



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Producción de hidrógeno en un reactor de filtro
percolador: Evaluación de los hidrolizados de bagazo
de agave obtenidos con enzimas comerciales**

Tesis que presenta

José de Jesús Montoya Rosales

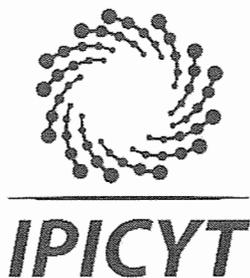
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Producción de hidrógeno en un reactor de filtro percolador: Evaluación de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con enzimas comerciales***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **José de Jesús Montoya Rosales** y aprobada el treinta y uno de julio del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Elías Razo Flores
Director de la tesis

Dra. María de Lourdes Berenice Celis García
Miembro del Comité Tutoral

Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta
Miembro del Comité Tutoral

Dr. Felipe Alatriste Mondragón
Miembro del Comité Tutoral

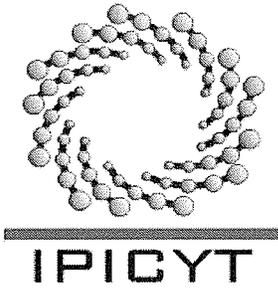


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (610915) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial SENER-CONACYT Sustentabilidad Energética, CEMIE-Bio, Clúster Biocombustibles Gaseosos 247006



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 055 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 31 días del mes de julio del año 2018, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Elías Razo Flores	Sinodal	IPICYT
Dr. Hugo Óscar Méndez Acosta	Sinodal externo	UdG

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

José de Jesús Montoya Rosales

sobre la Tesis intitulada:

Producción de hidrógeno en un reactor de filtro percolador: Evaluación de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos con enzimas comerciales

que se desarrolló bajo la dirección de

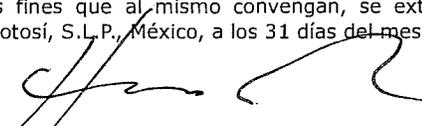
Dr. Elías Razo Flores

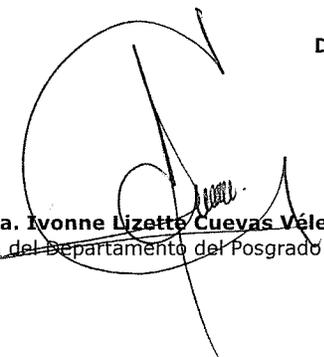
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 31 días del mes de julio de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Dedico el presente trabajo con todo mi amor y admiración a:

Mis padres con todo cariño y amor por hacer todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Mis hermanas Alejandra, Marianela y Nora y a mis cuñados Noé, Ernesto y Rogelio que siempre me dieron palabras de aliento y que de alguna manera colaboraron para la realización de este trabajo

A Paola por siempre estar a mi lado en buenos y malos momentos, gracias por todo.

A Lilia, Dulce, Ricardo, Sandra, Mariana, Karime, Juan José y a todos mis compañeros y amigos de generación que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Elías Razo Flores que durante la realización de mi proyecto fue mi mano derecha, a pesar de momentos difíciles siempre me apoyó y brindó su confianza.

A mi comité tutorial por enseñarme, aconsejarme e instruirme en el camino del buen estudiante, por darme su apoyo y su comprensión en los momentos difíciles, ellos siempre estaban dispuestos a ayudar en los momentos más duros sin pedir nada a cambio.

A todos y cada uno de los maestros y técnicos docentes, que fueron parte de mi formación y contribuyeron de diferentes formas para desarrollar este proyecto. Especialmente a la M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutiérrez, al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar y al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz.

Al grupo de trabajo del Clúster de biocombustibles gaseosos por su apoyo y colaboración desde que comencé a desarrollar esta investigación. De forma especial agradezco a Rodolfo Palomo, Ángelo Mari y Karime Olmos por sus importantes aportaciones y comentarios que lograron mejorar mi trabajo.

CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Tabla de contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hidrógeno como fuente alterna de energía	1
1.2 Biomasa lignocelulósica y su uso como sustrato en la fermentación oscura	1
1.3 Hidrólisis enzimática de biomosas lignocelulósicas	3
1.3.1 Enzimas comerciales usadas en la producción de biocombustibles gaseosos.	4
1.4 Fermentación oscura y los parámetros que la afectan	5
1.4.1 Temperatura	7
1.4.2 pH	7
1.4.3 Tiempo de retención hidráulico	7
1.4.4 Carga orgánica volumétrica	8
1.4.5 Homoacetogénesis	8
1.5 Reactores usados para la producción de hidrógeno	9
1.5.1 Reactor de filtro percolador	10
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVO	11
2.1 Hipótesis	12
2.2 Objetivo general	12
2.3 Objetivos específicos	12

3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Obtención y preparación del bagazo de agave	13
3.2 Hidrólisis enzimática	13
3.2.1 Hidrólisis empleando una mezcla enzimática importada	14
3.2.2 Hidrólisis empleando una enzima nacional	14
3.3 Inóculo	14
3.4 Operación del reactor de filtro percolador	15
3.5 Métodos analíticos	18
3.6 Evaluación del desempeño del reactor	18
3.7 Análisis estadístico	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Hidrólisis enzimática	20
4.2 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con una mezcla enzimática.	23
4.3 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con una enzima individual.	28
4.4 Efecto de la hidrólisis enzimática en la producción de hidrógeno	33
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	40
REFERENCIAS	43
ANEXOS	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estrategia operacional en el TBR en función de la hidrólisis enzimática empleada.	17
Tabla 2. Ecuaciones utilizadas para evaluar el desempeño del reactor.	19
Tabla 3. Características y duración de los hidrolizados enzimáticos de cada uno de los lotes alimentados al TBR.	21
Tabla 4. Desempeño del TBR con la mezcla enzimática en la producción de H ₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional.	26
Tabla 5. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del TBR que empleó los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática.	28
Tabla 6. Desempeño del TBR con la enzima individual en la producción de H ₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional.	31
Tabla 7. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del TBR que empleó los hidrolizados obtenidos con la enzima individual.	33
Tabla 8. Producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos en sistemas continuos.	37
Tabla 9. Estimación del costo de producción de hidrógeno en función de la hidrólisis enzimática.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía metabólica para la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura con acetato, butirato y etanol entre los principales metabolitos obtenidos como producto final.	6
Figura 2. Esquema de reactores continuos empleados para la producción de biohidrógeno. a) CSTR; b) UASB; c) TBR.	10
Figura 3. Esquema del reactor de filtro percolador.	15
Figura 4. Caracterización de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos a partir de la mezcla enzimática en función de los AT y DQO.	20
Figura 5. Caracterización de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos a partir de la enzima individual en función de los AT y DQO.	21
Figura 6. Desempeño del TBR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática.	24
Figura 7. Balance de electrones para el TBR empleando los hidrolizados a partir de la mezcla enzimática.	27
Figura 8. Desempeño del TBR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con una enzima individual.	29
Figura 9. Balance de electrones para el TBR empleando los hidrolizados a partir de la enzima individual.	32
Figura 10. Diagrama de cajas que muestran el efecto de la COV en la VVPH y el REH en el TBR para los hidrolizados con la mezcla enzimática (A, C) y con la enzima individual (B, D).	34

Abreviaturas

AGV	Ácidos grasos volátiles
AR	Azúcares reductores
AT	Azúcares totales
ATP	Adenosin trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
COV	Carga orgánica volumétrica
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado por sus siglas en inglés, continuous stirred tank reactor
DQO	Demanda química de oxígeno
EGU	Unidades de endoglucanasa por sus siglas en inglés, endoglucanase unit
FPU	Unidades de papel filtro por sus siglas en inglés, filter paper unit
H ₂	Hidrógeno
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
REH	Rendimiento específico de hidrógeno
RMH	Rendimiento molar de hidrógeno
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TBR	Reactor de filtro percolador por sus siglas en inglés, trickling bed reactor
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Reactor de lecho de lodos de flujo ascendente por sus siglas en inglés, upflow anaerobic sludge blanket
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno

Simbología griega

ε	Fracción vacía del reactor
---------------	----------------------------

RESUMEN

El bagazo de agave es un residuo lignocelulósico generado durante la elaboración de tequila que puede ser empleado como materia prima para la producción de hidrógeno (H_2), a través de procesos biológicos como la fermentación oscura. Sin embargo, debido a su estructura compleja, este material debe ser hidrolizado con el fin de liberar azúcares fácilmente fermentables para los microorganismos. En este estudio se investigó la viabilidad de la producción de H_2 a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave. Se utilizaron enzimas comerciales que presentan actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. Se realizaron dos diferentes hidrólisis enzimáticas, en la primera se empleó una mezcla de dos enzimas importadas (Celluclast 1.5L y Viscozyme L) y en la segunda se empleó una enzima nacional (Stonezyme). Se evaluó la producción continua de H_2 de dichos hidrolizados en un reactor de filtro percolador (TBR, por sus siglas en inglés) variando la carga orgánica. El TBR para el hidrolizado con la mezcla enzimática y con la enzima individual fueron operados por 59 y 40 días, respectivamente, a cargas orgánicas volumétricas (COV) aplicadas con valores entre 34.6 y 81 g DQO/L·d. En ambos hidrolizados se encontró que la velocidad volumétrica de producción de H_2 (VVPH) estaba directamente relacionada con la COV aplicada, donde las máximas VVPH alcanzadas con los hidrolizados de la mezcla enzimática y de la enzima individual fueron de 5.75 y 1.98 L H_2 /L·d, respectivamente, a una COV de 81 g DQO/L·d. Por otra parte, con los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática, el rendimiento específico de H_2 (REH) incrementó claramente en función de la COV, obteniendo un valor máximo de 73.21 L H_2 /kg de bagazo a la máxima COV aplicada; este valor es mayor a lo obtenido con el hidrolizado de la enzima individual donde se obtuvo un rendimiento de 16.15 L H_2 /kg de bagazo a la misma COV. En conclusión, los resultados muestran que los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática pueden aumentar significativamente la producción de H_2 a partir de bagazo de agave y ser una alternativa prometedora en el contexto de la transición energética.

Palabras clave: Bagazo de agave, hidrógeno, hidrólisis enzimática, TBR.

ABSTRACT

Agave bagasse is a lignocellulosic residue generated during the tequila manufacturing that can be used as a feedstock for H₂ production. Nevertheless, due to its complex structure, this material has to be hydrolysed in order to release easily fermentable sugars. In this study, it was investigated the feasibility of H₂ production from enzymatic hydrolysates of agave bagasse. Commercial enzymes with cellulolytic and hemicellulolytic activities were used. Two different enzymatic hydrolysis of agave bagasse were performed, in the first one a mixture of two imported enzymes (Celluclast 1.5L and Viscozyme L) was used and in the second one a domestic enzyme (Stonezyme) was used. The continuous H₂ production from both hydrolysates was evaluated in a trickling bed reactor (TBR) using different organic loading rates (OLR). TBR for hydrolysates with enzymatic mixture and with individual enzyme were successfully operated for 59 and 40 days, respectively, under OLR ranging from 43.2 to 81 g COD/L·d. In both hydrolysates, the volumetric H₂ production rate (VHPR) was found to be directly linked to the OLR applied, where the maximum VHPR for the hydrolysates of the mixture and the individual enzyme were 5.75 and 1.98 L H₂/L·d, respectively, at an OLR of 81 g COD/L·d. Moreover, for the hydrolysates obtained with the mixture of enzymes, the specific hydrogen yield clearly increased as function of OLR, reaching a maximum value of 73.21 L H₂/kg bagasse at the maximum OLR, which is higher than that obtained with hydrolysates from the individual enzyme that reported a yield of 16.15 H₂/kg bagasse at the same OLR. Overall, the results showed that the enzymatic mixture hydrolysate can substantially improve the H₂ production from agave bagasse in comparison with the individual enzyme hydrolysate and therefore it becomes a promising alternative in the energy transition context.

Keywords: Agave bagasse, enzymatic hydrolysis, hydrogen, TBR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hidrógeno como fuente alterna de energía

Debido a la contaminación ambiental y el agotamiento de los combustibles fósiles, es urgente buscar alternativas de energía en el futuro cercano. En la actualidad, la ciencia y la ingeniería relacionadas con la energía han prestado atención al gas H₂ como candidato potencial de combustible alterno. Las características únicas del H₂, tales como su alto contenido en energía calórica, la ausencia de emisiones de gases de efecto invernadero después de su combustión/oxidación y sus métodos de producción relativamente versátiles lo han calificado como un vector potencial para satisfacer la demanda energética en el futuro (Sivagurunathan et al., 2017).

Dentro de los métodos para la generación de H₂ se encuentran aquellos que hacen uso de microorganismos y aquellos que se basan en procesos termoquímicos. La generación de hidrógeno haciendo uso de microorganismos, específicamente la fermentación oscura, es más atractiva frente a los procesos termoquímicos debido a sus menores requerimientos energéticos, así como por la potencial valorización de residuos agroindustriales, municipales, o efluentes de la industria alimentaria con alto contenido orgánico (Buitrón & Carvajal, 2010; Davila-Vazquez, Arriaga, et al., 2008). En los últimos años ha crecido exponencialmente la investigación relacionada con diversos aspectos de la fermentación oscura, tales como selección y pretratamiento de biomasa con alto contenido de carbohidratos, optimización de condiciones ambientales, diseño de reactores continuos productores de H₂, entre otros (Mota et al., 2018).

1.2 Biomasa lignocelulósica y su uso como sustrato en la fermentación oscura

Los residuos orgánicos son un recurso renovable que incluye a toda la materia orgánica que proviene de restos agrícolas o forestales, desechos de animales, de la industria, así como de los residuos urbanos, los cuales cuentan con la característica de ser susceptibles de ser transformados por medios biológicos o térmicos para generar energía (Wang & Wan, 2009). El uso de estos residuos como sustrato en procesos fermentativos es de gran interés debido a su amplia abundancia y capacidad de renovación. Los residuos orgánicos no compiten con

materia prima destinada a alimentos y, además, se considera que tienen poco valor económico pequeño o nulo (Monlau et al., 2013).

Los residuos lignocelulósicos están compuestos de tres polímeros: la celulosa, la lignina y la hemicelulosa, principalmente. La celulosa es un polímero altamente estable que consiste en moléculas de glucosa unidas con enlaces lineales, es el componente principal de las paredes celulares de los vegetales. La hemicelulosa, consiste en cadenas ramificadas que carecen de zonas cristalinas, está constituida de monosacáridos (xilosa, principalmente) y derivados de estos como los ácidos urónicos (Liu et al., 2013). La lignina es un polímero aromático de estructura tridimensional bastante compleja, muy ramificada y amorfa, formada por la condensación de precursores fenólicos unidos por diferentes enlaces. Las funciones que tiene la lignina son, principalmente, proteger a la celulosa del ataque microbiano, así como conferir resistencia e impermeabilidad al material y mantener unidas las fibras celulósicas (Caspeta et al., 2014).

El bagazo de agave es un buen ejemplo de residuo lignocelulósico, el cual se obtiene durante la producción de bebidas alcohólicas de plantas de la familia *Agavaceae*, tiene una alta concentración de carbohidratos y bajo contenido de lignina (46% celulosa, 23% hemicelulosa, 19% lignina), por lo que ha sido estudiado como sustrato con alto potencial para la producción de biocombustibles como bioetanol, biohidrógeno y metano (Buitrón et al., 2014; Caspeta et al., 2014; Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

Sin embargo, las propiedades de la biomasa lignocelulósica tales como cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa, área superficial accesible, presencia de lignina y hemicelulosa y grado de acetilación de la hemicelulosa, hacen que dicha biomasa sea resistente a la biodegradación, siendo una de las principales limitantes para la producción de H₂ (Zheng et al., 2014). Por lo tanto, es necesaria la aplicación de un pretratamiento con el objetivo de alterar dichas propiedades y facilitar el acceso a los carbohidratos, para su conversión a azúcares fácilmente asimilables presentes principalmente en la celulosa y hemicelulosa.

1.3 Hidrólisis enzimática de biomásas lignocelulósicas

Los resultados de un pretratamiento dependen de la composición de la biomasa y del pretratamiento como tal, ya que cada pretratamiento tiene un efecto específico sobre los componentes principales del material lignocelulósico. Para que un pretratamiento se considere efectivo debe contar con las siguientes características: mejorar la liberación de azúcares, evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, evitar la formación de subproductos a concentraciones que son inhibitorias en el proceso de fermentación y por último que tenga un costo-beneficio adecuado (Kumar et al., 2009).

Los pretratamientos comúnmente aplicados antes de la producción de biocombustibles son la hidrólisis ácida, alcalina e hidrótermica, o una combinación de ellos. Una vez realizado el pretratamiento, se requiere de una hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, la cual se lleva a cabo por medio de enzimas. La hidrólisis enzimática presenta ciertas ventajas como un alto rendimiento de azúcares, condiciones moderadas de operación y despreciable o nula generación de inhibidores (Contreras-Dávila et al., 2017).

La hidrólisis enzimática se realiza principalmente por dos grupos de enzimas: celulasas y hemicelulasas. Las celulasas realizan la despolimerización de la celulosa mediante la acción de tres grupos de enzimas que son: endogluconasas, exogluconasas y β - glucosidasas. Las primeras, inician la hidrólisis rompiendo al azar los enlaces β -1-4 de la celulosa creando así extremos de cadena libre. Posteriormente, las exogluconasas atacan estos extremos de cadena libre para producir celobiosa (disacárido de glucosa); finalmente, las unidades de celobiosa son digeridas por las β - glucosidasas para producir glucosa (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Dentro del grupo de las hemicelulasas, las xilanasas constituyen el grupo enzimático más estudiado debido a que el xilano se encuentra en gran abundancia en la hemicelulosa de diversas especies vegetales. Las xilanasas, similares a las celulasas, se componen básicamente de dos grupos de enzimas: endo-1,4-D-xilanasas y 1,4-D-xilosidasas. La endo-1,4-D-xilanasas actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación

de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La 1,4-D-xilosidasa interviene luego de la endoxilanasas, actuando sobre los xilooligosacáridos y/o sobre la xilobiosa, dando como producto xilosa (Bajpai, 1997).

Es importante mencionar que para el caso de bagazo de agave al ser obtenido después de un proceso de cocción de la piña del agave, se ha encontrado que no es necesario pretratarlo y con esto es viable realizar directamente la hidrólisis enzimática (Abreu Sherrer, 2013).

1.3.1 Enzimas comerciales usadas en la producción de biocombustibles gaseosos.

En el mercado nacional y extranjero se puede encontrar una gran variedad de enzimas comerciales utilizadas en industrias de diferentes rubros (alimenticias, químicas, textiles, papeleras, farmacéuticas, entre otras) que cuentan con actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. Celluclast 1.5L y Viscozyme, son enzimas comerciales producidas por la empresa danesa NovozymesTM. De acuerdo a dicha empresa, Celluclast 1.5 L se emplea para descomponer los materiales celulósicos en azúcares fermentables y aumentar el rendimiento de productos valiosos de origen vegetal. Por otro lado, Viscozyme se emplea para favorecer la disponibilidad de almidón y reducir la viscosidad en la fermentación de productos obtenidos de plantas.

Diversos estudios han reportado el uso de enzimas comerciales extranjeras (Celluclast 1.5L, principalmente) para la sacarificación de biomasa lignocelulósica durante la producción de H₂ (Arreola-Vargas et al., 2013; Gomez-Tovar et al., 2012). Trabajos realizados con hidrolizados enzimáticos de paja de avena empleando Celluclast 1.5L, reportan una concentración de azúcares totales (AT) de 35.3 g/L, equivalente a 25-30% de la demanda química de oxígeno (DQO) presente en el hidrolizado, con un rendimiento de azúcares entre 0.18 y 0.28 g AT/g paja de avena (Gomez-Tovar et al., 2012). Así mismo, en bagazo de agave se ha reportado el uso de la enzima Celluclast 1.5L obteniendo rendimientos de sacarificación entre 0.19 y 0.38 g AT/g bagazo de agave (Abreu Sherrer, 2013; Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

De igual forma, en la literatura existen trabajos (Galindo-Hernández, 2017) que reportan el efecto de emplear una mezcla enzimática de Celluclast 1.5L y Viscozyme en la hidrólisis de bagazo de agave, demostrando que dicha mezcla incrementa el rendimiento de azúcares (0.29 g AT/g bagazo) en comparación con lo obtenido de forma individual con estas enzimas (0.20 y 0.017 g AT/g bagazo, respectivamente). De acuerdo a tales autores este incremento en el rendimiento de sacarificación fue debido al sinergismo que presentaron dichas enzimas sobre el bagazo de agave (Galindo-Hernández, 2017).

Stonezyme es una preparación enzimática nacional que cuenta con actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. Esta enzima es producida por la empresa ENMEX™ y originalmente se emplea en la formulación de detergentes para eliminar el pilling y mejorar la apariencia de las prendas. Sin embargo, debido a las actividades que tiene sobre la celulosa y hemicelulosa, puede ser empleada para el pretratamiento de compuestos complejos. A la fecha, no ha sido reportado el uso de esta enzima en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, ni se han reportado los posibles efectos en la sacarificación de las fibras del bagazo de agave que pueden generarse con dicha enzima.

1.4 Fermentación oscura y los parámetros que la afectan

La producción de H₂ por fermentación oscura ocurre a través de una sucesión de reacciones bioquímicas, como se observa en la Figura 1. La primera parte consiste en la hidrólisis de compuestos complejos, que pueden ser asistidos por tecnologías de pretratamiento y sacarificación enzimática, a moléculas simples como glucosa. Las moléculas simples posteriormente se someten a una degradación anaerobia para producir nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), piruvato y adenosin trifosfato (ATP). El piruvato, a través de la ruta piruvato-formiato liasa (PFL) produce formiato y acetil coenzima A. El formiato es entonces oxidado a dióxido de carbono (CO₂) e H₂ bajo ambientes moderadamente ácidos. Por otro lado, si el piruvato es descompuesto a través de la vía piruvato-ferredoxina oxido reductasa (PFOR) se produce ferredoxina reductasa (F_{red}) y acetil coenzima A. La F_{red} es oxidada a ferredoxina oxidasa mientras simultáneamente se produce H₂ por la acción de las enzimas Fe-Fe o Ni-Fe hidrogenasas (Fd). Además, el H₂ de igual forma se puede producir usando

NADH a través de la reducción de Fd a F_{red}, la reducción de una hidrogenasa (NADH- [Fe-Fe] y la oxidación del NADH por Fd- NADH-[FeFe] (Bundhoo, 2017).

Por otro lado, la acetil coenzima A es convertido a ácido acético, ácido butírico y etanol, principalmente usando NADH. El rendimiento teórico de H₂ a través de la fermentación oscura es de 4 mol H₂/mol glucosa, cuando se tiene como producto final ácido acético y de 2 mol H₂/mol glucosa cuando se tiene como producto final ácido butírico, de acuerdo a las ecuaciones (1) y (2), respectivamente. Es importante mencionar que la producción de H₂ depende de diversos aspectos ambientales, algunos de los cuales se detallan más adelante (Sivagurunathan et al., 2016).

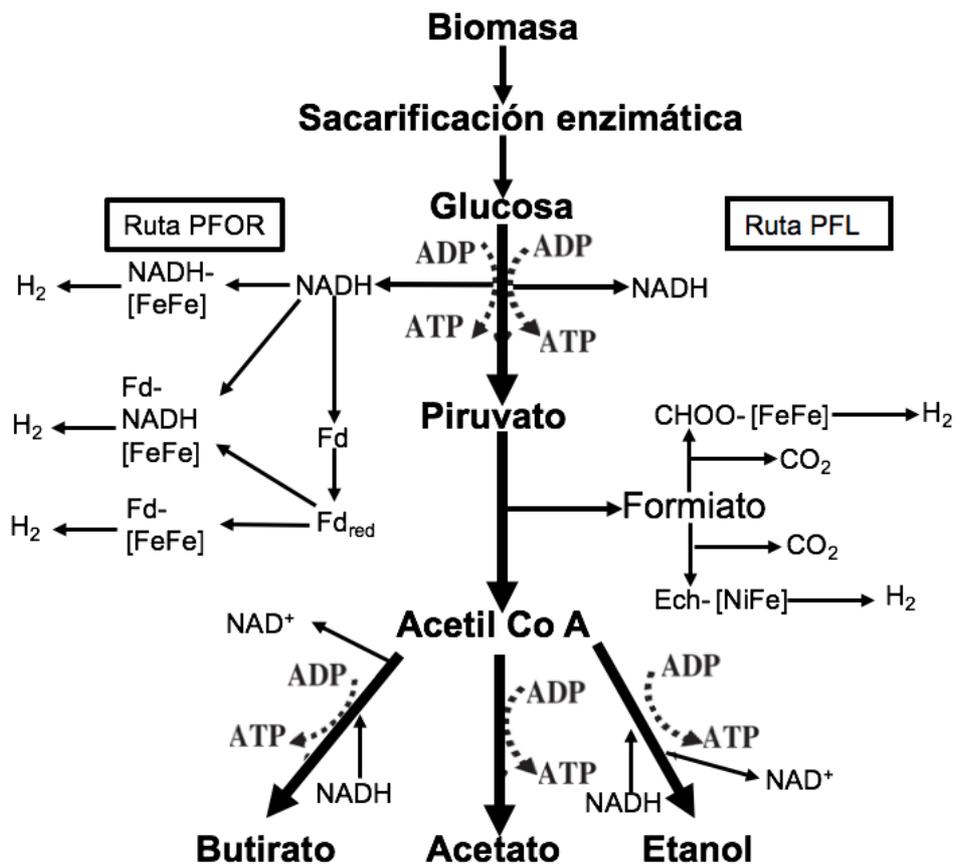
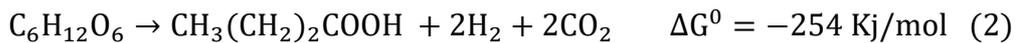
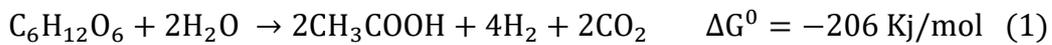


Figura 1. Vía metabólica para la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura con acetato, butirato y etanol entre los principales metabolitos obtenidos como producto final. Modificada de Elbeshbishy et al. (2017).

1.4.1 Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en las actividades de las bacterias productoras de H₂ y en la producción de H₂ por fermentación. Se ha demostrado que, en un intervalo adecuado, el incremento de la temperatura podría aumentar la capacidad de las bacterias productoras de H₂ durante la fermentación oscura, pero la temperatura en niveles mucho más altos podría disminuir dicha capacidad de forma notable. A pesar de que existe una amplia variedad de estudios que investigan el efecto de la temperatura en la FO, para el caso de temperaturas mesofílicas el valor óptimo es alrededor de 37 °C mientras que para temperaturas termofílicas dicho valor es de 55 °C (Wang & Wan, 2009).

1.4.2 pH

El pH es otro factor importante que influye en las actividades de las bacterias productoras de H₂, ya que puede afectar la actividad de la hidrogenasa, así como la ruta metabólica. De acuerdo a estudios realizados en sistemas continuos con control de pH se ha establecido que un rango óptimo de este parámetro se encuentra en 5.5 ± 1 , debido a que en este pH las bacterias productoras de H₂ (*Clostridium* spp) tienen rutas metabólicas que se acoplan con la hidrogenesis, mientras que las reacciones no productoras de H₂ se presentan generalmente fuera de este intervalo. Sin embargo, los valores iniciales y operacionales óptimos de pH pueden variar extensivamente, dependiendo del sustrato y de la composición de la población microbiana (Sivagurunathan et al., 2016).

1.4.3 Tiempo de retención hidráulico

El tiempo de retención hidráulico (TRH) es un parámetro importante del control del reactor que influye en la velocidad de producción de H₂ y el desempeño operacional del mismo. Mantener la concentración constante del sustrato y disminuir el TRH es una estrategia eficaz para eliminar a los microorganismos no productores/competidores de H₂ y simultáneamente desarrollar comunidades microbianas productoras de H₂ estables en sistemas continuos tradicionales. Mantener un TRH bajo permite retener a las bacterias productoras de H₂ en su fase exponencial de crecimiento evitando que lleguen a la producción de

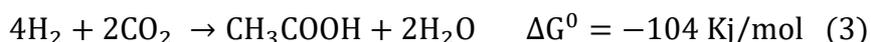
alcoholes dentro de reactores de biomasa suspendida durante su fase estacionaria de crecimiento. De acuerdo con diversos estudios, el TRH óptimo oscila entre 0.5 h a 12 h para una eficiente producción de H₂ a partir de sustratos líquidos (Sivagurunathan et al., 2016)

1.4.4 Carga orgánica volumétrica

La producción de H₂ en un sistema continuo es dependiente de la COV, que se puede controlar aumentando la concentración del sustrato en la alimentación junto con un THR fijo o modificando el TRH con la concentración fija del sustrato en la alimentación. En muchos casos, una alta COV causa rendimientos de H₂ bajos probablemente debido a los cambios en el flujo metabólico hacia solventogénesis y otros productos finales reducidos que son desfavorables para la producción de H₂. Por otro lado, Dávila-Vázquez et al (2008) llegó a la conclusión de que un aumento de la COV, de 55.4 a 138 g DQO/ L·d, a un TRH de 6 h incrementaba notablemente la VVPH de 2.8 a 28.47 L H₂/L·d. En resumen, no existe una COV óptima universal del sustrato para la fermentación, esta varía con el sustrato particular y el inóculo (Sivagurunathan et al., 2016).

1.4.5 Homoacetogénesis

La homoacetogénesis, es la formación de acetato por microorganismos acetogénicos autótrofos (homoacetógenos) a través de la reducción de CO₂ con H₂, de acuerdo a la ecuación (3).



Existen pocos estudios acerca del papel de la homoacetogénesis y los factores que favorecen este metabolismo en sistemas productores de H₂. Sin embargo, factores como alta presión parcial de H₂ (> 500 Pa), el bajo valor de pH (4.5 – 5.5), los altos TRH (12-20 h), la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), entre otros, favorecen el metabolismo de bacterias homoacetógenas en dichos sistemas (Saady, 2013). Con respecto a la temperatura, la homoacetogénesis ha sido reportada en sistemas de producción de H₂ mesofílicos, termofílicos e hipertermofílicos, por lo que se considera que es un proceso intrínseco de la fermentación oscura (Wan et al., 2016). Se han buscado opciones para eliminar este fenómeno a través del pretratamiento del inóculo. Sin embargo, diversos

estudios (Luo et al., 2011; Saady, 2013) han reportado porcentajes de consumo de H₂ entre 11 a 43% por efecto de la homoacetogénesis empleando inóculo pretratado, por lo que actualmente no se ha logrado entender el papel que puede llegar a tener la homoacetogénesis durante procesos fermentativos y la forma de suprimir este metabolismo con la finalidad de tener mayores producciones de H₂ (Saady, 2013).

1.5 Reactores usados para la producción de hidrógeno

Existen diversos reactores para la producción de H₂ basados en la forma de crecimiento de biomasa y que pueden ser de dos tipos: los reactores de biomasa suspendida y los reactores de biomasa fija. Con respecto a los reactores de biomasa suspendida, el reactor continuo de tanque agitado (CSTR, por sus siglas en inglés) es la configuración más reportada para la producción de hidrógeno, debido a que son sencillos de operar y tiene una eficiente transferencia de masa (Wang & Wan, 2009). Sin embargo, tiene la desventaja de que el lavado celular puede ocurrir a TRH bajos (6-3.5 h), esto es debido a que en este tipo de reactor el tiempo de retención celular es igual al TRH (Cota-Navarro et al., 2011; Davila-Vazquez et al., 2009).

Los reactores de biomasa fija son una alternativa a los reactores CSTR debido a que son capaces de mantener altas concentraciones de biomasa y pueden operar a bajos TRH (< 6 h) y altas COV (> 50 g DQO/L-d), lo cual puede promover altas VVPH (Wang & Wan, 2009). El reactor más reportado en la literatura para la producción de H₂ empleando biomasa fija es el reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés). En este tipo de reactores se han reportado VVPH para glucosa entre 0.4 y 12.6 L H₂/L-d, para hidrolizados ácidos de paja de arroz de 3.54 L H₂/L-d, para residuos de café de 1.67 L H₂/L-d y para residuos cítricos 4.37 L H₂/L-d (Jung et al., 2010; Tapia-Venegas et al., 2015; Yang et al., 2006; Yu et al., 2002).

Sin embargo, el uso de otro tipo de reactores de biomasa fija como el reactor TBR, puede proveer ciertas ventajas, una de ellas es la baja presión parcial de hidrógeno en la biopelícula y altas concentraciones de biomasa (Contreras-

Dávila et al., 2017). En la Figura 2 se presenta un esquema general de los reactores previamente mencionados.

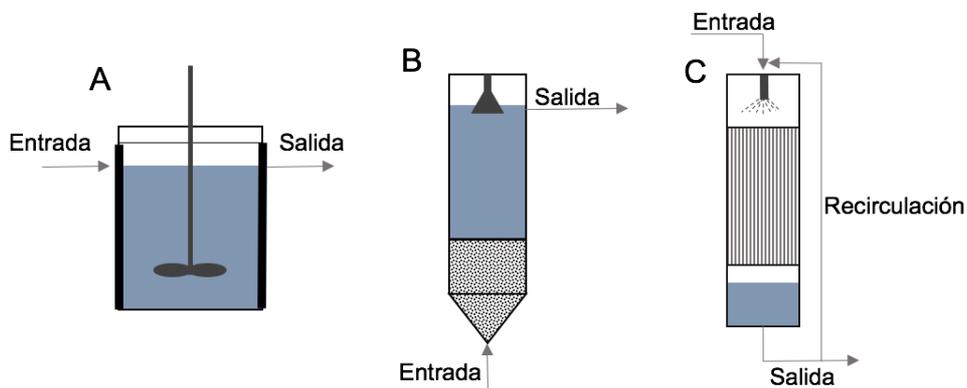


Figura 2. Esquema de reactores continuos empleados para la producción de biohidrógeno. A) CSTR; B) UASB; C) TBR.

1.5.1 Reactor de filtro percolador

El TBR es un reactor de biomasa fija en el que el crecimiento de la biomasa y la biopelícula se forman en el material de empaque (tubos de etileno de polivinilo, perlita, entre otros materiales poliméricos). En este tipo de reactor el sustrato es asperjado de la parte superior, el cual al descender percola formando una capa delgada sobre la biopelícula (Van Groenestijn et al., 2009).

El TBR, es una configuración de reactor que puede ser empleada para la producción de H_2 debido a características como su alta capacidad de retención de biomasa en el material de soporte siendo menos susceptible a lavado celular a bajos TRH del orden de 6-4 h. Además, al no ser un reactor completamente inundado presenta una eficiente liberación de H_2 debido a la interfase líquido-gas que se forma en la biopelícula, impactando directamente en el coeficiente de transferencia de masa volumétrico y en una baja presión parcial de H_2 (280-330 Pa) en comparación con reactores CSTR (340-660 Pa) (Arreola-Vargas et al., 2015; Contreras-Dávila et al., 2017). Existen pocos estudios sobre la producción de H_2 en este tipo de reactores. Algunos trabajos reportan la producción de H_2 a partir del hidrolizado ácido de paja de avena con VVPH de 1.95 L H_2 /L·d (Arriaga et al., 2011). Para el caso de hidrolizados enzimáticos empleando la enzima Celluclast 1.5L se reportaron VVPH de 3.45 y 0.623 L H_2 /L·d para bagazo de agave y paja de avena, respectivamente (Arreola-Vargas et al., 2015; Contreras-Dávila et al., 2017).

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVO

En México, la industria tequilera genera alrededor de 360 mil toneladas de bagazo de agave por año (Caspeta et al., 2014). Debido a la cantidad de residuos que se generan y a su alto contenido en carbohidratos este residuo podría ser una fuente de biomasa viable para la generación de biocombustibles tales como etanol, biogás y biohidrógeno. Actualmente, existen pocos reportes enfocados en la producción de H₂ a partir de bagazo de agave debido a su composición lignocelulósica, lo que hace más difícil su aprovechamiento en procesos fermentativos. La elección de una hidrólisis adecuada es fundamental para lograr una mayor liberación de azúcares. Una alternativa para pretratar el material lignocelulósico en cuestión es la hidrólisis enzimática, la cual se realiza principalmente por dos grupos de enzimas: celulasas y hemicelulasas. El uso de enzimas comerciales, específicamente Celluclast 1.5L, ha demostrado tener un efecto positivo en la sacarificación del bagazo de agave durante la producción de H₂ en un sistema continuo utilizando reactores TBR y CSTR. Sin embargo, empleando dichos hidrolizados en este tipo de reactores, se demostró que existe un límite en cuanto a la máxima COV que soportan para poder operar de forma estable, siendo esta de 52.9 g DQO/L-d a TRH de 6 horas (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

Haciendo uso de una mezcla de enzimas importadas (Celluclast 1.5 L y Viscozyme) para la hidrólisis de bagazo de agave se esperaría obtener un mayor rendimiento de liberación de azúcares debido al sinergismo que estas pueden llegar a lograr durante la hidrólisis, y en su caso, tener un efecto positivo en la operación de reactores TBR a cargas volumétricas cercanas e incluso mayores a la máxima reportada. Dicho efecto positivo podría reflejarse en variables de respuesta como rendimiento molar de H₂ (RMH), VVPH y REH. No obstante, un aspecto que es importante tomar en consideración son los altos costos de dichas enzimas (\$1.05 y 29.95 MN/mL de enzima para Celluclast 1.5L y Viscozyme, respectivamente) en comparación con enzimas de origen nacional como Stonezyme (\$0.42 MN/mL de enzima). Por lo que es de gran importancia realizar estudios de sacarificación con enzimas de origen nacional que cuentan con actividades celulolíticas y hemicelulolíticas y evaluar su efecto en la producción de H₂ en reactores continuos.

De esta manera y de acuerdo a lo mencionado previamente, sería de gran importancia evaluar la capacidad de producción de H₂ en un TBR utilizando hidrolizados de bagazo de agave tratados con una mezcla de enzimas comerciales importadas y con una enzima nacional, respectivamente y compararlos con trabajos similares en función del pretratamiento, de la configuración del reactor y de algunas condiciones operacionales (carga orgánica), y así poder establecer las condiciones operacionales que permitan obtener la máxima capacidad de producción de H₂.

2.1 Hipótesis

Los hidrolizados del bagazo de agave obtenidos con una mezcla enzimática, alcanzarán mayores producciones de hidrógeno en un reactor de filtro percolador, debido a que tendrán una mayor concentración de azúcares fermentables, en comparación con hidrolizados obtenidos de un solo tipo de enzima.

2.2 Objetivo general

Evaluar los hidrolizados del bagazo de agave obtenidos tanto con una mezcla enzimática como con una enzima individual nacional, como sustratos en la producción de H₂ en un reactor de filtro percolador.

2.3 Objetivos específicos

- Caracterizar los hidrolizados del bagazo de agave procedentes de la hidrólisis enzimática tanto de la mezcla como de la enzima individual.
- Evaluar el efecto de la carga orgánica en la producción de H₂ en un reactor de filtro percolador alimentado con hidrolizados de bagazo de agave obtenido con una mezcla enzimática y una enzima individual nacional, respectivamente.
- Evaluar el costo de producción volumétrica de H₂ con ambos hidrolizados enzimáticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención y preparación del bagazo de agave

El bagazo de agave se obtuvo de la empresa Casa Herradura™ ubicada en Amatitán, Jalisco, México. Dicho bagazo se lavó tres veces con agua potable con una duración de una hora cada lavado, posteriormente se secó a temperatura ambiente por 48 horas y se redujo el tamaño de partícula empleando un molino de cuchillas. Posteriormente el bagazo de agave molido se tamizó con una malla No. 18 (apertura 2 mm). El bagazo de agave tamizado se almacenó en bolsas de plástico y costales a temperatura ambiente en condiciones secas y sin luz hasta su uso.

3.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimáticas se llevó a cabo en un reactor de vidrio con un volumen de trabajo de 10 L (modelo U1 TPLC/FAM-10000, Prendo, Puebla, México) integrado con un agitador vertical helicoidal y con un control manual de agitación. La temperatura se controló de forma automática empleando un recirculador de agua integrado a dicho reactor (modelo FC-20P, Prendo, Puebla, México). Para realizar la hidrólisis enzimática se empleó un buffer de citratos 50 mM de acuerdo a lo reportado en trabajos anteriores (Galindo-Hernández, 2017). Al terminar la hidrólisis enzimática se separó el hidrolizado del bagazo empleando una tela absorbente 100% algodón y el hidrolizado líquido se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso. En total se realizaron 9 lotes de hidrólisis de 10 L para la mezcla enzimática y 7 con la enzima individual.

El anexo 1 muestra la caracterización de las enzimas empleadas en este trabajo en función de sus actividades celulíticas y hemicelulolíticas. A partir de esta caracterización inicial se realizaron las optimizaciones de las condiciones de hidrólisis tanto para la mezcla enzimática como para la enzima individual. Estas condiciones se especifican en la sección 3.2.1 y 3.2.2. Es importante mencionar que tanto la caracterización de las enzimas como la optimización de las condiciones de hidrólisis fueron desarrolladas previamente en el grupo de trabajo.

3.2.1 Hidrólisis empleando una mezcla enzimática importada

La hidrólisis del bagazo de agave consistió en una combinación de dos enzimas comerciales producidas por la empresa danesa Novozyme: Celluclast 1.5L (Biotecsa, México) y Viscozyme L (Sigma-Aldrich, EUA). La hidrólisis se realizó de acuerdo a lo reportado por Galindo-Hernández (2017), la reacción fue llevada a cabo a una temperatura, pH y concentración de biomasa de 40 °C, 5.0 y 50 g bagazo/L buffer, respectivamente. La enzima Celluclast fue añadida a una concentración de 1 mg proteína/mL buffer (25 mL enzima/L buffer), mientras que la enzima Viscozyme L se añadió a una concentración de 0.1 mg proteína/mL buffer (2.7 mL enzima/L buffer). La solución se colocó en agitación continua a 100 rpm por 6 horas.

3.2.2 Hidrólisis empleando una enzima nacional

Para la hidrólisis del bagazo de agave se usó la enzima comercial: Stonezyme (ENMEX, México). La hidrólisis se realizó a una temperatura, pH y concentración de biomasa de 50 °C, 6.21 y 78.79 g bagazo/L buffer, respectivamente. La concentración de enzima adicionada fue de 2.25 mg proteína/mL buffer (82.97 mL enzima/L buffer). La solución se colocó en agitación continua a 100 rpm por 7 horas.

3.3 Inóculo

Como inóculo para la operación de los reactores se empleó lodo anaerobio obtenido de un reactor UASB a nivel industrial que trata vinazas de tequila de Casa HerraduraTM, en Amatitán, Jalisco, México. El lodo se sometió a un pretratamiento térmico con la finalidad de eliminar la actividad metanogénica, el cual consistió en calentar a 105 °C por 24 h, realizando una disgregación en las primeras 12 h para posteriormente continuar con el tiempo restante de pretratamiento (Contreras-Dávila et al., 2017). Para su caracterización se determinó el contenido de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) después del pretratamiento.

3.4 Operación del reactor de filtro percolador (TBR)

Se empleó un TBR de acrílico cilíndrico compuesto por tres secciones iguales de 6.5 cm de diámetro interno y una longitud de 30 cm, complementando el reactor un recipiente de almacenamiento de 500 mL ubicado en la parte inferior (Figura 3). Considerando las dimensiones mencionadas previamente el TBR tenía un volumen total de 3.5 L. El TBR se empacó empleando tubos de polietileno arreglados de forma vertical, en la primera sección dichos tubos eran de 10.7 cm de longitud, mientras que en las secciones II y III eran de 27.5 cm. Los tubos tenían un diámetro interno de 10 mm y se colocaron un total de 19 tubos en cada sección, resultando en un volumen empacado de 2 L y un volumen efectivo del TBR de 1.5 L ($\epsilon = 0.7$).

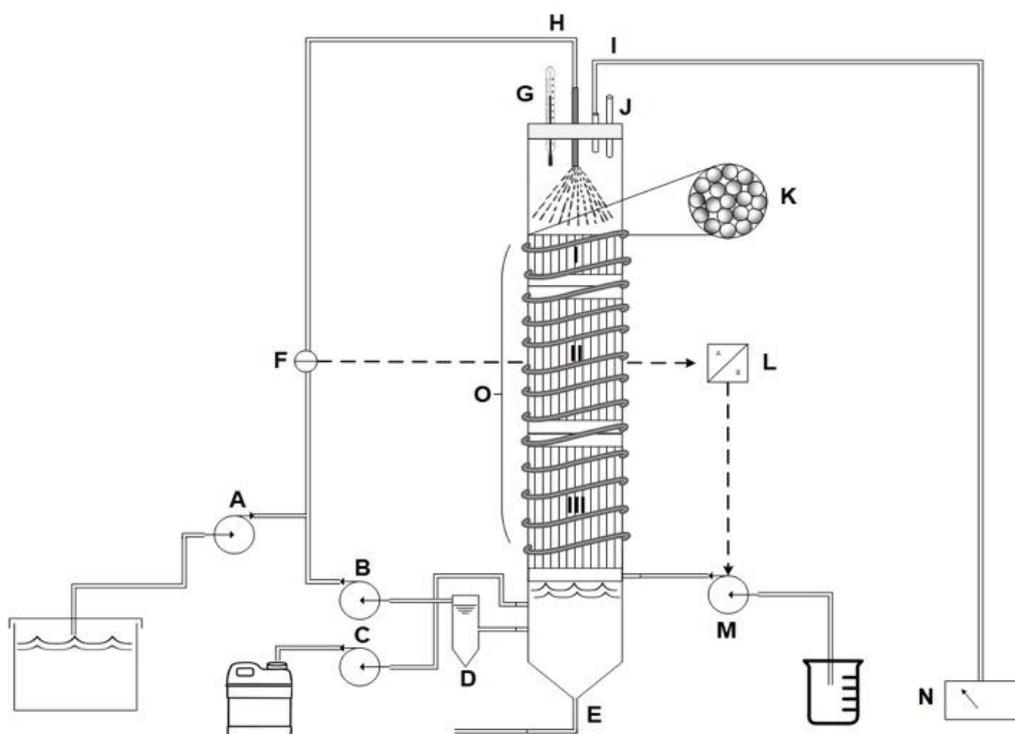


Figura 3. Esquema del reactor de filtro percolador. A: Bomba de alimentación, B: Bomba de recirculación, C: Bomba de efluente, D: Clarificador, E: Purga de lodos, F: Sensor de pH, G: Termómetro, H: Entrada del líquido, I: Salida de gas, J: Puerto de muestreo de gas, K: Tubos de polietileno, L: Controlador de pH, M: bomba de NaOH, N: Contador de gas, O: Chaqueta de agua.

Para el arranque del reactor, el TBR fue operado en lote durante 24 horas e inundado completamente con medio mineral preparado de acuerdo a lo reportado por Contreras-Dávila et al. (2017). Se empleó una concentración de sustrato, pH y concentración de inóculo de 13 g DQO/L, 5.5 y 4.5 g SSV/L,

respectivamente. Para la operación en continuo, se definió un TRH de 6 horas por lo que se estableció una velocidad de recirculación de 180 mL/min y un flujo de alimentación de 1.8 mL/min considerando un volumen de líquido en el TBR de 670 mL (Contreras-Dávila et al., 2017). Es importante mencionar que el TBR no se encontraba completamente inundado ya que este volumen de líquido permitió que el líquido que se recirculaba cayera libremente y resbalará por las paredes de los tubos. El reactor estaba equipado con un controlador (modelo ADI 1030, Applikon, EUA) para ajustar el pH a 5.5 a través de un dosificador automático de NaOH 4M. La temperatura se mantuvo a 37 °C empleando una chaqueta conectada a un calentador/recirculador de agua integrado con un control de temperatura (modelo RTE-211, NESLAB, USA).

El desempeño del TBR se evaluó en función de la COV, que a su vez está en función de la concentración de sustrato. La operación del reactor se realizó en dos etapas diferentes: En la primera se evaluaron los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática, mientras que para la segunda etapa el TBR se vació completamente, se lavó y se arrancó nuevamente empleando los hidrolizados obtenidos con la enzima individual. La estrategia experimental para ambas etapas se muestra en la Tabla 1. Dicha estrategia consistió en aumentar la COV a valores similares a lo reportado previamente en reactores CSTR y TBR (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018). Los hidrolizados se alimentaron sin postratamiento alguno, excepto durante el periodo VI de la segunda etapa, cuando se empleó un hidrolizado centrifugado para remover los sólidos suspendidos con el fin de evaluar el efecto de los mismos sobre el desempeño del TBR.

El criterio para operar una nueva condición operacional fue que hubiera transcurrido un tiempo equivalente a 20 veces el TRH y que se obtuvieran tres valores similares en producción de H₂ con una variación no mayor 10%. El sistema fue evaluado en términos de consumo de carbohidratos, producción de metabolitos, concentración de biomasa, VVPH y RMH, de acuerdo a lo descrito previamente (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

Tabla 1. Estrategia operacional en el TBR en función de la hidrólisis enzimática empleada.

Etapa 1: mezcla enzimática				Etapa 2: enzima individual			
Periodo	Días de operación	Concentración de sustrato (g DQO/L)	COV (g DQO/L·d)	Periodo	Días de operación	Concentración de sustrato (g DQO/L)	COV (g DQO/L·d)
I	1 - 12	20	34.6	I	1 - 6	25	43.2
II	13 - 21	25	43.2	II	7 - 13	30	52.9
III	12 - 28	30	52.9	III	14 - 22	35	60.5
IV ^a	29 - 33	35	60.5	IV	23 - 29	40	69.1
V ^a	34 - 36	30	52.9	V	30 - 36	46	81
VI	37 - 39	25	43.2	VI	37 - 40	46	81
VII	40 - 46	35	60.5				
VIII	47 - 52	40	69.1				
IX	53 - 59	47	81				

^a Falla operacional del reactor

3.5 Métodos analíticos

Las determinaciones de DQO, SST y SSV se realizaron de acuerdo a los métodos estándar APHA 5220, 2540-B y 2540-E, respectivamente (APHA, 1997). Los azúcares reductores (AR) y AT se realizaron por el método ácido 3,5-dinitrosalicílico y ácido sulfúrico-fenol, respectivamente (DuBois et al., 1956; Miller, 1959). La medición del volumen de gas producido se realizó empleando un medidor de gas por desplazamiento de agua (modelo MVG-10, Prendo, México). La composición del gas (H_2 y CO_2) se determinó empleando cromatografía de gases con detector de conductividad térmica, siguiendo el procedimiento previamente descrito (Carrillo-Reyes et al., 2012; Contreras-Dávila et al., 2016). Los metabolitos producidos fueron cuantificados mediante electroforesis capilar de acuerdo a lo establecido previamente (Davila-Vazquez et al., 2008).

3.6 Evaluación del desempeño del reactor

La evaluación del desempeño del reactor se realizó en base a las variables de respuesta: VVPH, RMH, REH, costo de producción de H_2 (\$ MN/L H_2) y porcentaje de acetato homoacetogénico. En la Tabla 2 se muestran las ecuaciones utilizadas para calcular dichas variables en función de lo establecido en trabajos previos (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018). Complementando esta información en el Anexo 2 se muestra de forma explícita los cálculos realizados de REH y costo de producción de H_2 para el periodo I (34.6 g DQO/L·d) de la etapa 1, es importante mencionar que los cálculos de estas dos variables de respuesta se realizaron de la misma forma para todos los periodos evaluados. El volumen de H_2 se reportó a condiciones estándar (0 °C y 1 atm). Se realizó un balance de masa del TBR en término de equivalentes de electrones (eq e^-), siguiendo el procedimiento establecido previamente (Contreras-Dávila et al., 2017).

Tabla 2. Ecuaciones utilizadas para evaluar el desempeño del reactor.

Ecuaciones	Variables
$VVPH = \frac{V_{H_2 \text{ producido}}}{t * V_r} \quad (4)$	t = Tiempo.
$RMH = \frac{\text{mol } H_2 \text{ producido}}{\text{mol AT}_{\text{consumido}}} \quad (5)$	V _r = Volumen del reactor (1.5 L).
$REH = \frac{VVPH * V_r * \frac{Vol_{\text{hidrolizado}}}{Vel_{\text{consumo}}}}{[\text{sustrato}]} \quad (6)$	1 mol AT = 1 mol glucosa.
$\text{Costo producción } H_2 = \frac{\$ \text{ L de hidrolizado}/[\text{sustrato}]}{REH} \quad (7)$	Vol _{hidrolizado} = Volumen de hidrolizado obtenido en el reactor 10 L.
$\text{Acet. homoacetogénico} = \frac{2[Ace] + 2[But] - [Prop] - H_2}{6} \quad (8)$	Vel _{consumo} = Volumen de hidrolizado consumido por día en función de la carga orgánica.
$\% \text{ Acet. homoacetogénico} = \left(\frac{\text{Acetato homoacetogénico}}{\text{Acetato total}} \right) * 100 \quad (9)$	[sustrato] = Cantidad de bagazo empleado en la hidrólisis.

3.7 Análisis estadístico

Los valores reportados en la sección de resultados y discusión están en términos de media ± desviación estándar. Para evaluar el efecto de la COV en ambos reactores, tomando como base las distintas variables de respuesta (VVPH, RMH, REH y porcentaje de acetato homoacetogénico), se realizó un análisis de varianza, mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), así como un análisis de correlación empleando la prueba r de Spearman ($p < 0.05$). Es importante mencionar que estos análisis estadísticos se realizaron a partir de los valores promedio de los estados estables determinados durante la operación del TBR. Dichos análisis se realizaron en el software Graph Pad® versión 7.3.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Hidrólisis enzimática

Para caracterizar los hidrolizados enzimáticos se siguieron las cinéticas de hidrólisis de los tres primeros lotes tomando muestra cada 2 horas con la finalidad de definir el tiempo óptimo de reacción en términos de DQO y AT. Los hidrolizados, tanto de la mezcla enzimática como de la enzima individual se realizaron con el mismo lote de bagazo. Es importante mencionar que en otros trabajos previos se observó una diferencia de los resultados de la hidrólisis en función del lote de bagazo de agave empleado (Contreras-Dávila et al., 2017).

La Figura 4 muestra los resultados de la caracterización de la hidrólisis empleando la mezcla enzimática. El tiempo de reacción donde se alcanzaron las mayores concentraciones fue de 6 horas. Los valores de DQO soluble, AT y AR de dichas cinéticas fueron de 47.3 ± 2.5 g DQO/L, 15 ± 1.8 g AT/L y 8.17 ± 1.72 g AR/L, respectivamente. En base a estos resultados, el tiempo empleado en las subsecuentes hidrólisis fue de 6 horas, ya que se observó que después de este tiempo no hubo un aumento de la DQO soluble y AT.

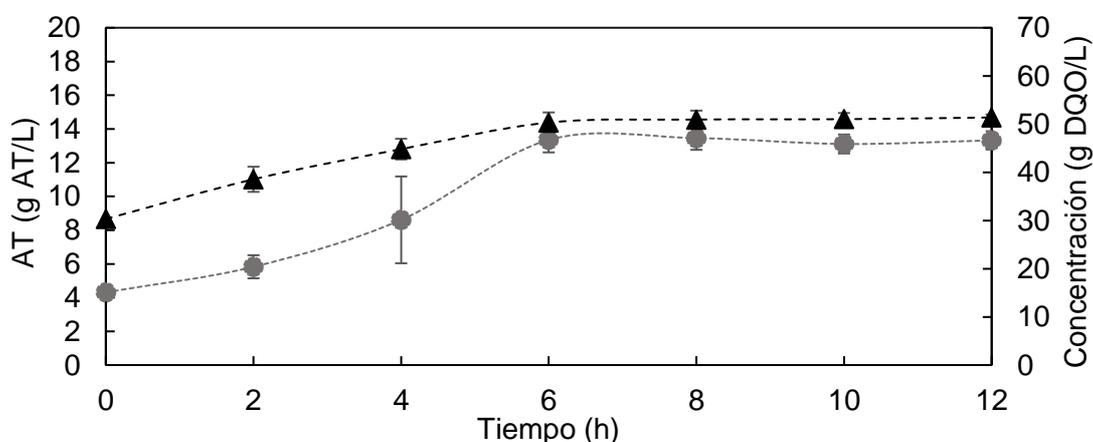


Figura 4. Caracterización de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos a partir de la mezcla enzimática en función de los AT (●) y DQO (▲).

En el caso de la hidrólisis empleando la enzima individual, la Figura 5 muestra los resultados de la cinética de reacción, donde el tiempo de hidrólisis en que se alcanzaron las mayores concentraciones fue de 7 horas, el cual fue el tiempo empleado en las subsecuentes hidrólisis. Los valores de DQO soluble, AT y AR de dichas cinéticas fueron de 59.2 ± 1.9 g DQO/L, 18.5 ± 2.1 g AT/L y 13.9 ± 0.78 g AR/L, respectivamente.

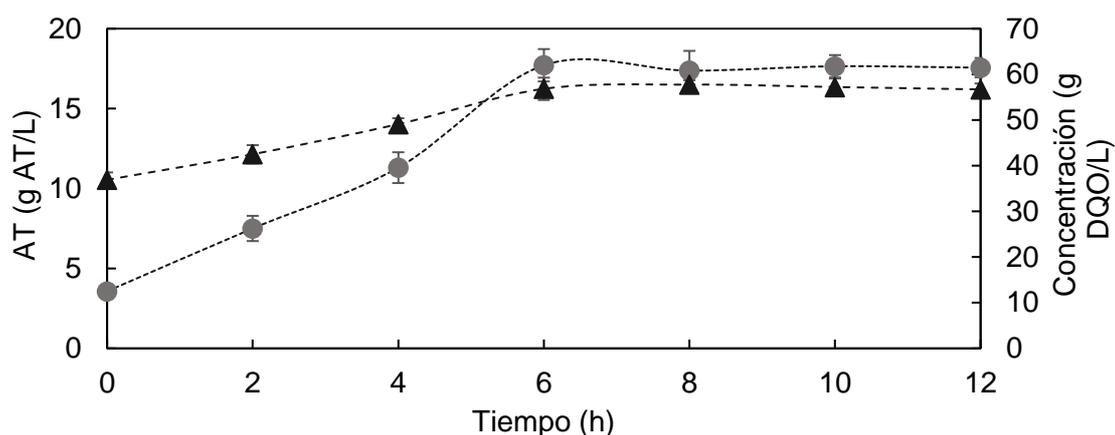


Figura 5. Caracterización de los hidrolizados de bagazo de agave obtenidos a partir de la enzima individual en función de los AT (●) y DQO (▲).

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos de las hidrólisis tanto para la mezcla enzimática como para la enzima individual. En el caso de la mezcla enzimática los valores promedio de DQO soluble y AT considerando los 9 lotes realizados fueron de 47.1 ± 2.5 g DQO/L y 15.1 ± 1.4 g AT/L, respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos con el promedio de las primeras tres cinéticas, por lo que se puede considerar que el tiempo de hidrólisis de 6 h establecido fue adecuado. De forma similar para la enzima individual los valores promedio de DQO soluble y AT considerando los 7 lotes realizados (58.8 ± 1.7 g DQO/L y 18 ± 1.5 g AT/L, respectivamente) son muy similares a lo obtenido con las primeras tres cinéticas, demostrando que el tiempo de hidrólisis de 7 h fue adecuado.

Tabla 3. Características y duración de los hidrolizados enzimáticos de cada uno de los lotes alimentados al TBR.

Mezcla enzimática				Enzima individual			
Lote	Periodo	g DQO/L	g AT/L	Lote	Periodo	g DQO/L	g AT/L
	de uso				de uso		
	(d)				(d)		
1	1-9	46.5 ± 0.9	15.4 ± 0.7	1	1-7	60.8 ± 1.2	19.4 ± 0.8
2	10-17	49 ± 1	15 ± 0.8	2	8-15	58.5 ± 0.8	18.7 ± 1.1
3	18-24	47.5 ± 0.9	14.8 ± 0.5	3	15-20	59.1 ± 1.2	18 ± 0.9
4	25-31	46.7 ± 0.7	15.4 ± 1	4	21-25	57.7 ± 0.8	17 ± 1
5	32-39	47.7 ± 1.2	15.6 ± 0.9	5	25-30	59.7 ± 1.2	17.6 ± 0.8
6	40-45	48 ± 1.4	14.6 ± 1.1	6	31-35	58.3 ± 0.8	18.6 ± 0.7
7	46-50	45.8 ± 0.9	14.9 ± 0.8	7	36-40	57.8 ± 1.1	16.9 ± 1.1
8	51-55	48.1 ± 1.5	14.9 ± 1.2				
9	56-59	47.5 ± 1	15 ± 0.7				

Un aspecto que es importante considerar al momento de determinar los rendimientos de sacarificación de la hidrólisis es la aportación inicial que tienen las enzimas en los hidrolizados con respecto a DQO y AT. La aportación inicial se puede conocer al tiempo 0 h de la hidrólisis, ya que en este punto aún no comienza la reacción de sacarificación por lo que el valor tanto de DQO y AT corresponde únicamente a la enzima. Para el caso de la mezcla enzimática, está tiene una aportación aproximada del 58% y 32%, respectivamente, donde en términos de concentración corresponde a 30 g DQO/L y 4.3 g AT/L (Figura 4). Por otro lado, la enzima individual tiene una aportación aproximada del 65% y 20% para DQO y AT, respectivamente, donde en términos de concentración corresponde a 37 g DQO/L y 4.3 g AT/L (Figura 5). El rendimiento de la hidrólisis con la mezcla sin corregir fue de 0.3 g AT/g bagazo y 0.846 g DQO/g bagazo, mientras que los rendimientos corregidos fueron de 0.23 g AT/g bagazo y 0.35 g DQO/g bagazo. Estos resultados son mayores a los obtenidos con la enzima individual; sin corregir los valores fueron de 0.23 g AT/g bagazo y 0.75 g DQO/g bagazo, mientras que los rendimientos corregidos fueron de 0.184 g AT/g bagazo y 0.26 g DQO/g bagazo. Es importante mencionar, que los rendimientos de sacarificación con ambos hidrolizados de este trabajo se encuentran dentro del intervalo reportado por Contreras-Dávila et al. (2017) que fue de 0.19 a 0.38 g AT/g bagazo de agave, en hidrolizados enzimáticos empleando Celluclast 1.5L.

Conocer la contribución de la enzima o las enzimas en los procesos de sacarificación de residuos lignocelulósicos es de gran importancia ya que permite estimar que proporción de los AT proviene realmente del residuo sometido a una sacarificación. Sin embargo, para efecto de este trabajo la aportación de la enzima se considera al momento de evaluar el desempeño del TBR para la producción de H₂. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones de DQO y AT son mayores para la enzima individual en comparación con la mezcla, en términos de proporciones los AT representan 31% del total de la DQO para ambos casos. Este resultado muestra que al momento de establecer la COV tomando como base la DQO, la cantidad de AT disponible en la fermentación oscura es similar en ambos casos. Una posible explicación de esta diferencia es que para el caso de la enzima individual la hidrólisis se realizó a una mayor concentración de sustrato (7.8%) en comparación con la mezcla (5%).

Proporciones similares de AT en términos de DQO han sido reportados previamente en hidrolizados enzimáticos de paja de avena (Arreola-Vargas et al., 2013) y bagazo de agave (Contreras-Dávila et al., 2017; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018) obtenidos con Celluclast 1.5L.

4.2 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con una mezcla enzimática.

El TBR fue operado por 59 días, dividido en 9 periodos a diferentes condiciones de COV descritas en la Tabla 1. Durante la operación del reactor el porcentaje de H₂ en el gas fue en promedio de 45.4 ± 3.8%, no se observó metano en la composición del gas durante toda la operación del reactor. La concentración de biomasa en el efluente a lo largo de la operación del TBR fue de 1.69 ± 0.11 g SSV/L, la cual es menor a lo reportado en reactores de biomasa suspendida donde se reportan valores entre 2 y 4.5 g SSV/L (Contreras-Dávila et al., 2017; Han, Hu, et al., 2016; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018). A pesar de que se observó crecimiento de biomasa en el material de empaque, al final de la operación del TBR, 84% de la fracción vacía ($\epsilon = 0.58$) del reactor se mantuvo, es decir, no se observó un crecimiento excesivo de biomasa. Este resultado se puede deber a factores como el arreglo vertical de los tubos de polietileno que permitió un desprendimiento de biomasa continuo logrando tener una biopelícula uniforme y resistente a lo largo del reactor. Además al no ser un reactor completamente inundado se evitó un crecimiento excesivo de biomasa y por ende de taponamiento en el material soporte (Arreola-Vargas et al., 2015; Contreras-Dávila et al., 2017).

La Figura 6, muestra el desempeño del TBR en función de la COV. Durante los periodos I, II y III, la COV incrementó de 34.6 a 52.9 g DQO/L·d, resultando en un incremento en la VVPH (Tabla 4). Sin embargo, un incremento de la COV a 60.48 g DQO/L·d (periodo IV) provocó una rápida disminución de la VVPH debido a problemas operativos relacionados con el taponamiento en el aspersor. Por lo que en el periodo V la COV se estableció de nuevo en 52.9 g DQO/L·d con la finalidad de estabilizar el TBR. En el periodo VI, la configuración del reactor fue modificada al incluir un clarificador (Figura 3), reduciendo la biomasa presente en las conexiones de recirculación y evitando el taponamiento. Una vez estabilizada la VVPH, la COV se incrementó a 60.48 y 69.1 g DQO/L·d en los

periodos VII y VIII, respectivamente. Durante el periodo IX, se utilizó la máxima concentración de sustrato (47 g DQO/L) ya que se alimentó el hidrolizado sin diluir, resultando una COV de 81 g DQO/L-d. En este periodo se alcanzó la VVPH más alta, 5.75 L H₂/L-d.

La VVPH obtenida en el último periodo es mayor a lo reportado en otros trabajos con hidrolizados lignocelulósicos en reactores TBR. Tal es el caso de Contreras-Dávila et al (2017) que reportan una máxima VVPH de 3.45 L H₂/L-d a una COV de 52.9 g DQO/L-d usando hidrolizados enzimáticos obtenidos con la enzima Celluclast 1.5L. Por otro lado, Arreola-Vargas et al (2015) empleando hidrolizados enzimáticos de paja de avena usando la misma enzima, reportan una máxima VVPH de 0.623 L H₂/L-d a una COV de 10 g DQO/L-d.

De igual forma, en la Figura 6 se observa el efecto de la COV en la velocidad de consumo de AT. Se puede apreciar de forma clara que esta velocidad de consumo aumenta en función de la COV obteniendo valores de 8.67 ± 0.6 , 11.81 ± 0.8 , 14.11 ± 1 , 16 ± 0.7 , 19.3 ± 0.8 y 21.58 ± 0.9 g AT/L-d a COV de 34.6 (periodo I), 43.2 (periodo II), 52.9 (periodo III), 60.48 (periodo VII), 69.12 (periodo VIII) y 81 g DQO/L-d (periodo IX), respectivamente. Este efecto positivo de la COV en la velocidad de consumo de AT se puede deber a que durante la operación del reactor el porcentaje de remoción de AT fue muy similar en todos los periodos, presentado un valor promedio de $86.3 \pm 3.9\%$ (Tabla 4).

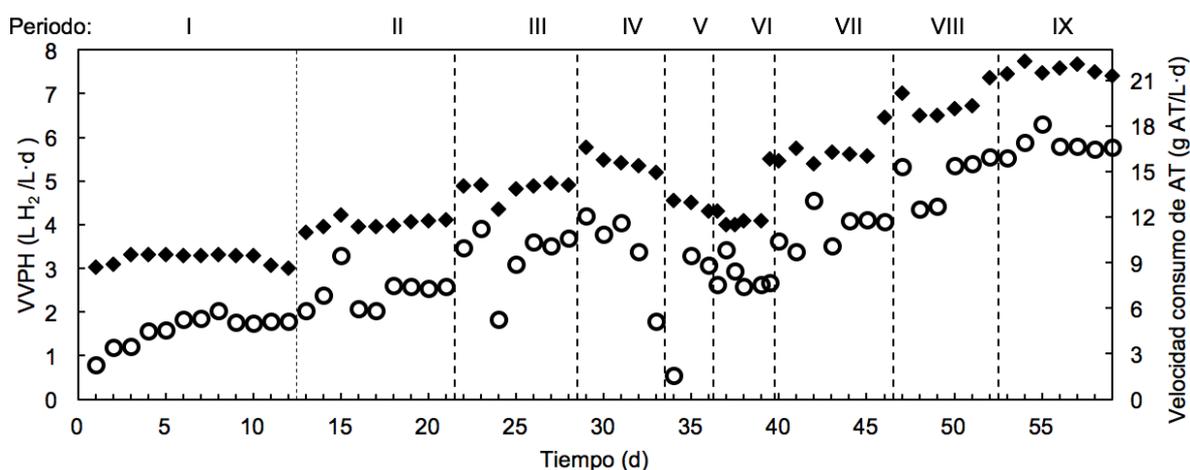


Figura 6. Desempeño del TBR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática. VVPH (●), Consumo AT (◆).

En términos de RMH, el sistema fue bastante estable con valores entre 1.70 ± 0.09 y 2.52 ± 0.18 mol H₂/mol glucosa consumido, tal como se muestra en la

Tabla 4. Complementando esta información, en el Anexo 3 se presentan los balances estequiométricos de los estados estables del TBR considerando el crecimiento celular teórico que se puede dar en los sistemas fermentativos (Lee & Rittmann, 2009). A partir de estos balances, los valores de RMH obtenidos fueron de 1.75, 1.8, 2.1, 2.2, 2.55 y 2.47 mol H₂/mol glucosa consumido para los periodos I, II, III, VII, VIII y IX, respectivamente, los cuales son muy similares a los RMH determinados a partir de las ecuaciones (1), (2) y (5). Esta similitud demuestra que los RMH son el resultado de un conjunto de reacciones químicas y biológicas que de forma simultánea se realizan en procesos fermentativos, por lo que su cuantificación se puede realizar tanto con balances estequiométricos como con las ecuaciones mencionadas. Cabe destacar que en el caso del RMH no se observa una relación clara con la COV (R= 0.8857, p= 0.0583). Es importante mencionar que los valores del RMH son mayores a los reportados por diversos autores en reactores TBR empleando hidrolizados enzimáticos (Celluclast 1.5L) los cuales reportan un RMH entre 0.28 y 1.53 mol H₂/ mol glucosa consumida (Arreola-Vargas et al., 2015; Contreras-Dávila et al., 2017).

Para el caso de los REH, estos variaron de 41.9 ± 1.1 a 73.2 ± 1.1 L H₂ /kg de bagazo, mostrando un aumento en función de la COV. El análisis de los metabolitos reveló que la producción del H₂ fue resultado de una fermentación tipo acetato-butirato. Estos metabolitos se mantuvieron en concentraciones similares a lo largo de los estados estables de operación, donde el acetato tuvo concentraciones entre 2.8 ± 0.7 y 3.58 ± 0.6 g/L, mientras que el butirato presentó valores entre 2.44 ± 0.8 y 4.85 ± 0.1 g/L.

Del proceso del TBR, el acetato homoacetogénico estimado teóricamente fue entre 15.72 ± 0.3 y 34.73 ± 0.2% del acetato total cuantificado (Tabla 4). Los resultados demuestran que la disminución en la actividad homoacetogénica es directamente proporcional al incremento en la COV (R= -0.8857, p= 0.033). Una posible explicación a esta tendencia podría ser el hecho que, al tener una mayor cantidad de sustrato orgánico en el sistema, las bacterias fermentativas prefieren tomar dicho sustrato para llevar a cabo funciones como crecimiento, reproducción y mantenimiento, en lugar de tomar una fuente de carbono inorgánico como CO₂.

Tabla 4. Desempeño del TBR con la mezcla enzimática en la producción de H₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional. En todos los casos las mediciones se realizaron a n=3.

Periodo	COV (g DQO/L·d)	VVPH (L H ₂ /L·d)	Remoción de AT (%)	RMH (mol H ₂ /mol glucosa)	Acetato homoaceto génico (%)	REH (L H ₂ /kg bagazo)	Concentración de metabolitos (g/L)		
							Acetato	Lactato	Butirato
I	34.6	1.79 ± 0.09	87 ± 1.5	1.80 ± 0.07	34.73 ± 0.2	49.0 ± 1.1	3.40 ± 0.8	0.34 ± 0.2	2.44 ± 0.8
II	43.2	2.56 ± 0.02	90 ± 1	1.70 ± 0.09	37.17 ± 0.1	55.8 ± 1.0	3.56 ± 0.4	0	3.46 ± 0.6
III	52.9	3.61 ± 0.08	87 ± 2.1	2.01 ± 0.06	27.94 ± 0.3	65.7 ± 1.3	2.88 ± 0.7	0.97 ± 0.2	3.44 ± 0.9
IV ^a	60.5	3.41 ± 0.97	80 ± 10	1.72 ± 0.55	34.12 ± 0.8	53.7 ± 14.1	2.61 ± 0.4	0.53 ± 0.1	4.21 ± 0.7
V ^a	52.9	2.30 ± 1.52	78 ± 16	1.57 ± 1.07	28.14 ± 0.9	41.9 ± 27.1	1.74 ± 0.8	1.12 ± 0.6	2.51 ± 0.4
VI	43.2	2.61 ± 0.12	90 ± 2.2	1.78 ± 0.1	26.97 ± 0.4	58.2 ± 1.3	3.21 ± 0.9	0.37 ± 0.1	3.06 ± 0.4
VII	60.5	4.11 ± 0.09	86 ± 1.4	2.14 ± 0.06	20.32 ± 0.2	68.2 ± 1.1	3.58 ± 0.6	0.51 ± 0.2	2.98 ± 0.8
VIII	69.1	5.49 ± 0.08	88 ± 1.2	2.52 ± 0.18	15.72 ± 0.3	73.2 ± 1.1	3.20 ± 0.3	0.25 ± 0.1	4.50 ± 0.2
IX	81	5.75 ± 0.07	85 ± 2.1	2.40 ± 0.76	16.11 ± 0.1	67.8 ± 0.34	2.97 ± 0.1	0.10 ± 0.1	4.85 ± 0.1

^a Valor promedio de todos de los puntos de dicho periodo

De acuerdo al balance de electrones los metabolitos predominantes en esta etapa, acetato y butirato, principalmente, representan en promedio 40% de los equivalente de electrones disponibles (Figura 7). El H₂ producido representa entre 4 y 6% del total de electrones. El azúcar residual que no logró ser fermentado en el reactor representa entre 4 y 7%.

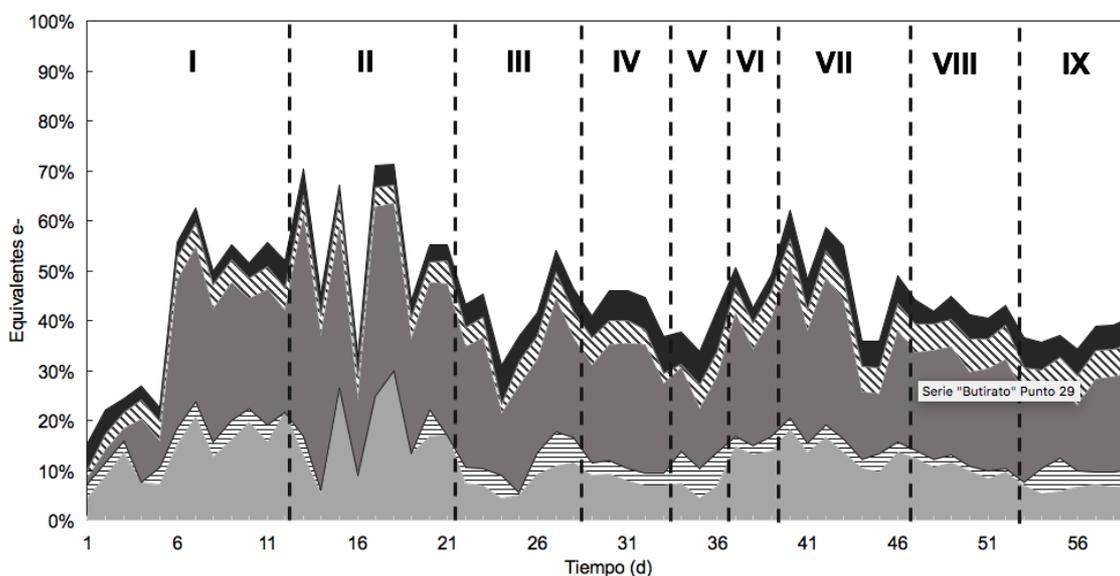


Figura 7. Balance de electrones para el TBR empleando los hidrolizados a partir de la mezcla enzimática. Acetato (■), lactato (▨), butirato (▩), H₂ (▧), AT residual (▦), no definido (□)

De acuerdo a lo establecido en trabajos previos el porcentaje de equivalentes de electrones no definido puede corresponder a la biomasa presente en el efluente así como a la biomasa inmobilizada en los soportes del reactor y otros subproductos no cuantificados. En la Tabla 5 se muestra el balance de electrones para días específicos de los principales estados estables de producción de H₂. Este balance incluye los SSV del efluente de tales días. Considerando estos SSV se logró cuantificar entre 56 y 70% del total de equivalentes de electrones que entraron al sistema, siendo lo restante la biomasa retenida en el reactor, otros metabolitos no cuantificados y muy probablemente exopolímeros propios de la biopelícula formada en el material del soporte.

Tabla 5. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del TBR que empleó los hidrolizados obtenidos con la mezcla enzimática.

Equivalentes de e- (%)	Periodo (día)					
	I (12)	II (21)	III (28)	VII (46)	VIII (52)	IX (59)
Acetato	20.8	16.23	11.01	13.13	9.37	6.73
Butirato	19.61	28.84	18.94	21.47	21.30	19.22
Lactato	0	1	0.77	1.86	0.65	3.2
H ₂	4.15	4.25	4.81	5.35	6.88	5.54
Azúcar residual	5.30	3	4.32	5.24	3.70	5.14
Biomasa efluente	14.5	17.4	19.2	16.2	15.1	16.5
Total	64.3	70.72	59	63.25	57	56.3

4.3 Producción de hidrógeno a partir de hidrolizados enzimáticos obtenidos con una enzima individual.

El TBR operó por 40 días, dividido en 6 periodos a diferentes condiciones de COV descritas en la Tabla 1. El porcentaje de H₂ en el gas a lo largo de la operación del reactor fue, en promedio, de $29 \pm 2.5\%$, este valor fue menor a lo reportado en con la mezcla enzimática. De igual forma a lo reportado en la etapa 1 no se tuvo presencia de metano en el gas. La concentración de biomasa a la salida del reactor fue de 1.87 ± 0.24 g SSV/L, la cual es muy similar a lo obtenido en la primera etapa (1.69 ± 0.11 g SSV/L). Esta similitud demuestra que el TBR se caracteriza por tener baja pérdida de biomasa por lavado celular en comparación a lo reportado en reactores de biomasa suspendida, debido probablemente a la presencia del material del soporte y a su arreglo vertical (Contreras-Dávila et al., 2017; Han, Hu, et al., 2016; Montiel Corona & Razo-Flores, 2018). La fracción vacía del reactor fue de un 86% ($\epsilon = 0.60$) de la fracción inicial, lo cual es muy cercano a lo obtenido en la primera etapa (84%), este resultado de forma indirecta podría afirmar que en ambas etapas se tuvo un crecimiento similar de biomasa dentro del reactor a pesar que el hidrolizado alimentado fue diferente.

La Figura 8, muestra el desempeño del reactor en función de la COV. En términos de VVPH se puede observar que no se observó un aumento sustancial de esta variable con respecto a la COV, ya que considerando el periodo I y V la

VVPH aumentó de 1.23 a 1.98 L H₂/L·d. En el periodo VI se evaluó el efecto de los sólidos del hidrolizado en el desempeño del reactor. Los resultados muestran que los sólidos no tienen ningún efecto en el desempeño del TBR ya que la VVPH fue similar a lo obtenido en el periodo V a la misma COV, es decir, que los compuestos solubles presentes en el hidrolizado son la fracción principal utilizada por los microorganismos para producir H₂.

La máxima VVPH obtenida en este trabajo fue de 1.98 L H₂/L·d a una COV de 81 g DQO/L·d, la cual fue menor a lo reportado por otros trabajos a COV mayores de 52 g DQO/L·d y a lo obtenido en la primera etapa del trabajo en reactores TBR (Contreras-Dávila et al., 2017). De igual forma, en la Figura 8 se muestra el efecto de la COV en la velocidad de consumo de AT. Se puede observar que en los primeros periodos (I, II, III) se ve un ligero efecto positivo del aumento de la COV sobre la velocidad de consumo de AT. Sin embargo, a partir del periodo III esta velocidad se mantuvo constante, mostrando un umbral máximo de consumo de aproximadamente 13.5 ± 0.8 g AT/L·d. Esta tendencia se puede deber a que la eficiencia de remoción de AT en el sistema fue disminuyendo conforme aumentaba la COV (Tabla 6). Caso contrario, este comportamiento no fue observado con la mezcla enzimática, donde se mostró un efecto positivo de la COV sobre la velocidad de consumo de AT reflejándose en altas remociones y velocidades de consumo de AT.

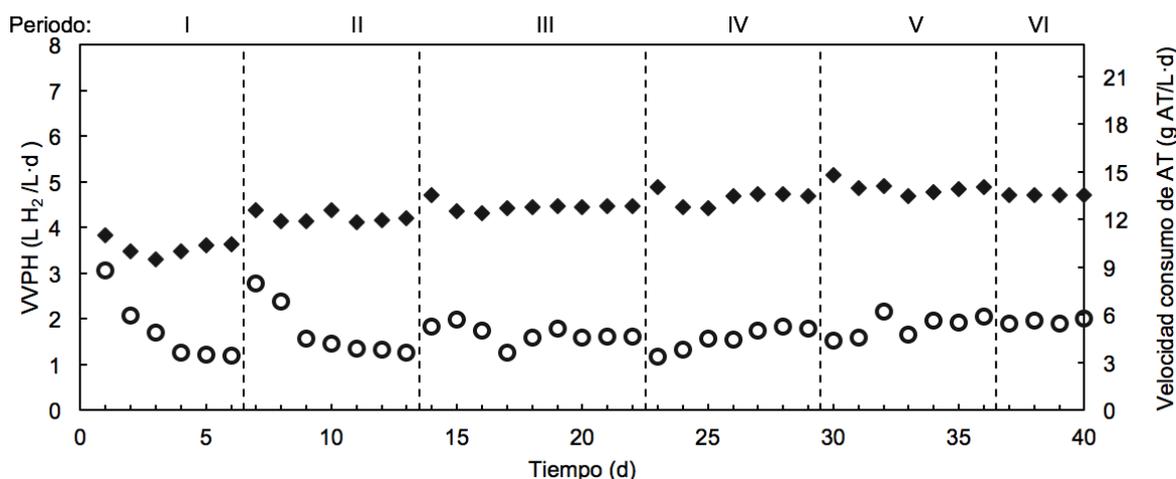


Figura 8. Desempeño del TBR durante los distintos periodos de operación empleando los hidrolizados obtenidos con una enzima individual. VVPH (○), Consumo AT (◆).

En la Tabla 6 se muestran los valores de RMH los cuales se encuentran entre 1.04 ± 0.02 y 1.28 ± 0.01 mol H₂/mol glucosa consumido. Tal como se realizó

para la etapa 1, en el Anexo 2 se presentan los balances estequiométricos considerando el crecimiento celular para esta etapa. Los valores de RMH obtenidos fueron de 1, 0.85, 1, 1.26, 1.32 y 1.3 mol H₂/mol glucosa consumido para los periodos I, II, III, IV, V y VI, respectivamente. Estos valores son muy similares a los presentados en la Tabla 6, lo cual además coincide con lo reportado para la etapa 1 del trabajo. No obstante, los valores de RMH fueron sustancialmente menores a lo obtenido en la primera etapa. Sin embargo, al igual que lo presentando en la etapa 1, no se observa una relación clara y estadísticamente significativa del RMH con la COV (R=0.7, p=0.233).

Para el caso del REH no se observó un efecto positivo del aumento de la COV, ya que el máximo valor obtenido fue de 21 L H₂/kg bagazo a la menor COV evaluada de 43.2 g DQO/L·d. Los metabolitos producidos principalmente fueron acetato y butirato. El acetato presentó concentraciones entre 2.02 ± 0.9 y 3.44 ± 0.4 g/L, mientras que el butirato tuvo valores entre 3.29 ± 0.4 y 5.02 ± 0.2 g/L (Tabla 6). Sin embargo, caso contrario a lo observado en la etapa 1 del trabajo en esta etapa se tuvieron concentraciones considerables de lactato de entre 0.5 ± 0.3 y 1.51 ± 0.3 g/L. La presencia de este metabolito y por lo tanto de bacterias productoras de lactato (LAPB, por sus siglas en ingles) pudieron haber afectado la producción de H₂ en el reactor, debido a que existe una competencia por el sustrato entre las LAPB y las bacterias productoras de H₂, así como por la posible excreción de bacteriocinas por las LAPB (Wan et al., 2016). La producción de lactato conduce a tasas de producción de H₂ nulas o bajas, mientras que las bacteriocinas tienen propiedades antimicrobianas frente a otras bacterias, como *Clostridium spp* (Saady, 2013).

El acetato homoacetogénico estimado teóricamente fue entre 57.25 ± 0.7 y 39.97 ± 0.4% del acetato total cuantificado (Tabla 6). Los resultados demuestran que la disminución en la actividad homoacetogénica es directamente proporcional al incremento en la COV (R= -0.95, p=0.0167). A pesar de que se observó una disminución de la actividad homoacetogénica en función de la COV, el acetato homoacetogénico en esta etapa fue mayor a los valores estimados en la etapa 1 cuando , siendo otra posible razón por la cual se obtuvieron menores VVPH ya que se tuvo un mayor consumo de H₂ para generar acetato.

Tabla 6. Desempeño del TBR con la enzima individual en la producción de H₂ y metabolitos en los estados estables de cada periodo operacional. En todos los casos las mediciones se realizaron a n=3.

Periodo	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	Remoción de AT (%)	RMH (mol H ₂ /mol glucosa)	Acetato homoaceto génico (%)	REH (L H ₂ /kg bagazo)	Concentración de metabolitos (g/L)		
							Acetato	Lactato	Butirato
I	43.2	1.23 ± 0.03	80 ± 2.1	1.04 ± 0.02	57.25 ± 0.7	21 ± 0.74	2.92 ± 0.5	0.52 ± 0.3	5.02 ± 0.2
II	52.9	1.31 ± 0.04	78 ± 1.2	0.87 ± 0.03	51.43 ± 0.6	17.7 ± 0.86	3.26 ± 0.1	1.34 ± 0.1	4.28 ± 0.3
III	60.5	1.61 ± 0.02	72 ± 1.7	1.00 ± 0.06	45.67 ± 0.2	19.35 ± 0.3	3.03 ± 0.2	1.51 ± 0.3	3.29 ± 0.4
IV	69.1	1.78 ± 0.03	67 ± 1.9	1.22 ± 0.01	44.69 ± 0.9	18.17 ± 0.6	3.44 ± 0.4	1.28 ± 0.1	3.92 ± 0.1
V	81	1.98 ± 0.07	60 ± 2	1.28 ± 0.01	42.88 ± 0.2	16.4 ± 0.93	2.02 ± 0.9	1.20 ± 0.1	3.36 ± 0.2
VI	81	1.96 ± 0.05	58 ± 2.2	1.27 ± 0.03	39.97 ± 0.4	16.15 ± 0.7	2.04 ± 0.1	1.23 ± 0.2	3.72 ± 0.1

En la Figura 9 se presenta el balance de electrones de la operación del TBR con la enzima individual, en este balance se puede observar que los tres metabolitos predominantes (acetato, butirato y lactato) representan en promedio 50% de equivalentes de electrones disponibles. El H₂ producido representa entre 2 y 3% del total de los electrones. Mientras que en el caso del azúcar residual se puede observar que el porcentaje de equivalentes de electrones aumenta en función de la COV siendo en el último periodo en promedio 20% de los electrones disponibles, lo cual se debe a que se presentó una disminución de remoción de AT en el sistema conforme se aplicaron COV mayores.

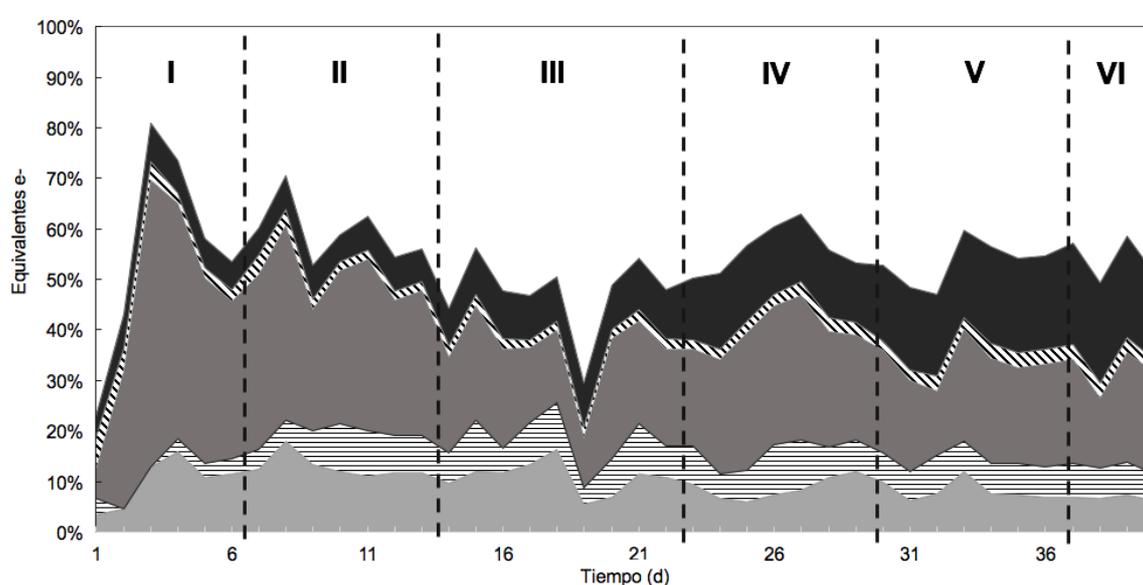


Figura 9. Balance de electrones para el TBR empleando los hidrolizados a partir de la enzima individual. Acetato (■), lactato (▨), butirato (▩), H₂ (▧), AT residual (▦), no definido (□).

De igual manera a lo realizado en la etapa 1, en la Tabla 7 se puede observar el balance de equivalentes de electrones de los estados estables de producción de H₂ de los 6 periodos evaluados en esta etapa. Al considerar los SSV en el efluente del TBR de tales días se cuantificó entre el 67 y 74 % del total de los equivalentes de electrones, estos valores son muy similares a los obtenidos en la etapa 1 donde se logró cuantificar entre el 56 y 70 % del total de electrones.

Tabla 7. Balance de electrones de días específicos de los estados estables del TBR que empleó los hidrolizados obtenidos con la enzima individual.

Equivalentes de e- (%)	Periodo (día)					
	I (6)	II (13)	III (22)	IV (29)	V (36)	VI (40)
Acetato	11.47	11.76	10.83	11.96	6.83	6.10
Butirato	31.34	28.78	19.30	20.75	20.48	19.98
Lactato	2.9	7.25	6.11	6.24	5.95	5.42
H ₂	2.19	1.72	2.1	2.43	3	2.67
Azúcar residual	5.45	6.39	9.73	11.93	18.46	17.07
Biomasa efluente	16.5	14.12	18.7	15.77	19.21	16.21
Total	69	70	66	69	74	67.4

4.4 Efecto de la hidrólisis enzimática en la producción de hidrógeno

La Figura 10, muestra los resultados obtenidos del análisis de REH y VVPH en función de la COV en el TBR para las dos etapas. Para el caso de la mezcla enzimática el análisis estadístico demuestra que existe un efecto significativo de la COV tanto en la VVPH como en el REH (Kruskall-Wallis, $p < 0.001$ en ambos casos). Para el caso de la VVPH, se observa que está directamente relacionada con el incremento en la COV ($R = 0.97$, $p = 0.0028$), mientras que en el caso del REH la relación lineal no es estadísticamente significativa ($R = 0.8857$, $p = 0.0583$). Sin embargo, se puede observar que existe un aumento substancial de esta variable de respuesta al comparar las cargas más bajas (34.6 y 43.2 g DQO/L·d) con las dos últimas cargas (69.12 y 81 g DQO/L·d).

El análisis estadístico de los resultados del TBR alimentado con hidrolizados obtenidos con la enzima individual demostró que no existe un efecto significativo de la COV tanto en la VVPH como en el REH (Kruskall-Wallis $p = 0.184$ y $p = 0.2362$, respectivamente). De igual forma que con la mezcla enzimática, para el caso de la VVPH se observa que está directamente relacionada con el incremento en la COV ($R = 0.96$, $p = 0.0167$), mientras que con respecto a REH no se observó un efecto positivo del aumento de la COV, ya que se presentó una relación inversamente proporcional donde el máximo valor obtenido fue de 21 L H₂/kg bagazo a la menor COV aplicada de 43.2 g DQO/L·d ($R = -0.70$, $p = 0.233$).

La relación positiva de la VVPH con la COV fue observada de igual forma por Contreras-Dávila et al. (2017) que reportaron que esta relación puede deberse a que en reactores TBR empleando tubos de polietileno como material de soporte, existe una mejor transferencia de masa líquido-gas y una mayor área interfacial (831 cm^2) en comparación con reactores de biomasa suspendida que reportan áreas interfaciales de 27 cm^2 con coeficientes de transferencia hasta 4 veces menores, impactando directamente en el coeficiente de transferencia de masa volumétrica y en el desempeño de la fermentación.

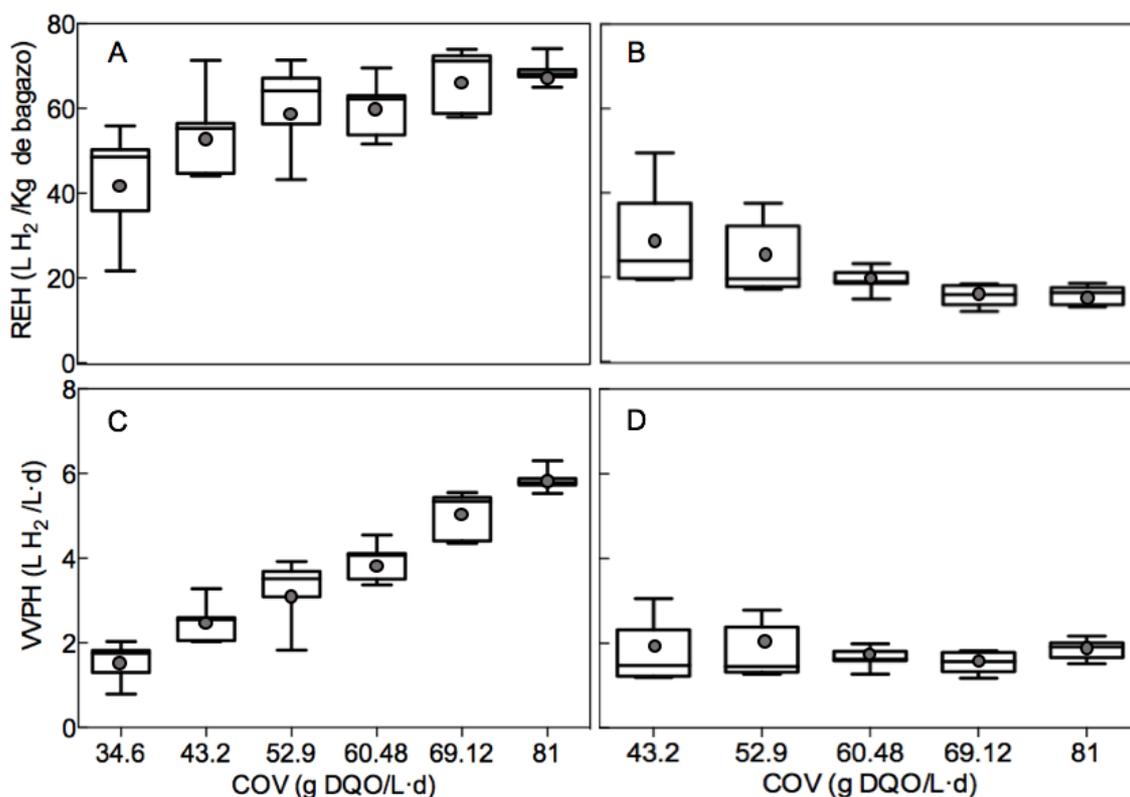


Figura 10. Diagrama de cajas que muestran el efecto de la COV en la VVPH y el REH en el TBR para los hidrolizados con la mezcla enzimática (A, C) y con la enzima individual (B, D). Las cajas están divididas por la mediana y contiene el 50% de los datos; (●) promedio de los valores; las líneas verticales indican la variabilidad fuera de los cuartiles superiores e inferiores.

De acuerdo con otros estudios, las características de los compuestos liberados durante la hidrólisis tienen un papel fundamental en los rendimientos de producción de H₂. Los monómeros de glucosa y xilosa, principalmente, son más fácilmente convertidos a H₂, en comparación con dímeros y oligómeros, los cuales, al ser de mayor complejidad estructural, hacen que su conversión a H₂ sea menor tanto en velocidad como en rendimiento (Elbeshbishy et al., 2017; Han et al., 2016). Las técnicas empleadas en esta investigación permiten realizar

la cuantificación de los carbohidratos reductores y totales. Sin embargo, no permiten diferenciar si corresponden a monómeros, dímeros, oligómeros y otros compuestos solubles posiblemente presentes en los hidrolizados.

De acuerdo a lo mencionado en secciones anteriores, las proporciones de AT representan 31% del total de la DQO para ambos hidrolizados, por lo que en un principio se esperaría que se tuvieran VVPH similares, lo cual no fue el caso. De acuerdo a los resultados obtenidos, con la enzima individual se observa que las VVPH y los REH son sustancialmente menores a los obtenidos con la mezcla enzimática a COV similares. Esta diferencia se podría deber a que el TBR mostró una menor capacidad de remoción de AT, lo cual puede deberse a la calidad de los hidrolizados, donde puede ser probable que en los hidrolizados a partir de la enzima individual se tuvieran mayores proporciones de oligómeros, en comparación con los hidrolizados de la mezcla enzimática, impactando directamente en la fermentación. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente las proporciones de AT, así como de AR son similares en ambos hidrolizado por lo que se tendría concentraciones de oligómeros semejantes. Por otro lado, a pesar de que se tienen proporciones similares de dichos compuestos, la estructura y complejidad de los compuestos liberados durante la sacarificación enzimática pueden ser diferentes, por lo que puede ser probable que los oligómeros generados con la enzima individual pueden ser de mayor complejidad y por lo tanto los tiempos de fermentación empleados en este trabajo (6h) no fueron los adecuados para lograr una mayor remoción de carbohidratos y por ende mayores producciones de H₂. Sin embargo, para confirmar tal aseveración es necesario caracterizar a mayor profundidad los tipos de carbohidratos presentes en los hidrolizados.

En la Tabla 8, se presentan los resultados de algunos trabajos que reportan el uso de hidrolizados enzimáticos de distintos tipos de biomasa lignocelulósica como sustrato en la producción continua de H₂ en reactores de biomasa fija y suspendida. Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con lo reportado en reactores CSTR en términos de VVPH y RMH. Específicamente, para el caso de reactores TBR la primera parte de este trabajo reporta la VVPH más alta en este tipo de reactor. Así mismo los hidrolizados tanto de la primera

como de la segunda etapa mostraron que el sistema tiene la capacidad de operar de forma estable a altas cargas obteniendo VVPH y RMH muy cercanos o incluso mayores a lo reportado en CSTR, el cual es el reactor más a utilizado en la actualidad para producir H_2 a partir de biomasa lignocelulósica.

Tabla 8. Producción de hidrógeno con hidrolizados enzimáticos en sistemas continuos.

Reactor	Sustrato	Condiciones de operacion	COV (g DQO/L-d)	VVPH (L H ₂ /L-d)	REH (L H ₂ /kg bagazo)	Referencia
CSTR	Bagazo de agave	Lodo anaerobio, 35 °C, pH 5.5, TRH 6 h	44	6	N.R.	Montiel-Corona & Razo- Flores (2018)
CSTR	Bagazo de agave	Lodo anaerobio, 37 °C, pH 5.5, TRH 6 h	52.5	2.53	55	Contreras-Dávila et al. (2017)
TBR	Bagazo de agave	Lodo anaerobio, 37 °C, pH 5.5, TRH 4 h	52.9	3.45	65.9	Contreras-Dávila et al. (2017)
TBR	Paja de avena	Ensilado de triticale, 35 °C, pH 5, TRH 12 h	10	0.623	N.R.	Arreola-Vargas et al. (2015)
TBR	Bagazo de agave	Lodo anaerobio, 37 °C, pH 5.5, TRH 6 h	81	5.75 ^a 1.98 ^b	67.8 ^a 16.5 ^b	Este estudio

^a Hidrolizado obtenido con la mezcla enzimática.

^b Hidrolizado obtenido con la enzima individual.

N.R. no reportado

En la Tabla 9 se puede observar el costo que tiene producir un litro de H₂ en continuo con diferentes COV. Esta estimación está en función de los precios de las enzimas empleadas y el REH obtenido en ambas etapas del trabajo. De acuerdo a las valoraciones realizadas, se puede observar que con la mezcla enzimática el costo de la hidrólisis por litro de H₂ va disminuyendo conforme aumenta la COV a excepción de la última carga donde el REH fue menor a lo obtenido en el periodo anterior; esta disminución se debe a que el REH aumenta de forma sustancial provocando una disminución en el costo de la hidrólisis, siendo menor que \$ 30.89 MN/L H₂ a una COV de 69.12 g DQO/L-d. Para el caso de la enzima individual se observa una tendencia contraria, es decir, que conforme aumenta la COV el costo de hidrólisis aumenta, esto se debe a que los REH son más bajos y con una relación inversa con respecto a la COV.

Al comparar el desempeño del TBR con ambos hidrolizados enzimáticos, se puede observar que los costos de hidrólisis con la enzima individual fueron menores debido principalmente a que el costo por mililitro de enzima es de \$ 0.42 MN, siendo mucho menor al costo de la mezcla enzimática que es de \$ 31 MN/mL enzima. Este costo menor se puede observar en las primeras COV donde con la enzima individual el costo por litro de H₂ es aproximadamente 50% menor en comparación con la mezcla. Sin embargo, a COV altas donde el REH es considerablemente mayor con la mezcla, el costo de la hidrólisis es muy similar entre ambos, con la ventaja de que con la mezcla enzimática se tienen mayores producciones de H₂ al mismo costo que lo obtenido con la enzima individual donde las velocidades son más bajas.

Tabla 9. Estimación del costo de producción de hidrógeno en función de la hidrólisis enzimática.

Mezcla enzimática				Enzima individual			
COV (g DQO/L·d)	REH (L H₂/kg bagazo)	VVPH (L H₂/L·d)	\$ MN /L H₂	COV (g DQO/L·d)	REH (L H₂/kg bagazo)	VVPH (L H₂/L·d)	\$ MN/L H₂
34.6	49	1.79	46.15	43.2	21	1.23	25.67
43.2	55.8	2.56	40.53	52.9	17.7	1.31	28.75
52.9	65.7	3.61	34.42	60.48	18.78	1.61	27.17
60.48	68.2	4.11	33.16	69.12	18.06	1.78	28.25
69.12	73.2	5.49	30.89	81	16.91	1.98	30.18
81	67.8	5.75	33.35				

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El hidrolizado enzimático de bagazo de agave es un sustrato viable para la producción de H_2 en sistemas continuos a altas COV, debido a la alta abundancia y concentración de carbohidratos presentes en el mismo.

Se demostró que el uso de la mezcla Celluclast 1.5L-Viscozyme L y Stonezyme conducen a un aumento substancial de los carbohidratos fermentables, con un subsecuente impacto positivo en el rendimiento de la producción de H_2 . Sin embargo, la calidad de los hidrolizados es un aspecto fundamental a considerar ya que, a pesar de tener proporciones similares de AT en ambos hidrolizados, se tuvieron diferencias considerables en VVPH y REH, debido posiblemente a que la calidad de los hidrolizados no es igual.

En el caso de los hidrolizados con la mezcla Celluclast 1.5L-Viscozyme L la máxima VVPH obtenida fue de 5.75 L H_2 /L·d a una COV de 81 g DQO/L·d, que es el valor más alto reportado para hidrolizados lignocelulósicos en TBR. Para el caso del hidrolizado con Stonezyme, la máxima VVPH obtenida fue de 1.98 L H_2 /L·d a una COV de 81 g DQO/L·d. Estos resultados muestran que los hidrolizados obtenidos con Stonezyme tienen una menor eficiencia de producción de H_2 en comparación con los hidrolizados obtenidos a partir de la mezcla Celluclast 1.5L-Viscozyme L. Así mismo, la producción de lactato como metabolito en la fermentación puede ser indicador de menores producciones de H_2 .

Para el caso de la mezcla Celluclast 1.5L-Viscozyme L el REH aumentó en función de la COV, reportando un valor de 67.8 L H_2 /kg bagazo a una COV de 81 g DQO/L·d. Por otro lado, los hidrolizados obtenidos con Stonezyme fueron sustancialmente menores a las mismas COV, reportando un valor de 16.92 L H_2 /kg bagazo a una COV de 81 g DQO/L·d. Los altos REH obtenidos con la mezcla Celluclast 1.5L-Viscozyme L permiten a altas COV obtener costos de producción de H_2 similares a lo reportado con Stonezyme, mientras que a bajas COV los costos de producción son sustancialmente menores con Stonezyme

debido a su bajo precio (MN \$0.42 /mL enzima) en comparación con la mezcla (MN \$31/mL enzima).

Finalmente, la estimación de consumo de H₂ demuestra que la actividad homoacetogénica es un metabolismo inherente a la fermentación oscura, pero que puede llegar a estar fuertemente influenciada por condiciones operacionales dentro del reactor, como la COV.

Perspectivas

- A pesar de que los hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave tuvieron un efecto positivo en la producción de H₂, en este trabajo se comprobó que una adecuada hidrólisis no solo radica en la cantidad de azúcares liberados sino también en la calidad de los mismos. Por lo que es fundamental realizar una caracterización completa de los hidrolizados en términos de tipos de azúcares, presencia de alcoholes, fenoles, oligómeros, polímeros e incluso de inhibidores.
- Se comprobó que el TBR tiene la capacidad de operar a altas COV. Sin embargo, el taponamiento del aspensor y las líneas de alimentación son aspectos que se deben mejorar a futuro en el sistema. En este trabajo, el uso de un clarificador en la línea de recirculación logró solucionar en parte este problema. No obstante, evaluar nuevos tipos de aspersores e implementar trampas de sólidos tanto en la alimentación como en la recirculación podrían contribuir a la solución de dichos problemas.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en el TBR con ambos hidrolizados es importante realizar una comparación de este reactor en términos de desempeño, costos de producción de H₂, VVPH y REH con reactores de biomasa suspendida, específicamente el CSTR, ya que es el más empleado para la producción de H₂.
- Cabe resaltar, que en este trabajo se estimó los costos de producción de H₂ de forma muy general ya que sólo se tomó en cuenta el costo de la enzima y del buffer empleado, por lo que es de gran importancia realizar un análisis de costos más detallado tomando en cuenta factores como: el consumo energético durante la hidrólisis enzimática y la operación del

reactor; el costo de materiales y reactivos empleados como mangueras, hidróxido de sodio, antiespumante, entre otros factores.

- Finalmente, es importante realizar una revisión del nivel de madurez de la tecnología (TRL, por sus siglas en inglés) en el cual se encuentra el uso del TBR para la producción de H₂ y complementario a esto estudiar que se puede hacer en un futuro cercano para establecer si realmente está tecnología es escalable a niveles más altos de TRL y que pueda llegar incluso a la escala industrial o piloto.

REFERENCIAS

- Abreu Sherrer, J. (2013). *Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno*. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.
- APHA. (1997). Standar Methods for examination of water & wastewater. Retrieved from www.standardmethods.org.
- Arreola-Vargas, J., Alatraste-Mondragón, F., Celis, L. B., Razo-Flores, E., López-López, A., & Méndez-Acosta, H. O. (2015). Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: Effect of simple and complex substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(6), 1062–1069. <http://doi.org/10.1002/jctb.4410>
- Arreola-Vargas, J., Celis, L. B., Buitrón, G., Razo-Flores, E., & Alatraste-Mondragón, F. (2013). Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(32), 13884–13894. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.065>
- Arriaga, S., Rosas, I., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(5), 3442–3449. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.019>
- Bajpai, P. (1997). Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 43, 141–194. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70225-9](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70225-9)
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071–9077. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>
- Buitrón, G., Kumar, G., Martínez-Arce, A., & Moreno, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19249–19255. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.139>
- Bundhoo, Z. M. A. (2017). Coupling dark fermentation with biochemical or bioelectrochemical systems for enhanced bio-energy production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(43), 26667–26686. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.09.050>
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5591–5601. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.004>
- Caspeta, L., Caro-bermúdez, M. A., Ponce-noyola, T., & Martínez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Contreras-Dávila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671–679. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.084>
- Cota-Navarro, C. B., Carrillo-Reyes, J., Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. *Water Science and Technology*, 64(2), 367–374. <http://doi.org/10.2166/wst.2011.631>
- Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose,

- cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989–4997. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatraste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(1), 27–45. <http://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296–4304. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.063>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <http://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(October 2015), 656–668. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Galindo-Hernández, K. L. (2017). Deslignificación y sacarificación con mezclas enzimáticas del bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de hidrógeno y metano. Tesis de Maestría. *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C*, 71.
- Gomez-Tovar, F., Celis, L. B., Razo-Flores, E., & Alatraste-Mondragón, F. (2012). Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresource Technology*, 116, 372–378. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.109>
- Han, W., Hu, Y., Li, S., Nie, Q., Zhao, H., & Tang, J. (2016). Effect of organic loading rate on dark fermentative hydrogen production in the continuous stirred tank reactor and continuous mixed immobilized sludge reactor from waste pastry hydrolysate. *Waste Management*, 58, 335–340. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.019>
- Han, W., Yan, Y., Shi, Y., Gu, J., Tang, J., & Zhao, H. (2016). Biohydrogen production from enzymatic hydrolysis of food waste in batch and continuous systems. *Scientific Reports*, 6(November), 1–9. <http://doi.org/10.1038/srep38395>
- Jung, K.-W., Kim, D.-H., & Shin, H.-S. (2010). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13370–13378. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.120>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <http://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lee, H., & Rittmann, B. E. (2009). Evaluation of Metabolism Using Stoichiometry in Fermentative Biohydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 749–758. <http://doi.org/10.1002/bit.22107>
- Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, L., ... Xing, X. (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresource Technology*, 135, 292–303. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.027>
- Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1816–1827. <http://doi.org/10.1002/bit.23122>
- Miller, G. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Detection of Reducing Sugars. Analytical Chemistry - ANAL CHEM* (Vol. 31). <http://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2013).

- Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), 260–322. <http://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258>
- Montiel Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, 249(October 2017), 334–341. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Mota, V. T., Júnior, A. D. N. F., Trably, E., & Zaiat, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3 . 0: Is it possible? *Water Research*, 128, 350–361. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172–13191. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S. H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., ... Bélafi-Bakó, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(6), 3820–3836. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Mudhoo, A., Rene, E. R., Saratale, G. D., Kobayashi, T., ... Kim, D. H. (2017). Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.091>
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review*. *BioResources* (Vol. 2). <http://doi.org/10.15376/BIORES.2.3.472-499>
- Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., ... Ruiz-Filippi, G. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 761–785. <http://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>
- Van Groenestijn, J. W., Geelhoed, J. S., Goorissen, H. P., Meesters, K. P. M., Stams, A. J. M., & Claassen, P. A. M. (2009). Performance and population analysis of a non-sterile trickle bed reactor inoculated with *caldicellulosiruptor saccharolyticus*, a thermophilic hydrogen producer. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1361–1367. <http://doi.org/10.1002/bit.22185>
- Wan, J., Jing, Y., Zhang, S., Angelidaki, I., & Luo, G. (2016). Mesophilic and thermophilic alkaline fermentation of waste activated sludge for hydrogen production: Focusing on homoacetogenesis. *Water Research*, 102, 524–532. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.002>
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- Yang, H., Shao, P., Lu, T., Shen, J., Wang, D., Xu, Z., & Yuan, X. (2006). Continuous bio-hydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(10), 1306–1313. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.11.018>
- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., & Zhang, H. (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1359–1365. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00073-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00073-3)
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35–53. <http://doi.org/10.1016/j.peccs.2014.01.001>

ANEXOS

Anexo 1

En el anexo 1 se presenta la caracterización de las enzimas empleadas para la sacarificación del bagazo de agave en función de sus actividades hidrolíticas.

Enzima	Proteína (mg/mL)	Celulasa (FPU/mL)	1,4-β- endoglucanasa (EGU/mL)	β- glucosidasa (U/mL) ^a	Xilanasa (U/mL) ^b
Celluclast 1.5L	32.45	46.028	177.94	0.72	740
Viscozyme L	18.9	2	211.92	0.74	195
Stonezyme	36.52	44.53	560.42	6.19	13312

^aU: Cantidad de enzima requerida para remover un micromol de p-nitrofenol por minuto.

^bU: cantidad de enzima requerida para remover un micromol de xilosa por minuto.

Anexo 2

El anexo 2 muestra los cálculos realizados para obtener el REH y el costo de producción para el periodo 1 (34.6 g DQO/L·d) de la etapa 1 que corresponde a los hidrolizados con la mezcla enzimática.

El REH se calculó de acuerdo a la ecuación (6) tomando en cuenta la VVPH obtenida en el TBR en el periodo específico; el volumen del reactor (V_r) de 1.5 L; el volumen de hidrolizado obtenido en el reactor de 10 L; el volumen de hidrolizado consumido por día, el cual está en función de la COV y de la concentración de sustrato en DQO/L; y la cantidad de bagazo empleado durante la hidrólisis enzimática.

$$\text{REH} = \frac{1.98 \text{ L H}_2/\text{L} \cdot \text{d} * 1.5 \text{ L} * \frac{9.7 \text{ L hidrolizado}}{1.09 \text{ L hidrolizado/d}}}{[0.5 \text{ Kg bagazo}]} = 49 \text{ L H}_2/\text{Kg bagazo} \quad (6)$$

El costo de producción de H_2 se calculó de acuerdo a la ecuación (7) tomando en cuenta la cantidad de bagazo empleado en la hidrólisis enzimática; el REH obtenido en el periodo específico; y el costo del litro de hidrolizado, el cual toma en cuenta el precio de las enzimas y el costo del buffer de citratos (\$ 5.35 MN/L hidrolizado) y la cantidad de enzima empleada en la hidrólisis, para el caso de la mezcla el precio de la enzima fue de \$ 31 MN/mL de enzima.

$$\text{Costo producción H}_2 = \frac{\$ 113 \text{ MN/L hidrolizado}}{\frac{0.05 \text{ Kg bagazo/L hidrolizado}}{49 \text{ L H}_2/\text{Kg bagazo}}} = \$ 46.12 \text{ MN/L H}_2 \quad (7)$$

Anexo 3

Los anexos 3 y 4 muestran la reacción global de producción de H₂ en los estados estables para el reactor que operó con los hidrolizados procedentes de la mezcla y de la enzima individual, respectivamente. Es importante mencionar que estos cálculos se hicieron a partir de dos suposiciones: 1) la biomasa en el efluente del reactor corresponde a la cantidad de biomasa desprendida dentro del mismo en el estado estable y 2) el cálculo de la reacción se realizó a partir del porcentaje de remoción obtenido en cada estado.

Reacciones estequiométricas de los estados estables del TBR que empleó los hidrolizados obtenidos a partir de la mezcla enzimática a diferente COV.

COV (g DQO/L-d)	AT iniciales (g/L)	Reacción global de producción de H ₂ incluyendo síntesis celular
34.6	6	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.13\text{NH}_4^+ \rightarrow 0.21\text{CH}_3\text{COO}^- + 0.02\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 + 0.19\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 1.85\text{CO}_2 + \mathbf{0.14\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}} + 0.29\text{H}_2\text{O} + 1.14\text{H}^+ + \mathbf{1.75\text{H}_2}$
43.2	7.5	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.08\text{NH}_4^+ \rightarrow 0.16\text{CH}_3\text{COO}^- + 0.01\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 + 0.28\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 1.42\text{CO}_2 + \mathbf{0.11\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}} + 0.12\text{H}_2\text{O} + 1.12\text{H}^+ + \mathbf{1.8\text{H}_2}$
52.9	9.4	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.12\text{NH}_4^+ \rightarrow 0.32\text{CH}_3\text{COO}^- + 0.02\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 + 0.32\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 1.92\text{CO}_2 + \mathbf{0.08\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}} + 0.11\text{H}_2\text{O} + 1.12\text{H}^+ + \mathbf{2.1\text{H}_2}$
60.48	11	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.21\text{NH}_4^+ \rightarrow 0.46\text{CH}_3\text{COO}^- + 0.07\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 + 0.44\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 1.83\text{CO}_2 + \mathbf{0.13\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}} + 0.32\text{H}_2\text{O} + 1.8\text{H}^+ + \mathbf{2.2\text{H}_2}$
69.1	12.5	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.17\text{NH}_4^+ \rightarrow 0.76\text{CH}_3\text{COO}^- + 0.1\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 + 0.56\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 1.76\text{CO}_2 + \mathbf{0.06\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}} + 0.37\text{H}_2\text{O} + 1.12\text{H}^+ + \mathbf{2.55\text{H}_2}$
81	14.7	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.18\text{NH}_4^+ \rightarrow 0.61\text{CH}_3\text{COO}^- + 0.07\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 + 0.45\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 1.52\text{CO}_2 + \mathbf{0.22\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}} + 0.22\text{H}_2\text{O} + 1.21\text{H}^+ + \mathbf{2.47\text{H}_2}$

Anexo 4

Reacciones estequiométricas de los estados estables del TBR que empleó los hidrolizados obtenidos a partir de la enzima individual a diferente COV.

COV (g DQO/L·d)	AT iniciales (g/L)	Reacción global de producción de H ₂ incluyendo síntesis celular
43.2	7.3	$C_6H_{12}O_6 + 0.18NH_4^+ \rightarrow 0.44CH_3COO^- + 0.3C_3H_5O_2 + 0.41C_4H_7O_2^- + 1.25CO_2 + 0.16C_5H_7O_2N + 0.39H_2O + 1.71H^+ + 1H_2$
52.9	9.1	$C_6H_{12}O_6 + 0.1NH_4^+ \rightarrow 0.49CH_3COO^- + 0.7C_3H_5O_2 + 0.38C_4H_7O_2^- + 1.22CO_2 + 0.13C_5H_7O_2N + 0.22H_2O + 1.56H^+ + 0.85H_2$
60.48	10.2	$C_6H_{12}O_6 + 0.18NH_4^+ \rightarrow 0.56CH_3COO^- + 0.6C_3H_5O_2 + 0.29C_4H_7O_2^- + 1.78CO_2 + 0.09C_5H_7O_2N + 0.21H_2O + 1.48H^+ + 1.0H_2$
69.1	11.7	$C_6H_{12}O_6 + 0.22NH_4^+ \rightarrow 0.61CH_3COO^- + 0.6C_3H_5O_2 + 0.3C_4H_7O_2^- + 1.53CO_2 + 0.11C_5H_7O_2N + 0.22H_2O + 1.56H^+ + 1.26H_2$
81	13.4	$C_6H_{12}O_6 + 0.19NH_4^+ \rightarrow 0.91CH_3COO^- + 0.5C_3H_5O_2 + 0.31C_4H_7O_2^- + 1.56CO_2 + 0.08C_5H_7O_2N + 0.27H_2O + 1.89H^+ + 1.32H_2$
81	13.4	$C_6H_{12}O_6 + 0.15NH_4^+ \rightarrow 0.98CH_3COO^- + 0.52C_3H_5O_2 + 0.32C_4H_7O_2^- + 1.32CO_2 + 0.11C_5H_7O_2N + 0.22H_2O + 1.71H^+ + 1.30H_2$