de las enzimas solubles totales, se centrifugaron 5 mL de la purga de los reactores a 15,500 *g* durante 10 min a 4°C. Al sobrenadante recuperado se le añadieron 20 mL de metanol, se agitó vigorosamente e inmediatamente después se adicionaron 5 mL de cloroformo, se agitó nuevamente y se adicionaron 15 mL de agua destilada. Posteriormente, se centrifugó 9,000 *g* por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Luego, se adicionaron 20 mL de metanol, se mezcló

vigorosamente y se centrifugó a 9,000 *g* por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire para finalmente re-suspenderse en 2 mL de agua destilada.

VI.VI.II Actividad xilanolítica.

Para determinar la actividad xilanolítica se incubó 0.5 mL del precipitado enzimático, 0.5 mL de xilano al 1 % w/v (SIGMA X0627, ≥ 70 % xilosa) en amortiguador de acetato 0.05 M pH 6 durante 24 h a 47°C (Criquet, 2002; Poggi y Rinderknecht, 1990). La cantidad de azúcares reductores liberados fue determinada mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Para esto, se mezclaron 0.5 mL del ensayo enzimático más 2.5 mL del reactivo de DNS (que contenía por litro: 8 g de DNS, 25 g de NaOH, 5 g fenol, 200 g de tartrato de sodio-potasio, 5 g NaHSO₃). La mezcla se incubó por 10 min en baño María que previamente había alcanzado el hervor, luego se permitió la estabilización de la temperatura con el ambiente y finalmente se leyó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Hach DR/4000U (Poggi y Rinderknecht, 1990). La curva estándar se realizó con glucosa en un rango lineal de 0 - 1 μ mol con un R² de 0.9991.

Se definió una unidad internacional de actividad xilanolítica (UIX) como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcar reductor por minuto a 47°C. La actividad específica se expresó en UIX/mg de proteína.

VI.VI.III Actividad celulolítica

Para determinar la actividad celulítica se incubó 0.5 mL del precipitado enzimático, 0.5 mL de carboximetilcelulosa sal sódica de baja viscosidad al 1 % w/v (SIGMA C5678) en amortiguador de acetato 0.05 M pH 6 durante por 24 h a 47°C (Criquet, 2002; Poggi y Rinderknecht, 1990). La cantidad de azúcares reductores liberados fue determinada mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), como se describió anteriormente. La curva estándar se realizó con glucosa en un rango lineal de 0 - 1 μ mol con un R² de 0.9956.

Se definió una unidad internacional de actividad celulolítica (UIC) como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcar reductor por minuto a 47°C. La actividad específica se expresó en UIX / mg de proteína.

VII. Resultados y Discusión

En esta sección se presentan y discuten los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo, el cual estuvo dividido en 3 fases y 6 actividades. En la Fase 1, se preparó y caracterizó un sustrato lignocelulósico modelo (actividad 1), y se obtuvo un inóculo anaerobio capaz de hidrolizar y fermentar al sustrato modelo (actividades 2 y 3) que sirvió en los ensayos posteriores de fermentación. En la Fase 2, se realizaron las actividades 4 y 5 encaminadas a la producción de hidrógeno y etanol, respectivamente, estudiando el efecto de la concentración del sustrato y tiempo de retención hidráulico sobre el desempeño de los reactores. La Fase 3 estuvo enfocada al estudio enzimático (actividad 6), mediante ensayos de actividad celulolítica y xilanolítica presente en los reactores productores de hidrógeno y etanol.

FASE I

VII.I Caracterización del sustrato

El sustrato lignocelulósico modelo utilizado para los ensayos de fermentación estuvo compuesto de hojas y tallos remanentes de un cultivo de maíz de la zona agrícola de San Quintín, Ensenada. Los resultados de la caracterización fueron obtenidos por dos métodos generales, un método gravímetro y un método para el análisis de fibra detergente.

Del análisis gravimétrico, se encontró que el contenido de sólidos totales (ST), sólidos volátiles totales (SVT) y cenizas fue de 93.82 ± 0.08 %, 97.23 ± 0.02 % (en base seca) y 2.77 ± 0.30 % (en base seca), respectivamente. Se observó que el contenido de ST (o peso seco) fue muy elevado, lo que fue reflejo de una eficiente pérdida de humedad durante el proceso de secado natural al cual estuvieron sometidos los residuos de maíz previo a su recolección. Del total de ST, un 97 % correspondió a SVT, lo que equivale a la materia orgánica que eventualmente puede ser aprovechada como sustrato durante ensayos de fermentación. El contenido de cenizas o materia inorgánica sólo representó el 2.77 % de los ST, siendo inferior al 7.4 % reportado por Kumar, et al. (2008). Fue sorprendente el bajo contenido de cenizas en el material analizado, lo que podría atribuirse a la predominancia de tallos de maíz, los cuales tienen un bajo contenido de cenizas, en contraste a la fracción de hojas la cual tiene un alto contenido de sílice (Richard y Trautmann, 1996; Fadel Elseed, et al., 2007).

Del análisis de fibra detergente fue posible determinar el contenido de extractivos, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA). Los extractivos corresponden al material soluble en agua como son minerales, almidón, pectina, proteínas, entre otros. El contenido de FDN corresponde a la suma de los carbohidratos estructurales (celulosa + hemicelulosa) de la pared celular de plantas. Mientras que, la FDA corresponde sólo a la suma de celulosa y lignina. Con los valores de FDN y FDA se determinó por diferencia, el contenido de hemicelulosa. Los resultados del análisis de fibra detergente encontrados para los residuos de maíz y su comparación con otros estudios se muestran en la Tabla X.

Los valores de hemicelulosa encontrados en el sustrato modelo fueron del 35 % (en base seca), estando en el rango superior a lo reportado por otros autores. Para la celulosa se encontró un 44 %, el cual también es superior a lo reportado para otros materiales similares, aunque este también incluyó a la lignina, que por comparación con el resto de autores pudiera estar presente en un 15 % aproximadamente. Por ello, se estima que el contenido de celulosa presente en el sustrato modelo pudiera encontrarse en un rango entre 30 – 44 %. En cuanto al material, se encontró un contenido del 19 % lo que pudiera corresponder a proteínas, lípidos y carbohidratos fácilmente asimilables en un proceso de fermentación. Se observa que el contenido de extractivos en residuos de maíz fue muy variable entre los estudios mostrados.

En general, los valores determinados para carbohidratos estructurales en el rastrojo de maíz concuerdan con los porcentajes reportados por otros autores; así, el contenido de hemicelulosa y celulosa estuvo en un rango del 65 – 70 % siendo una fracción mayoritaria del peso total aprovechable para su fermentación.

Entre las referencias estudiadas se encontró una variación respecto al contenido de los diferentes componentes en el sustrato modelo; estas variaciones pueden atribuirse a diferencias en la manipulación propias de cada laboratorio en este tipo de análisis. Además, otras causas en la variación composicional del rastrojo de maíz son debidas (en orden de importancia) al año de cultivo, factores ambientales y a las variedades (Templeton, et al., 2009).

Tabla X. Resultados del análisis de fibra detergente en el sustrato modelo y comparación con otros estudios.

Cenizas (% bs ^a)	Extractivos (% bs ^a)	Hemicelulosa (% bs ^a)	Celulosa (% bs ^a)	Lignina (% bs ^a)	Ref.
2.77± 0.30	18.52± 0.69	34.54± 1.88	44.17± 0.069 ^b	--	Este trabajo
6.5	4.6	30.9	36.8	21.2	Öhgren, et al., 2007
7.1	10.4	29.2	36.1	17.2	Öhgren, et al., 2007
6.8	9.4	23.6	42.7	17.5	Kirubakaran, 2007
7.0	26	28	28	11	Richard y Trautman, 1996
9.7	14.7	22.6	36.4	16.6	Lynd, et al., 1993

Notas: ^a, base seca; ^b incluye lignina.

VII.II Reactor Semilla

Una de las actividades elementales para el desarrollo del trabajo de tesis fue la obtención de un inóculo que tuviera las siguientes características: a) ser anaerobio, b) productor de hidrógeno, y c) capaz de fermentar un sustrato complejo con un alto contenido de fibra. Para esto, se montó un reactor semilla que inicialmente se inoculó con una mezcla de suelo de jardín, excreta de vaca y lodos residuales (Valdez-Vazquez, 2007). Esta mezcla garantizó la presencia de microorganismos anaerobios estrictos provenientes del suelo de jardín y la excreta de vaca, así como de anaerobios facultativos provenientes de los lodos residuales. El reto consistió en lograr la aclimatación gradual del inóculo para que adquiriera las tres características antes mencionadas.

En un primer ensayo, el reactor semilla se alimentó durante los primeros 13 días con sacarosa (Poggi-Varaldo, et al., 1997). Lo anterior, para lograr la proliferación de los microorganismos presentes, así como el establecimiento de una atmósfera anaerobia al consumirse el oxígeno presente como parte del metabolismo de los microorganismos anaerobios facultativos. Alrededor del día 14, se cambió la alimentación por una mezcla de sacarosa y celulosa cristalina. Sin embargo, el cambio en la alimentación afectó drásticamente la producción de biogás hasta reducirlo totalmente. Aunado a esto, se tuvieron problemas con la operación de los reactores anaerobios, ya

que no hubo un buen sellado lo que permitió la entrada de oxígeno. Durante este segundo periodo, se buscaron alternativas para la reactivación del reactor semilla mediante la re-inoculación, sin obtener resultados positivos.

En este primer ensayo, no se logró obtener el inóculo deseado lo que pudo deberse a diversos factores entre los que se puede mencionar la inexperiencia en la operación de sistemas anaerobios, además de un inóculo pobre en los microorganismos deseados. A este respecto, se ha reportado que al utilizar heces de rumiantes, la producción de biogás es menor comparada con aquella que se obtiene al utilizar los fluidos ruminales (Akhter, et al., 1999). Una empobrecida producción de biogás se ha atribuido a una escasa recuperación de microorganismos, los cuales permanecen adheridos a las heces (Meadaway, et al., 1998). Es usual, que la obtención de un inóculo anaerobio y además productor de hidrógeno, sea un proceso prolongado y complejo que inclusive es tema de investigación (Kawagoshi, et al., 2005; Pakarinen, et al., 2008). Esto se debe a que los inóculos típicamente utilizados incluyen consorcios anaerobios formados por diferentes grupos microbianos: hidrolíticos, fermentativos, acetogénicos y metanogénicos. Por lo tanto, los estudios están enfocados a establecer las condiciones ambientales óptimas para la selección de microorganismos hidrolíticos y fermentativos (principales productores de hidrógeno). Es así, que se ha encontrado que el acondicionamiento del inóculo es un factor clave para la producción de hidrógeno. Se ha encontrado que pH menores a 7.0, tiempos de retención hidráulicos menores a 20 h, y un pre-tratamiento a temperaturas elevadas han favorecido la selección de un inóculo productor de hidrógeno (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Los diferentes acondicionamientos del inóculo provocan una alteración en la estructura de la flora microbiana, lo que obliga a los microorganismos a su aclimatación a las nuevas condiciones de crecimiento. Los microorganismos seleccionados requerirán cierto tiempo para poner en marcha los mecanismos enzimáticos necesarios lograr su propagación, lograr cambios genéticos, adaptarse a nuevas condiciones nutricionales, así como moléculas tóxicas (Buitrón y Capdeville, 1995).

Al finalizar esta actividad, se logró adquirir experiencia en el montaje y operación de sistemas anaerobios para diseñar una nueva serie de reactores semilla en un ensayo presuntivo posterior.

VII.III Ensayo Presuntivo

Para el desarrollo de esta actividad se montaron 4 reactores que variaron en su contenido de inóculo, amortiguador de pH y tipo de sustrato (ver punto 6.3). El reactor 1 (R1) tuvo un contenido predominante de inóculo (mezcla de suelo, fluidos ruminales, lodos activados) y fue alimentado inicialmente con dos dosis de sacarosa y luego el sustrato modelo. Los reactores 2 – 4 (R2, R3, R4) tuvieron un menor contenido de sólidos que el R1, y fueron alimentados con una dosis de sacarosa/sustrato, sustrato pre-tratado con ácido sulfúrico y sustrato fresco, respectivamente. En todos se utilizó un amortiguador de fosfatos para mantener el pH en un rango acidogénico. Con esta serie de reactores se buscó obtener aquél que suministrará la fuente de inóculo para los ensayos de fermentación para la producción de hidrógeno utilizando al sustrato lignocelulósico modelo previamente preparado. El método para medir el desempeño de estos 4 reactores consistió en monitorear la ^{R3} productividad de biogás durante ^{R4} 37 días de operación (Figura 3).

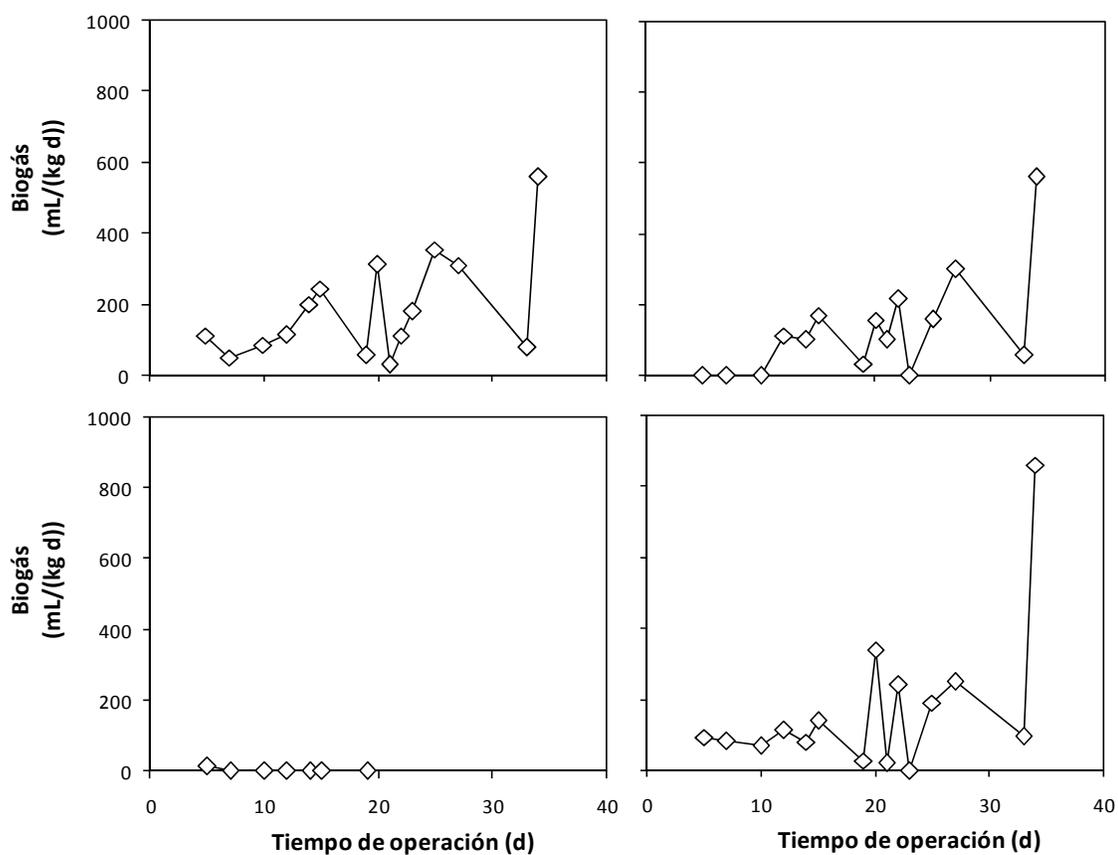


Figura 3. Evolución de la productividad de biogás en los reactores semilla.

De la Figura 3, se puede observar que el reactor R1 tuvo una ligera e inmediata producción de biogás debido a su alimentación inicial con sacarosa lo que permitió un rápido crecimiento de los microorganismos. Al cambiar la alimentación de sacarosa por subproductos de maíz, se observó una alteración lo que disminuyó la producción de biogás (indicado en la Figura 3, R1). A pesar de esto, el inóculo tuvo la capacidad de adaptarse al nuevo sustrato recuperando su productividad de biogás en forma creciente aunque fluctuante. Finalmente, la productividad de biogás alcanzó un máximo de aproximadamente 600 mL/(kgd).

Por otro lado, el reactor R2 presentó una productividad de biogás similar al reactor R1, es decir, una productividad creciente y fluctuante hasta alcanzar un máximo. Aunque hubo un desfase en la producción ya que comenzó después del día 10 de operación, esto puede estar asociado a una menor dosis de sacarosa al inicio y un menor contenido de sólidos.

El reactor R3 no presentó producción de biogás durante todo el tiempo de operación. Lo anterior se debió a que el pH del sustrato pre-tratado con ácido sulfúrico no pudo ser regulado por el amortiguador utilizado, es decir, el pH fue muy bajo e impidió el desarrollo de microorganismos fermentativos.

Finalmente, el reactor R4 presentó una producción de biogás constante y ligeramente ascendente durante los primeros 16 días de operación. Después de este periodo se observó una fluctuación similar a la presentada en los reactores R1 y R3, que puede ser asociada a una inconsistencia en la frecuencia de alimentación intermitente que pretendía permitir un mayor consumo de sustrato por parte de los microorganismos. Al término del día 37 de operación, este reactor alcanzó el máximo de productividad de biogás registrado, alrededor de 850 mL/(kgd).

En la Figura 3 se observa que el tiempo de operación no fue suficiente para alcanzar la estabilización de los reactores, sólo se observó el periodo de aclimatación en el cual fue posible degradar y fermentar el sustrato complejo alimentado evidenciado por la acumulación de biogás. Por otra parte, las dinámicas de productividad de biogás de los reactores R1, R2, R4 tuvieron un comportamiento fluctuante distinto a lo largo del periodo de operación, en donde todos alcanzaron un máximo entre 600 - 850 mL/ (kgd). Estos resultados indican que las diferentes combinaciones utilizadas para la obtención de un inóculo anaerobio productor de hidrógeno tuvieron resultados semejantes y efectivos. En este trabajo, se administró un sustrato simple (sacarosa) al inicio de la operación de los reactores R1 y R2 para acelerar el crecimiento celular y ayudar a su aclimatación a

las nuevas condiciones ambientales que pudieron representar un cambio severo respecto al origen del inóculo proveniente de diversos ambientes (suelo, lodos residuales, fluidos ruminales). Esto pudo estar relacionado con las fluctuaciones observadas al inicio de la operación de los reactores R1 y R2 (ver Figura 3). En contraste, el reactor R4 sólo fue alimentado con sustrato fresco que pudo contener una gran variedad de microorganismos nativos en forma activa que fueron capaces de hidrolizar este sustrato. En este caso, se presume que el cambio de ambiente no fue tan severo, inclusive, pudo ser favorecedor para al crecimiento de la microflora nativa por lo que la dinámica de biogás no presentó grandes fluctuaciones al inicio de la operación (Figura 3). Respecto a esto, Kim et al., (2009) comprobó que cuando se aprovecha la microflora nativa, no es necesaria la adición de un inóculo externo para lograr para fermentar un sustrato complejo.

El éxito de las estrategias utilizadas radicó en la utilización de condiciones de operación fijas que aseguraron la obtención de microorganismos productores de hidrógeno, independientemente del origen del inóculo. Es bien reconocido que el pH, es un factor que tiene diversas implicaciones en el proceso de producción de hidrógeno, si no es regulado adecuadamente conlleva al fracaso como ocurrió en el reactor R3. Es por ello, que el pH es el principal factor para aclimatar el inóculo, seleccionando los microorganismos deseados y dirigiendo sus capacidades metabólicas. La fase de aclimatación es la más importante en el proceso de biodegradación de un sustrato complejo. Esta etapa depende en gran medida de las enzimas inducibles, donde el periodo de inducción puede requerir desde minutos hasta varias semanas. Si la comunidad microbiana requiere de cambios dramáticos como la estructura de enzimas o el surgimiento de mutantes, este periodo puede prolongarse desde semanas hasta varios años (Buitron y Capdeville, 1995). En este trabajo, las estrategias utilizadas permitieron obtener el inóculo deseado en un tiempo razonable (< 2 meses) lo cual es congruente con otros estudios (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

FASE II

VII.IV Operación de reactores acidogénicos

En esta fase del proyecto se estudió el efecto de dos factores de importancia para la producción de hidrógeno: tiempo de retención hidráulico (TRH) y concentración de sustrato mediante un diseño factorial 3^2 , donde los niveles del TRH fueron; 60, 120 y 240 h y los niveles de la concentración de sustrato fueron; 25, 50 y 100 g/L. Para el desarrollo de esta actividad se operaron 9 reactores anaerobios semi-continuos a 3 TRH: 60, 120 y 240 h, cada uno de ellos alimentado a 3 concentraciones de sustrato distintas: 25, 50 y 100 g/L. Los parámetros de seguimiento fueron realizados con base a la tasa de crecimiento, productividad de biogás, porcentaje de hidrógeno, productividad de H_2 , productividad específica de H_2 , pH y acumulación de ácidos orgánicos, alcoholes y finalmente el consumo de sustrato.

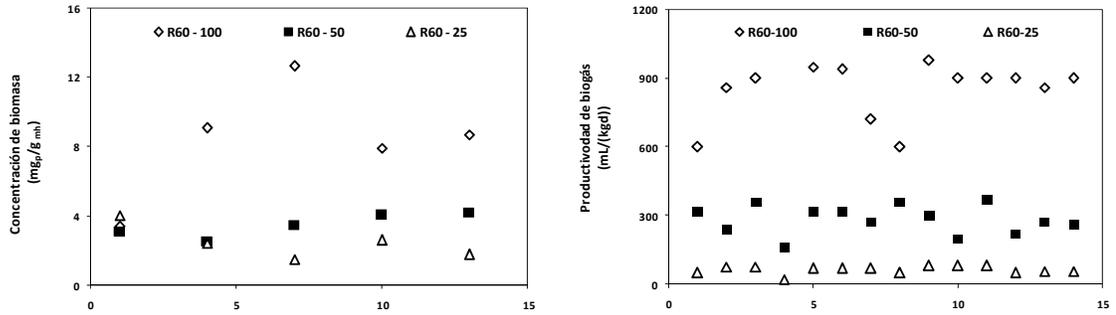
VII.IV.I Desempeño de los reactores

La concentración de biomasa fue monitoreada mediante la determinación de la cantidad de proteína total por el método colorimétrico de Bradford. En la Figura 4 se muestra el comportamiento de la concentración de biomasa a lo largo del periodo de operación para la serie de reactores R60, R120 y R240 alimentados con diferentes concentraciones de sustrato.

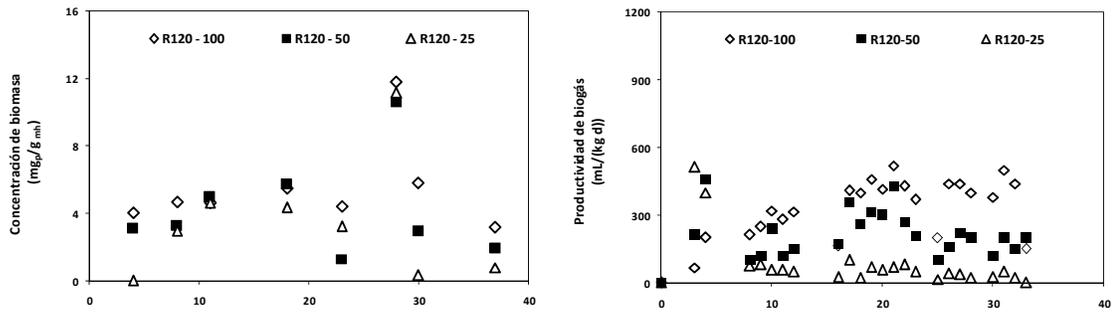
En la serie R60, se encontró que aquellos reactores alimentados a concentraciones de 25 y 50 g/L (R60-25 y R60-50) mostraron una concentración de biomasa similar y estable alrededor de 4 mg/g_{mh} a lo largo de todo el tiempo de operación (Tabla XI). Mientras que el reactor alimentado con 100 g/L (R60-100), mantuvo un crecimiento celular superior alrededor de 8 mg/g_{mh} a partir del cuarto día de operación. Estos resultados fueron congruentes con la productividad de biogás, la cual tuvo el mismo comportamiento estable a lo largo del tiempo de operación¹ (Figura 4).

¹ Se consideró un periodo estable cuando la variación del parámetro de seguimiento fue menor al 20% respecto al promedio general.

Serie R60



Serie R120



Serie R240

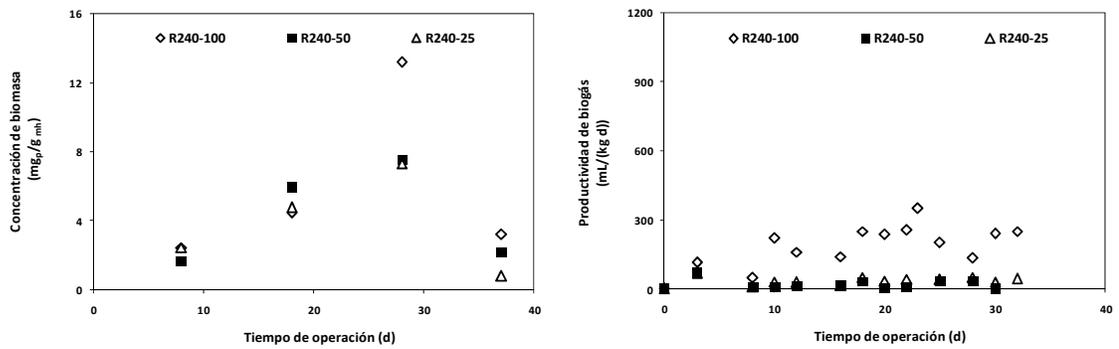


Figura 4. Dinámicas de concentración de biomasa y productividad de biogás en los reactores acidogénicos.

Cabe mencionar, que en el reactor R60-100 se encontró un punto fuera del promedio alrededor del día 7 de operación, superior para la concentración de biomasa e inferior para productividad de biogás. Este fenómeno pudo estar asociado a una alteración del consorcio microbiano debida a la manipulación del reactor, que ayudo a la proliferación de microorganismos que no estuvieron involucrados en la producción de biogás. Tanto para la concentración de biomasa como para productividad de biogás, la tendencia fue que mayor concentración de sustrato hubo una mayor respuesta del parámetro de seguimiento.

Tabla XI. Parámetros de seguimiento promedio para los reactores acidogénicos.

Clave	TRH (h)	Conc. de sustrato (g/L)	Conc. de biomasa (mg _p /g _{mh} ^a)	Productividad de biogás (mL/(kg _{mh} d))	H ₂ (%)	pH
R60-25	60	25	2.45±0.24	125.71±24.55	23.69	6.27±0.15
R60-50		50	3.48±0.39	283.57±44.23	36.07	6.11±0.21
R60-100		100	8.34±0.85	800.71±37.84	60.21	5.63±0.17
R120-25	120	25	3.91±0.82	82.93±21.94	35.31	6.22±0.58
R120-50		50	4.22±0.96	220.62±59.86	45.31	6.18±0.30
R120-100		100	4.6±0.68	337.55±43.47	49.88	6.21±0.36
R240-25	240	25	3.82±1.44	36.81±7.45	11.74	6.89±0.04
R240-50		50	4.34±2.36	23.75±10.45	30.69	6.68±0.13
R240-100		100	5.82±1.02	199.69±38.7	32.39	6.55±0.17

Notas: ^a mg proteína / g muestra húmeda.

Por otra parte, todos los reactores de la serie R120 (R120-25, R120-50 y R120-100) mostraron una concentración de biomasa relativamente estable y moderada, cercana a 4 mg/g_{mh} durante los primeros 20 de operación, luego de esto se observó un descenso (Figura 4). En cuanto a su productividad de biogás, todos ellos tuvieron un periodo de aclimatación por alrededor de 8 días: los R120-25 y R120-50 disminuyeron su productividad hasta alcanzar su estabilización, mientras que el R120-100 la incrementó hasta su estabilización. En la dinámica de productividad de biogás de los R120-100, pueden observarse 3 puntos inferiores al promedio que se atribuyen a una inconsistencia en la frecuencia de alimentación, por lo que fueron descartados en la determinación del promedio. En esta serie de reactores, se encontró la misma tendencia que la serie R60, en donde a mayor concentración de sustrato hay mayor concentración de biomasa y productividad de biogás.

Para los reactores de la serie R240, todos presentaron un comportamiento semejante en la concentración de biomasa, donde se mantuvo un ascenso hasta el día 30 de operación, y mostrando al final un declive por abajo del promedio (Figura 4). En cuanto a la productividad de biogás el periodo de estabilización se reflejó después de 10 días de operación, donde los R240-25 y R240-50 tuvieron una productividad semejante, mientras que el R240-100 tuvo una productividad promedio claramente superior (Tabla XI).

Referente a los diferentes TRH estudiados se encontró que hubo una tendencia inversa, es decir, a menor TRH hubo mayor productividad de biogás. Por lo tanto, los reactores de la serie R60 alcanzaron mayores productividades que sus homólogos a otros TRH. Contrario a esto, la concentración de la biomasa no presentó ninguna tendencia aparente.

En todos los reactores, el pH fue controlado mediante el uso de un amortiguador de fosfatos pH 6.5 para dirigir la fermentación hacia una fase acidogénica (5.5 - 6.5) y así favorecer la producción de hidrógeno (Valdez-Vazquez, et al., 2009). En la Tabla XI se muestran los registros promedio de pH para cada uno de los reactores, mostrando que se mantuvieron en el rango deseado. El uso de un amortiguador fue necesario puesto que en la fermentación hidrogenogénica se produjeron ácidos orgánicos que disminuyeron drásticamente el pH, lo que podría inducir a un cambio en la ruta metabólica hacia una fermentación solventogénica en la cual los rendimientos de hidrógeno son menores. Se distingue que el pH en los reactores de la serie R60 fue menor conforme aumentó el sustrato alimentado. El porcentaje de hidrógeno en el biogás fue determinado en el periodo estable/cuasi-estable de los reactores (Tabla XI), encontrando que éste estuvo relacionado con la concentración de sustrato, teniendo una respuesta positiva.

En general el desempeño de las tres series de reactores fue satisfactorio, lograron un periodo de productividad de biogás estable/cuasi-estable. Sin embargo, no todos lo hicieron al mismo tiempo; mientras que la serie R60 alcanzó un periodo estable rápidamente, las series R120 y R240 requirieron periodos entre 8 - 10 días. Esto se debió a que los reactores de las series R120 y R240 fueron los primeros en su montaje, mientras que los R60 se montaron posteriormente con las purgas de los reactores más productivos (R120-100 y R240-100). Los promedios calculados durante el periodo de estabilidad permitieron determinar que la máxima productividad de biogás fue de 800mL / (kg*d) alcanzada en el R60-100.

VII.IV.II Efecto del TRH y concentración de sustrato sobre la producción de H₂

El TRH (h) en un reactor de tipo quimiostato es el tiempo necesario para renovar el contenido de un reactor y corresponde al inverso de la velocidad de dilución (D , h⁻¹). En estado estacionario, la velocidad de dilución es igual a la tasa de crecimiento, por lo que un reactor no puede operarse a una $D > \mu_{\max}$, ya que ocurriría un lavado de células en el reactor. Es por esto, que a D mayores (o TRH menores) se logren las mayores tasas de crecimiento.

En la Figura 5a se muestran las gráficas del efecto del TRH y concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento. Como puede observarse, la serie de reactores operados con el menor TRH (o mayor D), alcanzaron las mayores tasas de crecimiento como era esperado. Por lo que respecta a la concentración de sustrato este afecto de forma positiva la tasa de crecimiento, es por ello que la serie de reactores con las mayores tasas de crecimiento fueron aquellos alimentados con 100 g/L. En resumen, el reactor que alcanzó la mayor tasa de crecimiento fue aquel operado a un TRH de 60 h y alimentado con 100 g/L.

Con los resultados obtenidos no fue posible observar la μ_{\max} del cultivo productor de hidrógeno en el rango de TRH estudiados (60 - 240 h). Sin embargo, por la tendencia observada es posible inferir que la disminución del TRH (aumento de la D) permitirá su elucidación.

En los TRH de 120 y 240 h, se deduce que el cultivo estuvo muy por debajo de la μ_{\max} , por lo que el metabolismo estuvo dirigido al mantenimiento y la concentración de sustrato no tuvo un efecto aparente. Por otro lado, a un TRH de 60 h fue posible observar un aumento de la μ conforme se incrementó la concentración de sustrato alimentado.

En otros estudios sobre producción de hidrógeno donde han monitoreado el crecimiento celular han encontrado tendencias similares a las de este trabajo. Por un lado, Islam et al., (2006) realizaron un estudio con *Clostridium thermocellum* 27405, donde estudiaron el efecto de la concentración de sustrato (0.1 - 4.5 g/L de celobiosa) en reactores en lote encontrando que a mayor sustrato se alcanzó una mayor crecimiento celular. Este estudio es congruente con los resultados obtenidos para los R60, lo que indica que a pesar de las altas concentraciones de sustrato utilizadas en este estudio aún no se alcanzan niveles que pudieran resultar inhibitorios para el desarrollo de los microorganismos. En cuanto al efecto del TRH sobre el crecimiento celular, los resultados encontrados en este estudio en los reactores alimentados con 100g/L de sustrato, indicaron que

cuando disminuye el TRH de 240h a 60h, se favoreció el crecimiento celular. Lo anterior coincide con una gran variedad de estudios donde se ha visto que los TRHs óptimos para alcanzar las máximas tasas de crecimiento de especies productoras de H₂ están aún muy por debajo de 60h. Chu et al., (2009) encontró que al disminuir el TRH aumentó la biomasa celular de *Clostridium* (óptimo a 6h), mientras que Mitchell et al., (2009) y Chen et al., (2001) encontraron que el mayor crecimiento se obtiene usando TRHs de 16h y 13h, respectivamente en estudios realizados con el mismo género. Chang et al., (2008) también sugiere que el TRH ideal para la proliferación de especies de *Clostridium* es alrededor de 12h, lo que está relacionado con el tiempo de duplicación de estos microorganismos.

En la Figura 5 b y c se muestran las gráficas de efectos principales del TRH y concentración de sustrato sobre la productividad de H₂ y productividad específica de H₂, donde se obtuvieron tendencias semejantes y altamente significativas estadísticamente ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente). Se encontró que la concentración de sólidos tuvo un efecto positivo sobre estas variables de respuesta, es decir, a mayor concentración se logró un mejor desempeño donde los mejores resultados fueron a 100 g/L. Respecto al TRH, éste tuvo un efecto inverso sobre estas variables, es decir a menor TRH se obtuvo una mayor productividad de H₂ y productividad específica de H₂, por lo que los mejores resultados fueron a 60 h. En suma, el reactor con el mejor desempeño fue aquel alimentado con 100 g/L y con un TRH de 60h (R60-100) que alcanzó los mayores valores de las variables citadas: 482 mL H₂/ (kgd) y 58 mLH₂/ (μgd), respectivamente.

Los resultados obtenidos referentes a la concentración de sustrato, fueron congruentes con los reportados por Islam et al., (2006) en su estudio del efecto de la carga de sustrato sobre la producción de hidrógeno con *Clostridium thermocellum*; donde se encontró que el H₂ producido en sus ensayos, incrementó conforme aumentó la concentración de sustrato (1.1 - 4.5 g/L de celobiosa). De forma similar, Argun y colaboradores (2009) también lograron obtener la máxima acumulación de hidrógeno (135 mL) usando los mayores niveles de sustrato alimentado, correspondiente a 20 g/L de trigo molido.

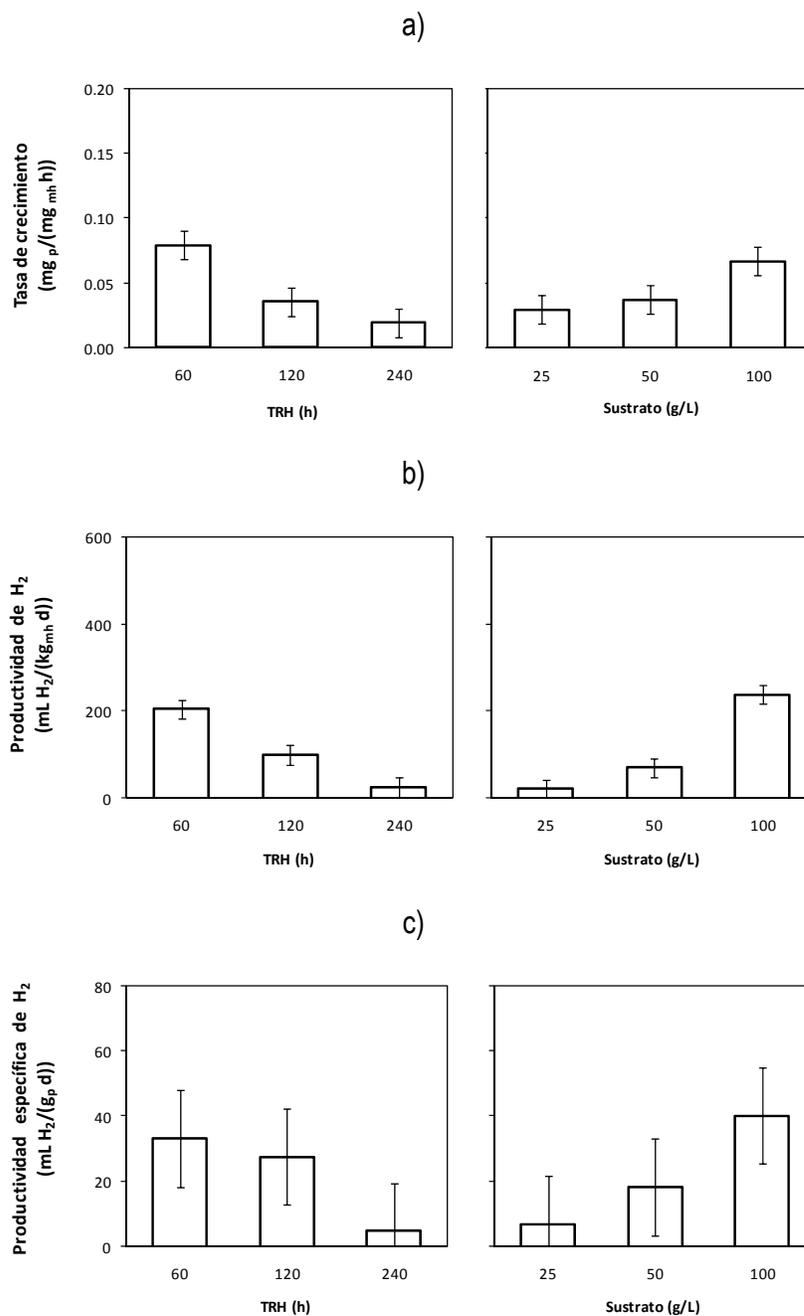


Figura 5. Gráficas de efectos principales del tiempo de retención hidráulica y concentración del sustrato sobre a) tasa de crecimiento, b) productividad de H₂ y c) productividad específica de hidrógeno.

Estudios previos indican que la producción de hidrógeno aumenta hasta un límite determinado por la concentración de sustrato alimentado. Basados en el perfil de rendimiento de H₂ *versus* concentraciones de sustrato (5 - 200 gSV/L) compilado de diversos trabajos independientes; el mayor rendimiento de hidrógeno está asociado a niveles intermedios y bajos de sustrato (50 – 25 gSV/L), mientras que a concentraciones superiores de sustrato se tiene reportado un disminución en el desempeño del proceso (Valdez-Vazquez et al., 2009). Lin et al., (2008) encontró este mismo efecto al usar sustrato simple (almidón) con un inóculo aclimatado a residuos de papel; las concentraciones ensayadas fueron de 5, 10, 20, 30, 40 y 60 g de DQO/L, obteniendo 40, 70, 225, 170, 120 y 95 mL de H₂, respectivamente. Se puede observar de este estudio que niveles superiores a 20 g DQO/L resultaron en un declive de la producción de H₂ atribuida probablemente a inhibición por sustrato y/o inhibición por productos.

Con base en esta amplia gama de estudios, es posible distinguir un aspecto importante relacionado con la concentración y tipo de sustrato alimentado durante la producción de hidrógeno. La utilización de sustratos complejos como los empleados en este trabajo hizo necesario trabajar en un rango de concentración de intermedia a alta (≥ 100 g/L), para lograr los máximos niveles de producción de hidrógeno. Esto puede atribuirse en gran medida a que el sustrato modelo no posee carbohidratos fácilmente asimilables por los microorganismos, ya que sus polímeros estructurales requieren ser hidrolizados antes de su fermentación. Cabe recordar que en este trabajo no se utilizó ningún tipo de pretratamiento químico que incrementara la disponibilidad de carbohidratos, por lo que ésta dependió exclusivamente de la hidrólisis enzimática por parte del inóculo aclimatado. Entonces, el inóculo aclimatado pudo ocasionar un desfase entre los carbohidratos hidrolizados y su posterior fermentación, por lo que a pesar de existir una gran cantidad de carbohidratos, éstos no estuvieron totalmente disponibles pudiendo ocasionar efectos inhibitorios por sustrato. En otras palabras, la velocidad de hidrólisis fue menor o igual que la velocidad de fermentación. En consecuencia, los resultados en este trabajo aún son susceptibles de mejorarse por varias rutas; a) incrementando las capacidades hidrolíticas del inóculo, b) utilizando una mayor concentración de sustrato aunque esto no garantiza que todo sea aprovechado y c) aumentando la disponibilidad de carbohidratos simples mediante un pretratamiento químico al sustrato aunque esto elevaría los costos de producción.

Estos resultados y discusión posibilita *rechazar parcialmente la hipótesis particular para concentración de sustrato* que dice: “Se tendrá una mayor producción de hidrógeno a partir de sustratos complejos ricos en lignocelulosa al incrementar el tiempo de retención hidráulico (TRH) y disminuir la concentración de sustrato”. Es decir, en el rango de concentraciones utilizadas (25 - 100g/L), las mayores productividades de hidrógeno se alcanzaron a la mayor concentración de sustrato (100g/L).

En cuanto al efecto del TRH sobre la productividad de hidrógeno y productividad específica de hidrógeno se observó una respuesta significativa e inversa, es decir, las variables incrementaron conforme se redujo el TRH, obteniéndose los mejores resultados en la serie R60. Esta tendencia, fue contraria a la esperada en un inicio, partiendo del supuesto que serían necesarios altos TRH para lograr una mayor hidrólisis del sustrato lignocelulósico modelo, lo que incrementaría la disponibilidad de carbohidratos fácilmente fermentables y reflejándose finalmente en los niveles máximos de acumulación de H₂. Contrario a esto, nuestros resultados experimentales mostraron que TRH largos no fueron eficientes (reactores de las series R120 y R240), ya que afectaron la capacidad hidrogenogénica de la microflora. Se estima que a éstos TRH se pudo favorecer el crecimiento de microorganismos no deseados que compitieron por el sustrato disponible y afectaron la productividad de hidrógeno.

En estudios realizados con microorganismos productores de hidrógeno alimentados con sustratos simples han encontrado resultados que ayudan a explicar los obtenidos en este trabajo. En el trabajo realizado por Mitchell et al., (2009) con *Clostridium tyrobutyricum*, se encontró que la mayor productividad de H₂ se obtuvo con un TRH de 16.7 h por sobre 12,10 y 8 h. Por otra parte, Cheng et al., (2008) utilizó un consorcio microbiano proveniente de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales para la producción de hidrógeno a partir de melazas; encontró que el máximo rendimiento fue alcanzado a un TRH de 12 h. Fan et al., (2006) también encontró que el máximo rendimiento de hidrógeno se alcanzó a un TRH de 18 h por sobre un rango de 8 – 48 h, utilizando un consorcio microbiano procedente de composta de excreta de vaca alimentado con desechos de una industria cervecera.

Nuestros resultados experimentales y las referencias citadas indican que las mayores productividades de H₂ son alcanzadas a TRH cortos, en este estudio ≤ 60 h. En una revisión hecha por Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo (2009) se encontró para un gran número de estudios

independientes que las mayores productividades de H_2 fueron alcanzadas a TRH entre 5 – 10 h cuando se utilizaron sustratos simples y/o moderadamente complejos. Nuestros resultados son congruentes, a pesar de la utilización de un sustrato más resistente al ataque biológico.

Estos resultados y discusión posibilita *rechazar parcialmente la hipótesis particular para el TRH* que dice: “*Se tendrá una mayor producción de hidrógeno a partir de sustratos complejos ricos en lignocelulosa al incrementar el tiempo de retención hidráulico (TRH) y disminuir la concentración de sustrato*”. Es decir, en el rango de TRH entre 60 – 240 h, las mayores productividades de hidrógeno se alcanzaron al menor TRH (60 h).

VII.IV.III Consumo de sustrato

El sustrato consumido se asocia a la producción de energía dirigida tanto al mantenimiento y crecimiento celular como a la formación de los productos de fermentación (hidrógeno o etanol y ácidos orgánicos). El estudio de consumo de sustrato fue realizado a través de los ensayos de fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) por comparación entre el sustrato fresco y de las purgas. Estos resultados sirvieron para calcular en cada uno de los reactores la velocidad de remoción de la carga orgánica inicial (VCO_0) y consumida (VCO_c), tanto de hemicelulosa y celulosa. La fracción de lignina se consideró constante ya que es recalcitrante al ataque biológico por los microorganismos presentes. Estos datos fueron sujetos de un ANOVA para encontrar el efecto de las variables estudiadas sobre el consumo de estos dos tipos de sustrato (hemicelulosa y celulosa).

La Figura 6 muestra el efecto de la concentración de sustrato (expresado como velocidad de carga orgánica inicial, VCO_0) y el TRH sobre la remoción de sustrato (expresada como velocidad de carga orgánica consumida, VCO_c). Puede observarse que la VCO_0 tuvo un efecto positivo sobre la VCO_c , es decir, a mayor velocidad de alimentación hubo una mayor velocidad de remoción, dando como resultado que los reactores con la mayor remoción fueron aquellos alimentados con 100 g/L (Figura 6, izquierda). También puede observarse que el mayor carbohidrato consumido fue la celulosa por sobre la hemicelulosa. Respecto al TRH, se observó un efecto significativo e inverso sobre la VCO_c , donde a menores TRHs incrementó la velocidad de remoción siendo dos veces mayor para celulosa.

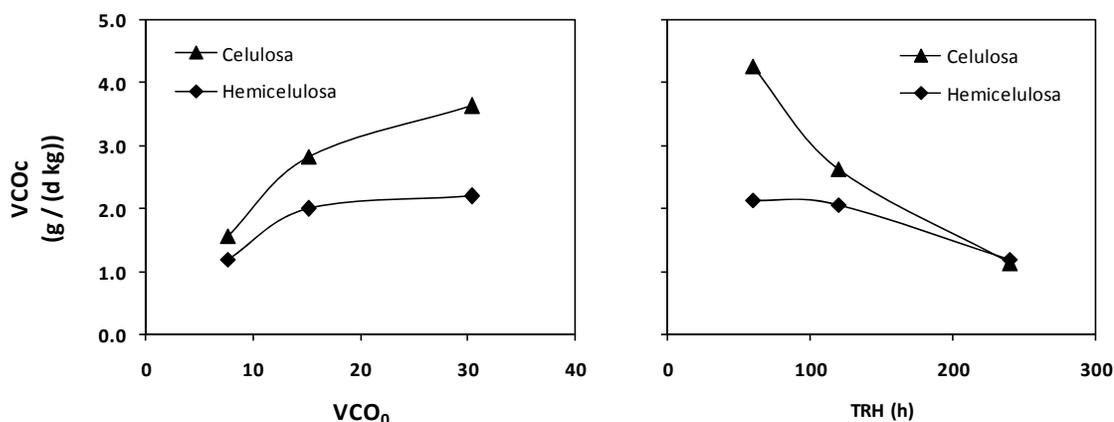


Figura 6. Efecto de la concentración de sustrato (carga orgánica inicial, CO_0) y el TRH sobre la remoción de sustrato (velocidad de carga orgánica consumida, VCO_c).

Al comparar la velocidad de remoción de estos dos carbohidratos analizados, se observó que hubo un mayor aprovechamiento de celulosa que de la hemicelulosa. Esta misma tendencia se ha observado principalmente en las mejores condiciones de remoción en una gran variedad de estudios nutricionales en donde hacen uso de la flora microbiana presente en rumiantes *in situ* o *in vitro* para analizar la calidad nutricional de alimentos con alto contenido de fibra tal como: residuos de maíz, cascarilla de arroz, paja de avena, etc. En ellos se ha visto que los microorganismos de la flora ruminal tienen mayor consumo o digestibilidad de los carbohidratos contenidos en la FDA correspondiente a la celulosa, mientras que el consumo de la hemicelulosa en la FDN, es claramente inferior (Cruz-Bacab; et al. 2006, Gallardo; et al 2010, Sewalt; et al. 1996, Yescas; et al. 2004). Esto podría estar asociado a que en la estructura compleja de la lignocelulosa, se pueden encontrar dos tipos de celulosa, la cristalina y la amorfa, siendo la segunda mayormente susceptible a la hidrólisis microbiana (Cuervo, et al. 2001). Por otra parte, la hemicelulosa está fuertemente asociada a las unidades de lignina a través de dobles enlace, lo que podría dificultar su disponibilidad a los microorganismos. Esto provocaría que el consorcio microbiano pudiera consumir en primera instancia los azúcares de la celulosa amorfa que resulta fácilmente disponible, al tiempo que se secretan las enzimas necesarias para hidrolizar a la matriz lignocelulósica para lograr acceder a los carbohidratos tanto de la hemicelulosa unida a la lignina como a los carbohidratos de la celulosa cristalina y de esta manera aprovechar al máximo su fuente de carbono.

VII.IV.IV Acumulación de ácidos orgánicos

La generación de hidrógeno siempre va acompañado de co-productos como ácidos orgánicos, donde el acetato y butirato son indicativos de una fermentación acidogénica con altos rendimientos de hidrógeno (Hawkes et al., 2002; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Por ello, se monitoreó durante todo el tiempo de operación de los reactores la acumulación de estos dos ácidos orgánicos.

En la Figura 7 se muestra la acumulación promedio de ácido acético y butírico obtenida de las dinámicas de producción de cada reactor. En lo general, se observa que la concentración de sólidos y el TRH no tuvieron un efecto significativo sobre la acumulación de ácido acético ($p > 0.05$). Sin embargo, se encontró que en los R60, la concentración de sustrato tuvo un efecto positivo y altamente significativo sobre la acumulación de acetato ($p < 0.001$), obteniendo un máximo de

23g/kg_{mh} para el R60-100 (Figura 7a). Para ácido butírico, se encontró que en promedio los dos factores estudiados tuvieron un efecto altamente significativo sobre esta variable ($p < 0.001$), teniendo una relación directa para concentración de sustrato e inversa para TRH. En otras palabras, la mayor acumulación de butirato se alcanzó a mayor concentración de sustrato y menor TRH, teniendo un máximo de 18 g/kg_{mh} en el R60-100.

Las tendencias encontradas para la acumulación de ácidos orgánicos fueron congruentes con la producción de hidrógeno; según la estequiometría teórica se generan 2 mol de H₂ por mol de acetato acumulado y 2 moles de H₂ por cada mol de butirato acumulado a partir de 1 mol de glucosa. Por tanto, se esperaba una mayor acumulación de estos ácidos orgánicos en los reactores con mayores productividades de hidrógeno, siguiendo el mismo comportamiento de los factores estudiados. Nuestros resultados están soportados por la literatura, donde Mitchel et al., (2009) encontró la misma relación positiva entre el sustrato alimentado y la acumulación de ácidos, tanto para acetato como butirato. En aquel estudio la máxima producción de ácidos se encontró a 50 g/L de glucosa (en un rango de 10 – 50 g/L). En cuanto al TRH, Mitchell y colaboradores también observaron una relación positiva con la acumulación de ácidos en un rango entre 8 – 12 h, ya que a TRH superiores (17 h) la producción de ácidos disminuyó. Este mismo comportamiento fue observado a TRH altos, en la serie de reactores R120 y R240 (Figura 7).

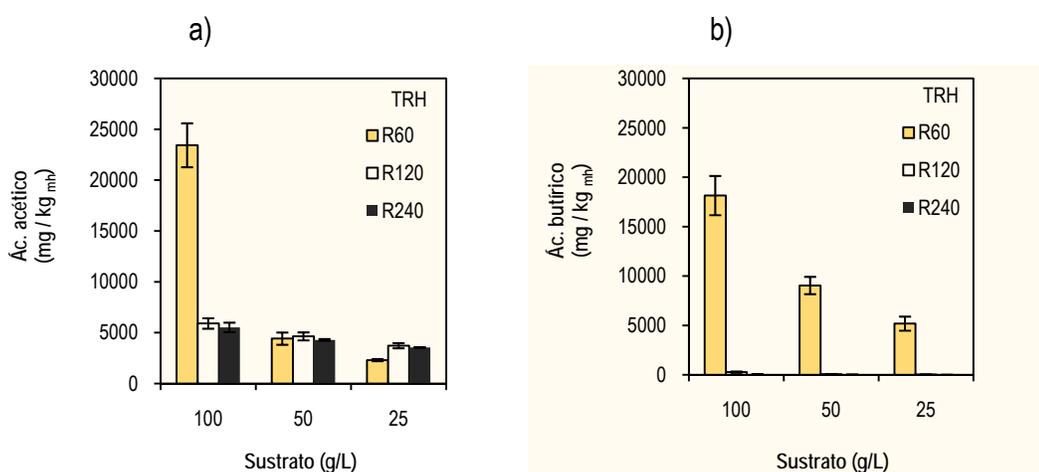


Figura 7. Acumulación promedio de a) ácido acético y b) ácido butírico en los reactores acidogénicos.

En general, se observó que hubo mayor acumulación de acetato que de butirato; en la serie R120 los niveles de ambos ácidos fueron equiparables mientras que para los R120 y R240 la acumulación de acetato fue claramente mayor. Debido a que la acumulación de butirato está relacionada con altos rendimientos de H₂, estos resultados confirman que a TRH de 120 y 240 h no se vio favorecido el desarrollo de microorganismos hidrogenogénicos (Kapdan y Kargi, 2006; Hawkes et al., 2002). Por otra parte, también se encontró que altas concentraciones de sólidos alimentados, favoreció mayores acumulaciones de acetato y butirato.

VII.V Reactores solventogénicos para la producción de etanol

Para el desarrollo de esta actividad se operaron fermentadores en fase solventogénica durante 22 días, a un TRH de 120 h y dos concentraciones de sustrato: 50 y 80 g/L (RS120-50 y RS120-80, respectivamente). El sustrato alimentado fue aquel recuperado de las purgas de los reactores en fase acidogénica, el cual fue previamente lavado y secado. La fermentación solventogénica fue establecida mediante el control del pH en un rango entre 4.5 - 5.5 con un amortiguador de fosfatos pH 5.5.

VII.V.I Desempeño de los reactores

La Tabla XII muestra los resultados experimentales obtenidos de la operación de los fermentadores solventogénicos, RS120-80 y RS120-50. Un parámetro de seguimiento fue la acumulación de biogás, ya que la generación de etanol vía anaerobia está directamente relacionada con la formación de CO₂, según la ecuación:



La dinámica de producción de biogás en los RS120-50 y RS120-80 se mantuvo a niveles bajos (115 y 166 mL / kg_{mh} d, respectivamente) observando un máximo de producción entre los 15 y 20 días de operación de los puntos seleccionados para la cuantificación. Estos máximos de biogás estuvieron relacionados directamente con el pH, donde los mejores resultados se lograron entre 4.5 - 5.2. Por otro lado, la producción de etanol fue monitoreada de forma cualitativa durante todo el tiempo de operación encontrando resultados favorables después del día 5 de operación. La determinación cuantitativa sólo se realizó con dos puntos para cada reactor encontrando que el RS120-80 produjo 86% más etanol que el RS120-50 (Tabla XII).

Tabla XII. Resultados experimentales promedio para los reactores solventogénicos.

Clave	TRH (h)	Conc. de sustrato (g/L)	Máxima producción de biogás (mL/d kg _{mh})	pH	Etanol (mg/L)
RS120-80	120	80	900	4.9 ±0.65	9,100 ±778
RS120-50	120	50	532	4.6 ±0.74	4,880 ±424

VII.VI Proceso de fermentación en dos etapas

A pesar del corto tiempo en que fueron operados los fermentadores solventogénicos, se logró establecer una producción alcohólica a partir de un sustrato previamente fermentado. De esta forma, se manifiesta la factibilidad de un proceso de fermentación en dos etapas para la producción de hidrógeno y etanol a partir de un sustrato lignocelulósico. En la literatura, se reportan cada vez más trabajos enfocados a estudiar la producción de uno o más biocombustibles en procesos en dos etapas. Como puede verse en la Tabla XIII, hay una gran variedad de trabajos dirigidos a la producción de biocombustibles en dos o más etapas, usualmente con el empleo de sustratos lignocelulósicos. La estructura compleja de este tipo de sustrato dificulta el acceso de los microorganismos a los carbohidratos simples, por lo que es necesaria realizar una hidrólisis del sustrato previa a la fermentación. Tanto la hidrólisis química como biológica no liberan completamente los azúcares provenientes de la celulosa/hemicelulosa, lo que tiene como consecuencia que el rendimiento del proceso disminuya. Sin embargo, una alternativa para mejorar dicho rendimiento es re-utilizando el sustrato gastado en una segunda fase de producción donde nuevos microorganismos consumirán los carbohidratos remanentes.

El trabajo reportado por Pan et al. (2009), es el único además del presente trabajo en donde se ha buscado producir etanol e hidrógeno en dos etapas a partir de residuos de maíz. Ellos produjeron inicialmente etanol con residuos frescos de maíz pretratados enzimáticamente para posteriormente fermentar los carbohidratos simples con un inóculo axénico de *Pachysolen tannophilus*. En una segunda etapa, produjeron hidrógeno con la fermentación de residuos de maíz de la corriente de salida de la primera etapa y un inóculo mixto proveniente de excreta de ganado. Las variables independientes estudiadas fueron temperatura, concentración enzimática y tiempo de

hidrólisis. A pesar de las similitudes, este trabajo tuvo diferencias contrastantes al reportado por Pan y colaboradores. Por una parte, los residuos de maíz fueron utilizados secos y sin pretratamientos químicos/enzimáticos, por lo que se utilizó un consorcio microbiano previamente aclimatado a este sustrato. Por otra parte, se utilizó el mismo inóculo para ambas etapas de fermentación modulando la ruta metabólica hacia acidogénesis o solventogénesis mediante la modulación del pH.

Tabla XIII. Estudios de fermentación en dos etapas para la producción de biocombustibles.

Sustrato	PRIMERA ETAPA		SEGUNDA ETAPA		Referencia
	Proceso	Combustible producido	Proceso	Combustible producido	
Sacarosa Mazorca (maíz)	Fermentación	H ₂	Foto-fermentación	H ₂	Chen, et al., 2008 Yang, et al., 2010
Residuos de comida	Fermentación	H ₂	Digestión	CH ₄	Chu, et al., 2008:
Celulosa Sacarosa	Fermentación	H ₂ H ₂ /etanol	Celda microbiana	H ₂	Lalaurette, et al., 2009 Lu, et al 2009
Tallos de trigo Residuos de trigo Residuos de maíz	Fermentación	etanol	Fermentación	H ₂	Maas, et al., 2008 ^a Kaparaju, et al., 2009 Pan, et al., 2009
Residuos de trigo Sorgo dulce Suero de leche	Fermentación	etanol	Digestión	CH ₄	Bauer, et al., 2009 Antonopoulou, et al., 2008 Venetsaneas, et al 2009
Glicerol	Fermentación	H ₂	Fermentación	etanol	Hu y Wood, 2010
Residuos de maíz	Fermentación acidogénica	H ₂	Fermentación solventogénica	etanol	ESTE TRABAJO

Notas: ^a en este trabajo se emplea una tercera etapa de digestión para la producción de metano.

Para determinar el total de energía recuperada en el proceso global se calcularon los rendimientos de hidrógeno y etanol para la fermentación acidogénica y solventogénica, respectivamente. Para ello se dividió la productividad de hidrógeno o etanol entre los sólidos volátiles totales alimentados (en base seca) y luego se multiplicó por el TRH. En la Tabla XIV se muestran los rendimientos en las fases acidogénicas y solventogénicas, por reactor y el máximo. El rendimiento máximo en la etapa acidogénica se encontró en el R60-100 con un total de 14.71 mL H₂/g_{SVT} (0.72 mmol/g_{base seca}) y el rendimiento promedio en la etapa solventogénica en el R120-80 fue de 104.4 mg EtOH/g_{SVT} (2.26 mmol/g_{base seca}). Los rendimientos reportados por Pan et al. (2008) fueron de 234.1 mg EtOH/g_{SVT} (4.5 mmol/g_{base seca}) y 66.9 mL H₂/g_{SVT} (2.62 mmol/g_{base seca}).

Tabla XIV. Rendimientos de H₂ y etanol en reactores acidogénicos y solventogénicos, respectivamente.

		Fermentación Acidogénica			Rendimiento máximo	
		Hidrógeno (mL / g _{SVT})			por serie	
Rendimientos por reactor	R	25	50	100		1ª etapa
	60	3.63	6.24	14.71	14.71 mL/g _{SVT}	
	120	7.15	12.20	10.27	12.20 mL/g _{SVT}	
	240	2.11	1.78	7.89	7.89 mL/g _{SVT}	
		Fermentación Solventogénica				2ª etapa
		Etanol (mg / g _{SVT})				
R	50	80				
	120	89.27	104.4		104.4 mg/g _{SVT}	

Para obtener la cantidad de energía recuperada se utilizó el valor de combustión del hidrógeno (285.8KJ/mol), etanol (1367.88KJ/mol) y de los residuos de maíz (13.458KJ/g). Para ello, se utilizó el máximo rendimiento de hidrógeno, mientras que el rendimiento etanol utilizado fue aquel calculado para el periodo cuasi-estable (no el máximo). Para la comparación de rendimientos de hidrógeno entre estudios, los resultados se normalizaron a 1 atm. La energía recuperada se calculó con la siguiente ecuación (Pan, et al., 2008):

$$E_{recuperada} = \frac{[mol H_2 \times valor de combustión] + [mol EtOH \times valor de combustión]}{[calor de combustión_{sustrato}} \times 100\% \quad [9]$$

Así, la energía global recuperada en este trabajo fue del 24.64% principalmente debida a la segunda etapa de obtención de etanol. La energía recuperada en las dos etapas de fermentación fue superior a la reportada para estudios de producción de biocombustibles en una sólo etapa utilizando sustratos complejos aún cuando se utiliza un pretratamiento (Datar et al. 2007, Kyazze et al. 2008, Wang et al. 2008, Liu et al. 2008). El porcentaje de energía recuperada en el trabajo de Pan et al. (2008) fue del 51.3%, lo que se atribuye a un mayor procesamiento del sustrato por el uso de enzimas de hongos que aumentan considerablemente la disponibilidad de azúcares simples. Es por ello, que de calcularse un rendimiento que incorpore la cantidad de energía e insumos utilizados, los resultados de este trabajo pudieran ser comparables o inclusive ligeramente superiores a los reportados por Pan y colaboradores. Además, los resultados presentados aquí aún son susceptibles de ser mejorados mediante la incorporación de las recomendaciones hechas para el TRH y la concentración de sustrato.

Estos resultados y discusión posibilita *aceptar la hipótesis principal* que dice: *“Un proceso de fermentación en dos etapas para la producción de hidrogeno y etanol, incrementará la energía total recuperada por unidad de sustrato”*. Es decir, en suma la energía recuperada fue de 3.3 kJ/g_{sustrato} que corresponde principalmente a la etapa de producción de etanol del proceso en dos etapas.

FASE III

VII.VII Actividades enzimáticas

En esta última fase del trabajo se determinó la actividad de dos enzimas importantes para la degradación de sustratos complejos con alto contenido de lignocelulosa: celulasas y xilanasas, secretadas por el consorcio microbiano tanto en reactores de fase acidogénica como de fase solventogénica. Para ello, se aisló y cuantificó la proteína soluble presente en los reactores para determinar la actividad celulasa o xilanasas a través de la hidrólisis de polímeros, seguido de la determinación de los azúcares liberados. La actividad específica de las enzimas se obtuvo dividiendo la cantidad de glucosa liberada entre la cantidad de proteína soluble total.

El ANOVA realizado a la actividad específica de cada una de las enzimas mostró que no hubo un efecto significativo ($p > 0.05$) para el TRH y concentración de sustrato sobre esta variable de respuesta en ambas enzimas. Sin embargo, se observa claramente en la Figura 8 (lado derecho), que hubo una mayor actividad de xilanasas que de celulasas, mientras que las primeras alcanzaron niveles máximos de 10.4 mUI de actividad específica (correspondiente al promedio del R120-50), las segundas lograron un nivel máximo de 3.7 mUI (correspondiente al promedio del R120-25). Por otra parte, en el análisis general del ensayo, se observó una mayor actividad xilanasas conforme incrementó la concentración de sustrato, mientras que la actividad celulasa se mantuvo relativamente constante: Para el caso del TRH, se observó mayor actividad xilanólítica a un TEH de 120 h y menor actividad a un TRH de 240 y 60 h, la actividad celulasa nuevamente se mantuvo relativamente constante.

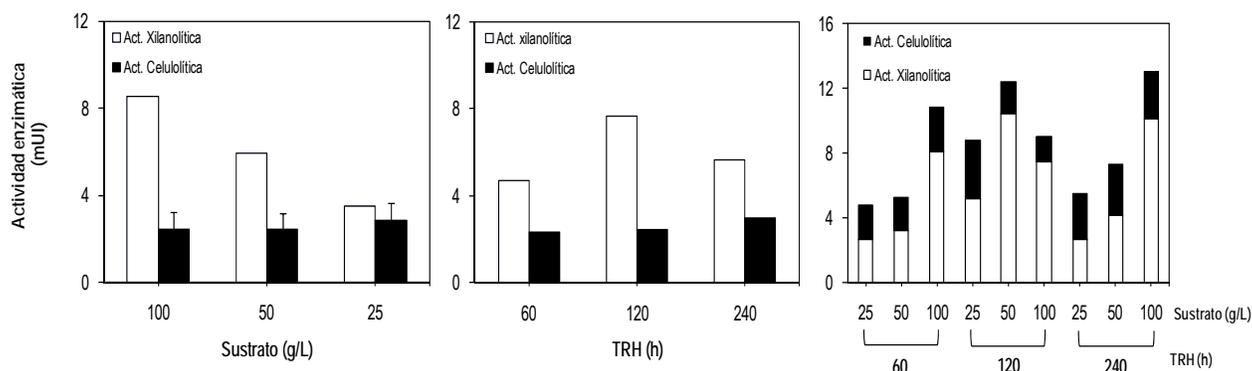


Figura 8. Gráficas de efectos principales del tiempo de retención hidráulico y concentración del sustrato sobre la actividad xilanólítica y celulolítica.

A pesar de encontrar una mayor actividad de xilanasas, se observó un mayor consumo de celulosa que de hemicelulosa. Esto podría estar asociado a la estructura y disponibilidad de los carbohidratos que cada enzima tiene como blanco. Por una parte la celulosa es un polisacárido lineal formado por cadenas de residuos de glucosa unidos por enlaces β 1-4. Luego, estas cadenas lineales de celulosa interaccionan entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas. Sin embargo, en algunas zonas de las cadenas lineales se rompen los puentes de hidrógeno y forman regiones amorfas que permiten su hidratación y accesibilidad a las celulasas (Majía-Castillo, et al., 2002). Por lo que este pudo ser el primer sustrato en consumirse a consecuencia de un menor requerimiento de celulasas y la implicación de un menor gasto energético, sin embargo luego de consumir este sustrato pudo ser necesario la hidrólisis de la hemicelulosa, que al igual que la lignina se ubica impidiendo el paso a la celulosa que conforma las microfibrillas. La asociación de la hemicelulosa con la lignina dificulta la hidrólisis de este carbohidrato, por lo que las xilanasas pudieron ser sintetizadas en exceso por los microorganismos del consorcio para asegurar la eficiencia del proceso hidrolítico y por tanto el carbohidrato consumido después de la celulosa.

VIII. Conclusiones

La caracterización de los residuos de maíz, mostró que el contenido de hemicelulosa y celulosa estuvo entre el 65 – 70%, los cuales son aprovechables para su fermentación.

El TRH y la concentración de sustrato tuvieron un efecto estadísticamente significativo con tendencias semejantes sobre la productividad de H₂ y productividad específica de H₂ ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente).

Se encontró que el efecto de la concentración de sustrato sobre estas variables de respuesta fue positivo, es decir, a mayor concentración se logró un mejor desempeño donde los mejores resultados fueron a 100 g/L.

Respecto al TRH, éste tuvo un efecto inverso sobre éstas variables de respuesta, es decir al disminuir el TRH se obtuvo una mayor productividad de H₂ y productividad específica de H₂, por lo que los mejores resultados fueron a un TRH de 60 h.

En suma, el reactor con el mejor desempeño fue aquel alimentado con 100 g/L y operado a un TRH de 60 h donde se alcanzó el mayor valor de productividad de hidrógeno (482 mL/(kgd)) y productividad específica de hidrógeno (58 mL/(μ gd)).

La velocidad de carga orgánica inicial tuvo un efecto positivo sobre la velocidad de remoción, mientras que el TRH tuvo un efecto inverso. El mayor consumo de carbohidratos se registró en el reactor R60-100 con 2.2 g/(kg*d) de hemicelulosa y 5.5 g/(kg*d) de celulosa. A pesar de que la actividad xilanolítica fue mayor que la celulolítica.

Se comprobó que fue posible continuar la biotransformación del sustrato residual obtenido de los reactores acidogénicos, para la producción de etanol en una segunda etapa de fermentación de tipo solventogénica. Se alcanzó una producción máxima de 104 mg etanol/gSV en reactores alimentados con 80 g/L de sustrato recuperado y operados a un TRH de 120 h.

Con un proceso en dos etapas de fermentación, se encontró que la energía recuperada total (hidrógeno y etanol) por sustrato alimentado fue del 24.64 % es decir, en suma la energía recuperada fue de 3.3 kJ/g_{sustrato}.

IX. Referencias

- Acevedo Benítez, J.A. 2008. Producción de hidrógeno con un cultivo mixto de microorganismos fotoheterótrofos, a partir de lixiviados acidogénicos. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV México, DF.
- Ahring, K.B., y Westermann, P., et al. 2007. Coproduction of Bioethanol with Other Biofuels. *Adv Biochem Engin / Biotech.* 108:289-302.
- Antoni, D., Zverlov, V.V. y Schwarz, W.H., 2007. Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(1):23-35.
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K. y Lyberatos, G. 2008. Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresour Technol* 99(1):110-9.
- APHA. (2005). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.* American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. 21 edición. Washington DC, U.S.A. 1369pp.
- Bauer, A., Bösch, P., Friedl, A. y Amon, T. 2009 Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *J Biotechnol* 142(1):50-5.
- BBC. 2007. La solución Latinoamericana. www.bbcmundo.com. 23/enero/07
- Bogner, J., Pipatti, R., Hashimoto, S., Diaz, C., Mareckova, K., Diaz, L., Kjeldsen, P., Monni, S., Faaij, A., Gao, Q., Zhang, T., Ahmed, M.A., Sutamihardja, R.T. y Gregory, R. 2008. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Working Group III, Mitigation of global greenhouse gas emissions from waste: conclusions and strategies from the Intergovernmental Panel on Climate Change Fourth Assessment Report. *Waste Manag Res.* 26(1):11-32.
- Castells, E. 2005. *Tratamiento y valorización energética de residuos.* Editorial Diaz de Santos y Fundación Universitaria Iberoamericana. 1ª Edición. España. 1228 pp.
- Cortez-Jimenez, J.M. 2009. Aplicaciones agronómicas y ambientales de la quema de paja de trigo en el valle del Yaqui, Sonora. XII Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas y Simposium en Agricultura Sustentable. 29 y 30 de Octubre.
- Criquet, S. 2002. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. *Journal of Microbiological Methods.* 50 (2):165-173.

- Cruz-Bacab, L., Franco-Sarmiento, L., Acosta-Torres, F., Ku-Canul, H. y Ricalde-Santos, R. 2006. Alimentación de ovinos con cama a base de esquilmos agrícolas utilizada en la engorda de cerdos. *Livestock Research for Rural Development*. 18 (167). Disponible en línea <http://www.lrrd.org/lrrd18/12/cruz18167.htm>
- Cuervo, L., Folch, J.L. y Quiroz, R.E. 2009. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *Biotecnología*. 13 (3): 11-26.
- Chaudhry, N. 2008. Designing Microbial Consortium for Ethanol Production from Sugarcane Bagasse. Tesis postdoctoral, Universidad de Punjab, Lahore.
- Chen, C.C., Lin, C.Y. y Chang J.S. 2001. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:56-64.
- Chen, J.J., Wu, H.J. Wen F.S., Hung K.Y., Chen Y.T., Hsiao C.L., Lin C.Y. y Huang C.C. 2008. Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(5):1579-1585
- Chen, C.Y., Yang, M.H., Yeh, K.L., Liu, C.H. y Chang, J.S. 2008. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *Int J Hydrogen Energy*. 33: 4755-4762.
- Chu, C.F., Li, Y.Y., Xu, K.Q., Ebie, Y. e Inamori Y. 2008. A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *Int J Hydrogen Energy*. 33: 4739-4764.
- Chu, C., Ebie, Y., Inamori, Y. y Kong, H. 2009. Effect of hydraulic retention time on the hydrogen yield and population of *Clostridium* in hydrogen fermentation of glucose. *J Environ Sci*. 21(4):424-8.
- Dashtban, M., Schraft, H. y Qin, W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int J Biol Sci* 5(6):578-595.
- Datar, R., Huang, J., Maness, P.C., Mohagheghi, A., Czernik, S. y Chornet, E. 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam explosion process. *Int J. Hydrogen Energy*. 32: 932-939.
- Dien, B.S., Cotta, M.A. y Jeffries, T.W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:258-266
- Fadel, E.A., NOR, E.N. y Amasaib E.O. 2007. Chemical composition and in situ dry matter degradability of stover fractions of five sorghum varieties. *J. Appl. Sci. Res.*, 3(10):1141-1145.

- Gallardo, I., Bárcena, R., Pinos-Rodríguez, J.M., Cobos, M., Carreón, L. y Ortega, M.E. 2010. Influence of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* and *in sacco* degradation of forages for ruminants. *Italian Journal of Animal Science*, 9 (1): en línea <http://ijas.pagepress.org/index.php/ijas/article/viewArticle/ijas.2010.e8/1254>.
- Goering, H.K. y Van Soest. P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). USDA Agricultural Research Service. Handbook number 397 modificado por D.R. Mertens.
- González-Muñoz, S.S. s/a. Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado. SAGARPA Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. Disponible en línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento%20de%20esquilmos.pdf>
- Gray, K.A. y Zhao, L., Emptage M. 2006. *Bioethanol. Curr Opin Chem Biol* 10:141-146.
- Guarnizo, F.A., Martínez, Y.P.N. y Valencia, S.H.A. 2009. Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et Technica* 15(42): 284-289.
- Hahn, H.B., Karkuma, K., Fonseca, C., Spencer, M.I. y Gorwa, G.M.F. 2006. Toward INDUSTRIAL PENTOSE-FERMENTING YEAST STRAIN. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74:937-953.
- Hallenbeck, P.C. y Benemann, J.R. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J of Hydrogen Energy*, 27, 1185–1193.
- Hankamer, B., Lehr, F., Rupprecht, J., H. Mussnug J., Posten C., y Kruse O. 2007. Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiologia Plantarum* 131: 10–21
- Hawkes, F.R. Dinsdale, R., Hawkes, D.L. 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int. J. Hydrogen Energ.* 27, 1339-1347.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. y Tiffany, D., 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 11206–11210.
- Hon, N.K. 2006. A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. *Appl Biochem Biotechnol.* Mar;131(1-3):808-28.
- Hu, H. y Wood, T.K. 2010. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1):1033-8.

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2007. Preguntas y Respuestas más comunes sobre biocombustibles. IICA - San José, Costa Rica: IICA, 2007. 24 pp.
- Intergovernmental Panel on Climate change (IPCC), 2007: Climate Change 2007: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Parry, Martin L., Canziani, Osvaldo F., Palutikof, Jean P., van der Linden, Paul J., y Hanson, Clair E. (editores)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1000 pp.
- Islam, R., Cicek, N., Sparling, R. y Levin, D. 2006. Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72(3):576-83.
- Jianlong, W. y Wei W. 2008. Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. *Bioresource Technology.* May 29.
- Jones, D.T. y Woods, D.R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50: 484-524.
- Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P. y Angelidak, I. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresour Technol* 100(9):2562-8.
- Kapdan, I.K. y Kargi, F. 2006. Bio-hydrogen production by waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569-582.
- Kawagoshi Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S. y Furukawa, K. 2005. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *J Biosci Bioeng* 100(5):524-530.
- Keller, CF. 2007. Global warming 2007. An update to global warming: the balance of evidence and its policy implications. *Scientific World Journal* 9(7):381-99
- Kim, H., Kim, S.H. y Shin, S.H. 2009. Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzym Microb Tech* 45(3):181-187.
- Kublanov, I.V., Prokofeva, M.I., Kostrikina, N.A., Kolganova, T.V., Tourova, T.P., Wiegel, J. y Bonch-Osmolovskaya, B.A. 2007. *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 260-264.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Guwy, A.J., Premier G.C. y Donnison, I.S. 2008. Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora. *Bioresur Technol.* 543-549.

- Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P.C. y Logan B.E. 2009. Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy*. 34:6201-6210
- Li, Y., Zhu, J., Wu, X., Miller, C. y Wang, L. 2010. The effect of pH on continuous biohydrogen production from swine wastewater supplemented with glucose. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Lin, Y. y Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:627-642.
- Liu, Y., Yu, P., Song, X. y Qu, Y. 2008 Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(12):2927-2933
- Lu, L., Ren, N., Xing, D. y Logan BE. 2009. Hydrogen production with effluent from an ethanol-H₂-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. *Biosens Bioelectron* 24(10):3055-60.
- Maas, R.H., Bakker, R.R., Boersma, A.R., Bisschops, I., Pels, J.R., De Jong, E., Weusthuis, R.A. y Reith, H. 2008. Pilot-scale conversion of lime-treated wheat straw into bioethanol: quality assessment of bioethanol and valorization of side streams by anaerobic digestion and combustion. *Biotechnol. Biofuels*. 1-14.
- Magrí, A.D., Magrí, A.L., Balestrieri, F., Sacchini, A. y Marini, D. 1997. Spectrophotometric micro-method for the determination of ethanol in commercial beverages. *Fresenius J Anal Chem* 357:985-988.
- Majía-Castillo, T., Mújica-Lengua, F., González-Robles A. y Ortega-López, J. 2002. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. AVANCE Y PERSPECTIVA-CINVESTAV. Disponible en línea: <http://eclipse.red.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/sepoct02/PROTEINAS.PDF>
- Maki, M., Tin, L.K. y Qin, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci* 5(5):500-516.
- Masera, O., Aguillón y Gamino, B. 2005. Estimación del Recurso y Prospectiva Tecnológica de la Biomasa Como Energético Renovable en México. SENER. Disponible en línea: http://www.sener.gob.mx/webSener/res/168/A2_Biomasa.pdf
- Mertens, D.R. 1992 Critical conditions in determining detergent fiber. *Proceedings of NFTA Forage Analysis Workshop*. Denver, Co. p C1-C8.
- Mitchell, R.J. Kim, J.S., Jeon, B.S., Sang, B.I. 2009. Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: effects of the glucose concentration and hydraulic retention time. *Bioresour Technol*. 100(21):5352-5.

- Montgomery, D.C. 2002. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2da. D.F.: Limusa S.A. de C.V.
- Morán, I.J., Alvarez, A.V., Cyras, P.V. y Vázquez, A. 2008. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose* 15(1):149-159.
- Murarka, A., Dharmadi, Y., Shams, Y.S., y Gonzalez, R. 2008. Utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl Environ Microbiol.* 74(4): 1124–1135
- NMX-AA-034-SCFI-2001. Norma Mexicana de Análisis de Agua - Determinación de Sólidos y Sales Disueltas en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas
- Obst, M., Krug, A., Luftmann, H y Steinbüchel A. 2005. Degradation of cyanophycin by *Sedimentibacter hongkongensis* strain ki and *Citrobacter amalonaticus* strain g isolated from an anaerobic bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol.* 71(7): 3642–3652.
- Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15a Edición. Inc. Arlington, Estados Unidos de America. 1440pp.
- Olofsson, K., Bertilsson, M. y Lidén, G. 2008. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstock. *Biotechnol Biofuels* 1:7.
- Pakarinen, O., Lehtomäki, A. y Rintala J. 2008. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *Int J Hydrogen Energy* 33(2):594-601.
- Pan, C., Zhang, M., Fan Y., Xing, Y. y Hou, H. 2009. Production of cellulosic ethanol and hydrogen from solid-state enzymatic treated cornstalk: a two-stage process. *J. Agric. Food Chem.* 57 (7):2732–2738
- Perttu, E.P.K., Steinar, R.B., Jóhann, Ö. y Jaakko, A. 2008. Ethanol and hydrogen production by two thermophilic, anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas. *Biotechnol Bioeng.* Apr 23
- Poggi-Varaldo H.M. y Rinderknecht, N., 1990 *Mini-handbook of solid waste analysis*. CINVESTAV del IPN, Mexico DF.
- Poggi-Varaldo, H.M., Valdéz-Ledezma, L., Fernández-Villagómez, G. y Esparza, F. 1997. Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids and municipal solid waste. *Water Sci Technol* 35(2–3):197 – 204.
- Puri, P.V. 1983. Ozone pretreatment to increase digestibility of lignocelluloses. *Biotechnol Lett* 5(11): 773-776.

- Quintero-Montero, M. y Moncada-Aguilar A. 2008. Contaminación y control de las quemas agrícolas en Imperial, California, y Mexicali, Baja California. *Región y Sociedad*. 20 (43): 3-24.
- Ramos, C.P., 2008. Energías y cambio climático: XII jornadas ambientales. 1ª Edición, editorial Salamanca, España, 128pp.
- Rittman, B. 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotech Bioeng* 100(2);203-212.
- Romero-Rodriguez, M.A., Vazquez-Oderiz, M.L., Lopez-Hernandez, J. y Simal-Lozano J. 1992. Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. *J. Chromatogr Sci*. 30 (11):433-7.
- Sánchez, O.J. y Cardona, A.C. 2007. Trends in biotechnology production of fuel ethanol from different feedstocks. *Biores Technol* 99:5270-5295.
- Saratale, D.G., Shing, D.C., Yung, C.L., Rijuta, G.S. y Jo, S.C. 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation. *J Sci Ind Res*. 67:962-979.
- Sewalt, V.J.H., Fontenot, J.P., Allen, V.G. y Glasser, W.G. 1996. Fiber Composition and in Vitro Digestibility of Corn Stover Fractions in Response to Ammonia Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (10): 3136-3142
- Solorza, Omar. 2007. Hidrógeno y Celdas de Combustible. Red latinoamericana de Química. <http://www.relaq.mx/RLQ/h2.html>
- Taherzadeh, M.J. y Karimi, K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int J Mol Sci* 9:1621-1651.
- Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M.K., Maness, P., Kroposki, B., Ghirardi, M., Evans, R.J. y Blake, D. 2008, Renewable hydrogen production, *Int. J. Energy Res*. 32(5):379-407
- Valdez-Vazquez I. 2007. Caracterización bioquímica y microbiológica de sistemas en lote y semi-continuo para la producción de H₂ vía fermentativa de residuos sólidos orgánicos. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV México, DF.
- Valdez-Vazquez I., Ríos-Leal, E., Muñoz-Páez K.M., Carmona-Martínez A. y Poggi-Varaldo H.M. 2006a. Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ Sci Technol* 40(10):3409-3415.
- Valdez-Vazquez I., Ríos-Leal, E., Muñoz-Páez K.M., Carmona-Martínez A. y Poggi-Varaldo H.M. 2006b. Effect of inhibition treatment, type of inocula and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotech Bioeng* 95(3):342-349.

- Valdez-Vazquez, I. y Poggi-Varaldo, H.M. 2008 Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew Sustain Energy Rev.* En línea.
- Vallet, C., Said, R., Rabiller, C. y Martin, M.L. 1996. Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: influence of the nature of the yeast. *Bioorg Chem* 24:319–330
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. y Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Science* 74:3583-3597.
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatu, K., Kornaros, M. y Lyberatos, G. 2009. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour Technol.* 100(15):3713-7.
- Wang, A., Ren, N., Shi, Y. y Lee D.J. 2008. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture- *Clostridium acetobutyricum* X9 and *Ethanoigenens harbinense* B49. *Int J Hydrogen Energy.* 33: 3660-3667.
- Woodward, J. y Orr, M. 1998. Enzymatic conversion of sucrose to hydrogen. *Biotechnol Prog.* 14(6):897-902.
- Wu, K.J., Chang, C.F. y Chang, J.S., 2007. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry* 42 1165-1171.
- Xing, D., Ren, N. y Rittman, B. 2008. Genetic Diversity of Hydrogen-Producing Bacteria in an Acidophilic Ethanol-H₂-Coproducting System, Analyzed Using the [Fe] – Hydrogenase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1232-1239.
- Yang, H., Guo, L. y Liu F. 2010. Enhanced bio-hydrogen production from corncob by a two-step process: dark- and photo-fermentation. *Bioresour Technol* (6):2049-52.
- Yescas, R., Bárcena, R. y Mendoza, G. 2004. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia* 38:23
- You, K.O., Park, S., Eun, H.S., Seo, H.K., Mi S.K., Jae, W.H. y Dewey D.Y.R. 2008. Carbon and energy balances of glucose fermentation with hydrogen producing bacterium *Citrobacter amalonaticus* Y19. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2008), 18(3), 532–538
- Zhang, Y.H. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(5):367-75.