



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

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Estrategias para optimizar la producción de hidrógeno y
metano a partir de biomasa microalgal**

Tesis que presenta

Jack Andrés Rincón Pérez

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “***Estrategias para optimizar la producción de hidrógeno y metano a partir de biomasa microalga***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Jack Andrés Rincón Pérez** y aprobada el **día 16 de julio de 2020** 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 Tutorial

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Felipe Alatraste Mondragón
Miembro del Comité Tutorial

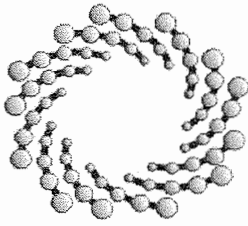


Créditos Institucionales

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 (590633) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética, Clúster Biocombustibles Gaseosos, proyecto 247006.



IPICYT

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 027 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de julio del año 2020, se reunió a las 10:00 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

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

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Jack Andrés Rincón Pérez

sobre la Tesis intitulada:

Estrategias para optimizar la producción de hidrógeno y metano a partir de biomasa microalgal

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 12:45 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 16 días del mes de julio de 2020.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Benilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres y abuelos porque gracias a ellos tuve la oportunidad de estudiar y de llegar hasta este logro en mi vida y a quien les debo todo lo que soy, por el apoyo incondicional que siempre me han dado.

A mis tíos, Bladelmiro y Genny que me apoyaron siempre que los necesité.

A mis tíos, Angela y Eduardo por creer en mí y darme su apoyo.

A mi primo Franchesco por darme ánimos y consejos y ser un ejemplo a seguir.

A mi tía Janneth por todo su cariño y apoyo.

A mi tío Carlos por tenderme la mano cuando lo necesité.

A mi hermano Antonio, y mis primas Karim y Andrea por todo lo vivido juntos.

A mi tía Liliana, y mis queridos primos que me recibieron cuando los necesité.

A mis amigos de CrossFit, en especial a Gerardo “Gonzhum”, Ale Sánchez, Pedro Pablo, Miguel Garduño, Guillermo López, Emmanuel López, y Héctor Solís por todos los buenos momentos entrenando.

Agradecimientos

Al Dr. Elías Razo Flores, por enseñarme a ser más crítico y analítico. Además de compartir su conocimiento y experiencia a lo largo de mi doctorado.

A la Dra. Ma. Lourdes Berenice Celis García, por su apoyo, consejos y confianza que me permitieron desarrollar mi trabajo de una manera más analítica.

Al Dr. Felipe Alatríste, por sus valiosas recomendaciones y comentarios, los cuales contribuyeron enormemente al desarrollo de este trabajo de investigación, así como en mi formación personal.

A la Dra. Marcia Morales, por el tiempo y los comentarios dedicados a esta tesis, los cuales ayudaron a fortalecer los argumentos de la investigación.

Tabla de Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales	iii
Agradecimientos.....	vi
Tabla de Contenido	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvi
Capítulo 1. Biomasa microalgal como materia prima para la producción de biocombustibles gaseosos	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Digestión anaerobia	2
1.3. Producción biológica de hidrógeno	3
1.4. Biocombustibles a partir de biomasa microalgal	5
1.5. Justificación.....	15
1.6. Alcance y estructura de la tesis.....	17
Capítulo 2. Mejorando la biodegradabilidad de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> mediante pretratamiento termoquímico para producir hidrógeno y metano	19
Resumen	19
2.1. Introducción.....	20
2.2. Materiales y métodos	21
2.2.1. Biomasa microalgal e inóculo anaerobio	21

2.2.2.	Diseño de experimentos para los pretratamientos.....	22
2.2.3.	Ensayo de potencial bioquímico de hidrógeno en lote.....	23
2.2.4.	Ensayo de potencial bioquímico de metano en lote.....	24
2.2.5.	Métodos analíticos.....	25
2.2.6.	Análisis estadístico	26
2.2.7.	Cálculos.....	26
2.3.	Resultados y discusión	26
2.3.1.	Pretratamientos, interacción de los factores y solubilización de materia orgánica.....	26
2.3.2.	Producción de hidrógeno a partir de biomasa microalgal pretratada termoquímicamente	36
2.3.3.	Producción de metano a partir del hidrolizado de microalgas.....	41
2.4.	Conclusiones.....	46
Capítulo 3. Experimento de producción continua de hidrógeno a partir de biomasa microalgal.....		47
3.1.	Introducción.....	47
3.2.	Materiales y métodos	48
3.2.1.	Biomasa microalgal e inóculo	48
3.2.2.	Pretratamiento de la biomasa microalgal.....	48
3.2.3.	Configuración experimental	49
3.2.4.	Métodos analíticos.....	49
3.3.	Resultados y discusión	50
3.3.1.	Solubilización de materia orgánica	50
3.3.2.	Desempeño del reactor	52
3.4.	Conclusiones.....	57

Capítulo 4. Estrategias para mejorar el contenido y producción de metano a partir de la digestión anaerobia de biomasa microalgal58

Resumen	58
4.1. Introducción.....	59
4.2. Materiales y métodos	59
4.2.1. Sustratos e inóculo anaerobio	59
4.2.2. Reactor anaerobio discontinuo secuencial	60
4.2.3. Experimentos en lote	62
4.2.4. Modelo cinético.....	63
4.2.5. Métodos analíticos.....	64
4.3. Resultados y discusión	64
4.3.1. Fase de aclimatación del inóculo.....	64
4.3.2. Monodigestión y codigestión del hidrolizado de microalga	67
4.3.3. Efecto del pH sobre la producción de metano	67
4.3.4. Efecto del incremento de la carga orgánica.....	69
4.3.5. Ensayos en lote de producción de metano	71
4.4. Conclusiones.....	74

Capítulo 5. Consideraciones para la producción de biocombustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal: Conclusiones y perspectivas.....75

5.1. Discusión general y conclusiones	75
5.2. Perspectivas.....	90
5.3. Referencias.....	91

Lista de Figuras

Figura 1.1. Representación esquemática de las vías de producción de H ₂ y CH ₄ mediante la fermentación oscura y digestión anaerobia, respectivamente. AGVs: Ácidos grasos volátiles. El eje de tiempo representa el tiempo de conversión de la materia orgánica en cada etapa. Modificado de (Ahring et al., 2003).	2
Figura 1.2. Esquema de un sistema multietapa de biorreactores. Adaptado de Tapia Venegas et al. (2015) y Wang et al. (2011).....	5
Figura 1.3. Número de artículos publicados mundialmente (arriba) y en México (abajo) relacionando microalgas con biorrefinería y biocombustibles. Fuente: ISI Web of Knowledge.	7
Fig. 1.4. Esquema de la pared celular de algunas microalgas de importancia biotecnológica. Modificado de D'Hondt et al. (2017).	14
Fig. 1.5. Imágenes de microscopía electrónica de trasmisión de <i>Scenedesmus</i> AT-UAM. a) Componentes: C: Cloroplasto, P: Pirenoide, S: Almidón, CW: Pared celular; b) Esquema de la estructura de la pared celular de <i>Scenedesmus</i> , PL: Capa de pectina, AL: Capa de algaenan, FL: Capa fibrilar, CM: Membrana celular; c) Arquitectura y composición de la pared celular. Modificado de Sánchez-García et al. (2020).....	15
Fig. 2.1. Diagrama de la producción en lote de hidrógeno y metano a partir de biomasa microalgal.	25
Fig. 2.3. Gráfica de contornos y sus respectivas superficies de respuesta de eficiencia de solubilización de DQO (ES-DQO), a partir de las interacciones temperatura:concentración de HCl (a y b), temperatura:biomasa (c y d) y tiempo de reacción:concentración de HCl (e y f).	32
Fig. 2.4. Gráficas de efectos principales de los diferentes factores usados en el diseño de experimentos del pretratamiento termoquímico sobre la eficiencia de solubilización de a) carbohidratos y b) DQO. Los números -1 y 1 en los ejes X denotan los niveles alto y bajo del diseño de experimentos, respectivamente.....	34

Fig. 2.5. Perfil cinético del potencial bioquímico de hidrógeno a través de fermentación oscura. Los símbolos son los valores promedio de los datos experimentales con su respectiva desviación estándar. Las líneas continuas representan los datos ajustados al modelo modificado de Gompertz. 37

Fig. 2.6. Balance de DQO soluble al terminar los ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno a través de fermentación oscura con biomasa microalgal cruda e hidrolizado. Biomasa y otros corresponde a compuestos que no fueron medidos, como otros tipos de AGV, alcoholes o biomasa. CHO: carbohidratos. 38

Fig. 2.7. Perfil cinético del potencial bioquímico de metano a través de la digestión anaerobia. Los símbolos son los valores promedio de los datos experimentales con su respectiva desviación estándar. Las líneas continuas representan los datos ajustados al modelo modificado de Gompertz..... 42

Fig. 2.8. Concentraciones de carbohidratos solubles (CHO_s) y DQO soluble (DQO_s) de los ensayos de potencial bioquímico de metano. Subíndices i y f se refieren al tiempo inicial y final, respectivamente. 45

Fig. 3.1. **a)** Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y consumo de carbohidratos solubles (CHO_s) durante la operación del reactor; **b)** acercamiento de la región de tiempo del día 8 al 14. Líneas punteadas indican el cambio de etapa. 53

Fig. 3.2. Diagrama de cajas mostrando los ácidos grasos volátiles producidos durante las etapas de operación del reactor. La caja representa el 50% de los valores, la línea horizontal dentro de las cajas es la mediana y las líneas verticales (bigotes) representan el 25% de los valores menores y 25% de los valores mayores. 54

Fig. 3.3. Esquema de vías de transformación de celulosa y hemicelulosa en compuestos inhibitorios para los microorganismos involucrados en la fermentación oscura y digestión anaerobia. Modificado de Rasmussen et al., (2014)..... 56

Fig. 4.1. Ciclo de alimentación del reactor anaerobio discontinuo secuencial. 62

Fig. 4.2. Representación esquemática de los ensayos de potencial bioquímico de metano (PBM).	63
Fig. 4.3. Desempeño de la fase de aclimatación del inóculo en el reactor; a) producción de CH ₄ y b) eficiencia de remoción de materia orgánica. CHO: Carbohidratos; DQO: Demanda química de oxígeno; HM: Hidrolizado de microalga; SL: Suero de leche. Subíndices S y T denotan soluble y total, respectivamente. .	65
Fig. 4.4. Evolución del volumen acumulado y velocidad de producción de CH ₄ durante la operación del reactor discontinuo secuencial a) pH alcalino y b) pH neutro con incremento de la carga orgánica en la alimentación de 7.5, 10 y 12.5 g DQO _T /L para las Etapas X, XI y XII, respectivamente.	68
Fig. 4.5. Comparación de los parámetros cinéticos de la operación del reactor a condiciones de pH alcalino y neutro.	69
Fig. 4.6. Balance de DQO _T de cada una de las etapas evaluadas en el reactor discontinuo secuencial. HM: hidrolizado de microalga, SL: suero de leche.	71
Fig. 4.7. Eficiencia de remoción de materia orgánica en los experimentos en lote. HM: Hidrolizado de microalga; SL: Suero de leche. Los subíndices part y sobr denotan fracción particulada y sobrenadante, respectivamente.	73
Fig. 5.1. Esquema de biorrefinería de microalgas.	76
Fig. 5.2. Estrategias a tener en cuenta para mejorar la producción continua de hidrógeno a partir de biomasa microalgal. COV: Carga orgánica volumétrica; TRH: Tiempo de residencia hidráulico. Adaptado de Sivagurunathan et al. (2016).	84
Fig. 5.3. Esquema simplificado de integración de cultivo de microalgas y producción de metano mediante digestión anaerobia bajos condiciones alcalinas. Adaptado de Canon-Rubio et al. (2016).	88

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Composición bioquímica de algunas microalgas expresada en una base de peso seco. Compilado de Cabello et al. (2015); Han et al. (2015); Toledo-Cervantes et al. (2018, 2013); Zabed et al. (2020).....	6
Tabla 1.2. Producción de hidrógeno en lote mediante fermentación oscura de biomasa microalgal del género <i>Scenedesmus</i>	8
Tabla 1.3. Producción de metano mediante digestión anaerobia de biomasa microalgal del género <i>Scenedesmus</i>	10
Tabla 2.1. Diseño factorial completo con puntos centrales para los pretratamientos y los resultados de las concentraciones de carbohidratos solubles (CHO _s) y DQO soluble (DQO _s).....	28
Tabla 2.2. Análisis de varianza de los resultados obtenidos a partir del modelo reducido de la eficiencia de solubilización de carbohidratos.....	33
Tabla 2.3. Análisis de varianza de los resultados obtenidos a partir del modelo reducido de la eficiencia de solubilización de DQO.....	33
Tabla 2.4. Parámetros del modelo modificado de Gompertz estimados a partir de los ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno.....	37
Tabla 2.5. Comparación de producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura de biomasa microalgal.....	40
Tabla 2.6. Parámetros del modelo modificado de Gompertz estimados a partir de los ensayos de potencial bioquímico de metano.....	42
Tabla 2.7. Comparación de producción de metano a partir de la digestión anaerobia de biomasa microalgal.....	44
Tabla 3.1. Características del inóculo, suero de leche, biomasa cruda e hidrolizado de microalga.....	48
Tabla 3.2. Condiciones operacionales durante la producción de hidrógeno en régimen continuo.....	50

Tabla 3.3. Características del hidrolizado de microalga y eficiencias de solubilización del pretratamiento térmico.....	51
Tabla 4.1. Características de la biomasa microalgal no pretratada, suero de leche, y lodo anaerobio granular.....	60
Tabla 4.2. Descripción de las etapas evaluadas durante la operación del reactor.	61
Tabla 4.3. Principales parámetros de la monodigestión y codigestión anaerobia en el reactor secuencial discontinuo.	66
Tabla 4.4. Parámetros cinéticos obtenidos de los experimentos en lote para evaluar la producción de CH ₄ a partir de la fracción particulada del hidrolizado de microalga.	72
Tabla 5.1. Comparación de algunos procesos para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas.....	77
Tabla 5.2. Resumen de ventajas y desventajas de los principales pretratamientos usados en biomasa lignocelulósica y algal. Adaptado de Atelge et al. (2020); Bhatt y Shilpa (2014); Carrere et al. (2016); Onumaegbu et al. (2018); Rodriguez et al. (2015); Shankaran et al. (2020).....	81
Tabla 5.3. Tipos de biomasa con potencial para ser usados como cosustrato en la codigestión de biomasa microalgal.	86

Resumen

Estrategias para optimizar la producción de hidrógeno y metano a partir de biomasa microalgal

Palabras clave: Fermentación oscura, biogás, microalga, pretratamiento

Actualmente, los biocombustibles derivados de microalgas son tecnologías en desarrollo y su comercialización aún no ha sido establecida. Por otro lado, la producción de biogás mediante la digestión anaerobia es una tecnología bien establecida y disponible comercialmente, la cual podría coadyuvar la producción de biohidrógeno y biogás, a partir de microalgas. El objetivo de esta tesis fue encontrar estrategias para el mejoramiento de la producción de H_2 y CH_4 a partir de biomasa microalgal. La primera estrategia fue incrementar la liberación de carbohidratos y otras formas de materia orgánica contenidas en la biomasa microalgal. Un diseño de experimentos factorial permitió encontrar las condiciones óptimas para la solubilización de carbohidratos y DQO a través de un pretratamiento termoquímico. Este hidrolizado presentó un potencial bioquímico de H_2 y CH_4 de 48 NmL/g SV y 296 NmL/g SV, respectivamente; siendo 1.7 y 1.3 veces mayores que el rendimiento de H_2 y CH_4 obtenido con biomasa microalgal sin pretratar. Posteriormente, se evaluó la producción continua de H_2 a partir de biomasa microalgal pretratada térmicamente. Un reactor de tanque agitado continuo se alimentó inicialmente con suero de leche para activar el inóculo y prepararlo para degradar un sustrato más complejo: hidrolizado de microalga. Sin embargo, la producción de H_2 no se detectó en las etapas que se alimentó el hidrolizado de microalga, probablemente debido al cambio drástico de la alta carga de suero de leche (84.4 g DQOT/L-d) a una baja carga de hidrolizado de microalga (0.54 g DQOT/L-d). Por lo tanto, la producción de H_2 no fue soportada debido a las bajas cargas de hidrolizado de microalga evaluadas. Posteriormente, se estudió la producción continua de CH_4 en un reactor discontinuo secuencial alimentado con biomasa microalgal pretratada termoquímicamente en codigestión con suero de leche. Además, se investigó el incremento gradual de la carga orgánica volumétrica (COV) en la producción de biogás. El reactor se operó a pH alcalino como estrategia para enriquecer el contenido de CH_4 en el biogás. La codigestión de hidrolizado de microalga y suero de leche produjo cerca de 230 NmL CH_4 /g DQOT, siendo 1.8 veces mayor que la monodigestión de hidrolizado de microalga. El contenido de CH_4 en el biogás fue alrededor de 90% a pH alcalino, mientras que a pH neutro estuvo alrededor de 50%. El rendimiento de CH_4 no mejoró con el incremento gradual de la COV. Sin embargo, la velocidad de producción de CH_4 en estas etapas fue aproximadamente el doble que las etapas que no tuvieron un incremento en la COV. Además, se demostró que la digestión anaerobia de biomasa microalgal se puede lograr con tiempos de residencia hidráulica menores a 15 días, siempre y cuando sea codigerida con un sustrato rico en carbohidratos. En general, los biocombustibles derivados de microalgas son una gran promesa, pero estas tecnologías necesitan más esfuerzos en investigación y desarrollo para lograr su comercialización.

Abstract

Strategies to optimize hydrogen and methane production from microalgal biomass

Keywords: Dark fermentation, biogas, microalgae, pretreatment

Nowadays, microalgae-derived biofuels are technologies in development and their commercialization has not yet been established. Nevertheless, biogas production from anaerobic digestion is an established technology and commercially available that could boost biohydrogen and biogas production from microalgal biomass. The aim of this thesis was to develop strategies for the improvement of H₂ and CH₄ production from microalgal biomass. The first strategy was to increase the release of carbohydrates and other organic forms contained in the microalgal biomass. A factorial design of experiments allowed found the optimum conditions for solubilization of carbohydrates and chemical oxygen demand (COD) through a thermochemical pretreatment. The biochemical H₂ and CH₄ potentials from hydrolysate were 48 NmL/g VS and 296 NmL/g VS, respectively, being 1.7- and 1.3-fold higher than H₂ and CH₄ yields obtained from untreated microalgal biomass. Then, continuous dark fermentative H₂ production from microalgal biomass thermally pretreated was evaluated. A continuous stirred-tank reactor was initially fed with cheese whey as a strategy to activate the inoculum and preparing it to degrade a complex substrate: microalgal hydrolysate. However, H₂ production was not detected on stages fed with microalgal hydrolysate, probably due to the drastic change of a high cheese whey load (84.4 g TCOD/L-d) to a low microalgal hydrolysate load (0.54 g TCOD/L-d). Therefore, the low microalgal hydrolysate organic loads applied did not support the production of H₂. Thereafter, the continuous biogas production was studied on an anaerobic sequencing batch reactor fed with thermochemically pretreated microalgal biomass co-digested with cheese whey. Besides, the stepwise increase of OLR was investigated in the biogas production. Furthermore, the reactor was operated at alkaline pH as a strategy to enrich the CH₄ content on biogas. The co-digestion of microalgal hydrolysate and cheese whey produced ca. 230 NmL CH₄/g TCOD, being 1.8-fold higher than mono-digestion of microalgal hydrolysate. Regarding CH₄ content on biogas, this was around 90% at alkaline pH, while it was around 50% at neutral pH. The CH₄ yield did not improve with the OLR stepwise increase. Nevertheless, the CH₄ production rate on these stages was about twice than the stages that did not have an OLR increased. Furthermore, it was demonstrated that anaerobic digestion of microalgae can be achieved with hydraulic retention time below 15 days when it is co-digested with a carbohydrate-rich substrate. Overall, the microalgal-derived biofuels are a great promise, but these technologies need more efforts on research and development to achieve their commercialization.

Capítulo 1. Biomasa microalgal como materia prima para la producción de biocombustibles gaseosos

1.1. Introducción

Actualmente, la mayor parte de la energía que se consume a nivel mundial proviene de los combustibles fósiles y su uso ha incrementado la cantidad de gases de efecto invernadero en la atmósfera, conduciendo a cambios climáticos, calentamiento global, entre otros problemas (García y Masera, 2017). En consecuencia, varios países firmaron el acuerdo de París, donde se comprometen a realizar acciones para mitigar el cambio climático. Para cumplir con los objetivos de este acuerdo, se proponen diferentes estrategias, por ejemplo, disminuir el uso de combustibles fósiles e impulsar el uso de energías con una huella de carbono cero (Pires, 2017). México se comprometió con esta causa, creando leyes, como la Ley General de Cambio Climático y la Ley de Transición Energética, las cuales establecen que para el año 2024 al menos 35% de la generación de energía eléctrica en México debe provenir de energías limpias (SENER, 2016). Así mismo, el Gobierno de México ha fomentado el desarrollo de biocombustibles que no ponen en riesgo la seguridad alimentaria (i.e. 2^a, 3^a y 4^a generación) mediante la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (SENER, 2008). Debido a esto y a diversas ventajas como el secuestro de dióxido de carbono, el nulo requerimiento de tierras destinadas a uso agrícola, es que la biomasa microalgal ha ganado atención en la investigación y desarrollo de biocombustibles. Por un lado, la biomasa microalgal puede usarse para producir una variedad de biocombustibles con huella de carbono cero, ya sea en forma líquida (p.ej. biodiesel y bioetanol), gaseosa (p.ej. biohidrógeno y biometano) o sólida (p.ej. biochar) (Adeniyi et al., 2018). Por otro lado, también se pueden extraer productos de alto valor agregado (p.ej. pigmentos). Por lo tanto, esta biomasa podría ser integrada en un esquema de biorrefinería y contribuiría con la disminución de los costos de producción de los biocombustibles.

1.2. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico, en el que bacterias y arqueas degradan la materia orgánica en condiciones anaerobias. Este proceso está conformado por las etapas de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 1.1.). Las bacterias se encargan de hidrolizar la materia orgánica compleja, para luego fermentarla y producir hidrógeno y otros productos (p.ej. ácidos grasos volátiles y dióxido de carbono). Las arqueas pueden consumir el ácido acético o el hidrógeno y dióxido de carbono producido en las etapas anteriores para producir metano mediante la metanogénesis acetoclástica e hidrogenotrófica, respectivamente.

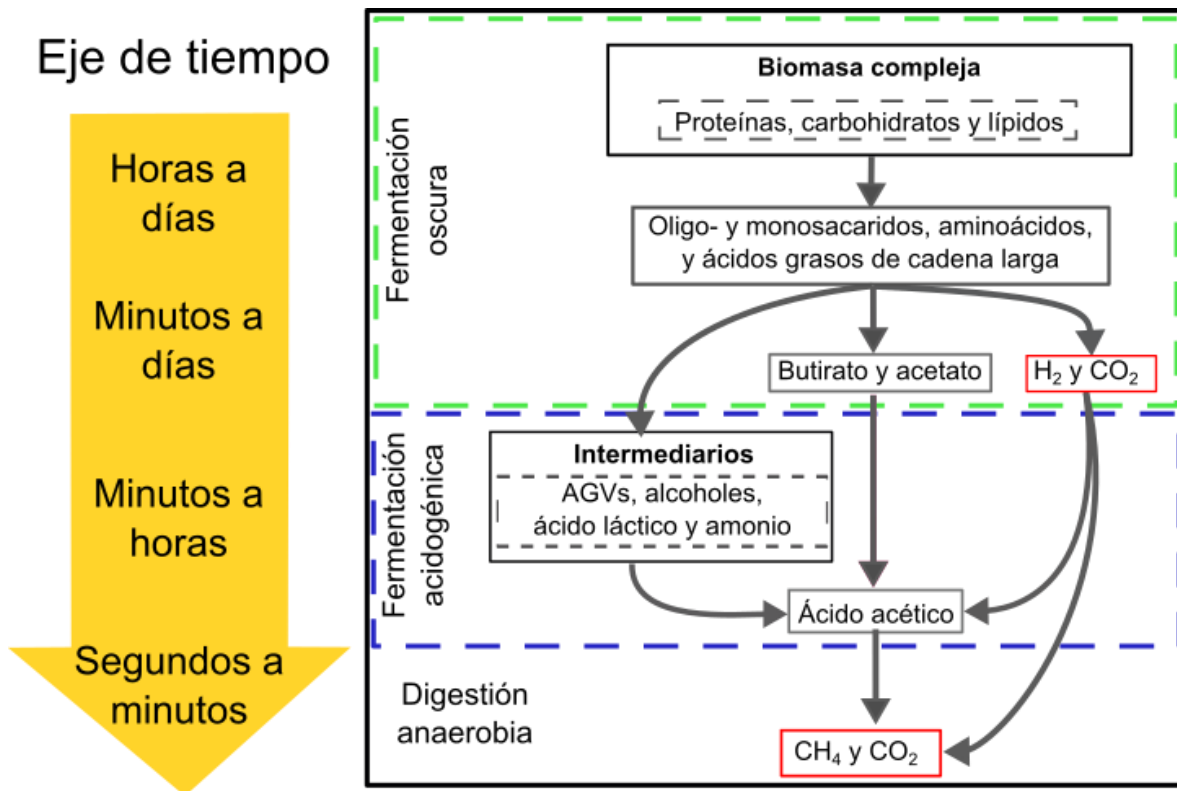


Figura 1.1. Representación esquemática de las vías de producción de H₂ y CH₄ mediante la fermentación oscura y digestión anaerobia, respectivamente. AGVs: Ácidos grasos volátiles. El eje de tiempo representa el tiempo de conversión de la materia orgánica en cada etapa. Modificado de (Ahring et al., 2003).

La digestión anaerobia es una tecnología madura y comercial, la cual ha sido empleada para tratar diferentes aguas residuales (p.ej. municipales e industriales) y residuos orgánicos, a la vez que se puede obtener energía renovable (Nguyen et al., 2015). La energía obtenida a partir del biogás generado en la digestión anaerobia ha ganado relevancia a nivel mundial en las últimas décadas, tal como lo indica el incremento del número de plantas de biogás a nivel mundial. Por ejemplo, desde el año 2009 hasta el año 2017 la Unión Europea incrementó sus plantas de biogás de 6,227 a 17,432. En el año 2017, Alemania fue el país líder con cerca de 11,000 plantas de biogás en operación (EBA, 2018). La producción de biogás en la Unión Europea es relevante, ya que la bioenergía representa alrededor de 60% de la energía proveniente de las energías renovables; además, se espera que esta tendencia se mantenga hasta el año 2020 (Scarlat et al., 2018). En el caso de México, el biogás es la quinta fuente potencial de bioenergía y representa un papel importante en las políticas de transición energética. Además, se espera que incremente su participación en la matriz energética nacional, debido al interés que ha surgido por el aprovechamiento y valorización de residuos orgánicos (García y Masera, 2017).

1.3. Producción biológica de hidrógeno

Actualmente las expectativas del biohidrógeno son altas, se espera que en un futuro juegue un papel clave en la economía energética por lo que se considera la energía del futuro (Sharma y Ghoshal, 2015). El hidrógeno tiene un rendimiento energético de 120–140 MJ/Kg, lo cual le confiere una densidad energética superior a cualquier combustible proveniente de los hidrocarburos; además, su combustión sólo produce vapor de agua (Oey et al., 2016). Debido a esto, el hidrógeno como fuente de energía renovable y sustentable ha ganado la atención de la comunidad científica en las últimas décadas.

El hidrógeno se puede producir a través de diferentes procesos, como térmicos, termoquímicos, electroquímicos y biológicos, entre otros. La producción biológica

destaca por ser posiblemente el proceso con mejores perspectivas en cuanto a costo efectividad (Antal et al., 2012).

La producción biológica de hidrógeno se puede lograr a partir de diferentes vías tales como la biofotólisis (directa e indirecta), fotofermentación y fermentación oscura. Cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas pero existe un consenso general en que los procesos que requieren energía lumínica tienen un balance energético desfavorable (Antal et al., 2012). Además, los procesos de biofotólisis y fotofermentación tienen bajas eficiencias de aprovechamiento de la luz, bajos rendimientos de hidrógeno y los diseños de sus reactores son más complejos que los usados en fermentación oscura (Tapia-Venegas et al., 2015). En cambio, la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura tiene la ventaja de que no requiere ni de oxígeno ni de luz, ya que forma parte del proceso de digestión anaerobia ([Figura 1.1.](#)), con el cual se degradan residuos orgánicos (Khanna y Das, 2013). Cabe resaltar que la producción biológica de hidrógeno puede ser maximizada mediante la integración de un sistema multietapa de biorreactores (Show et al., 2011), mediante este enfoque se pueden obtener otros beneficios, como la remoción de contaminantes, obtención de productos de alto valor o la producción de metano. La [Figura 1.2.](#) ejemplifica un sistema multietapa en el cual las microalgas se cultivan en un fotobiorreactor y luego son usadas como sustrato en un reactor de tanque agitado, donde se lleva a cabo la fermentación oscura (en ambos procesos se obtiene hidrógeno). Posteriormente, el efluente de la fermentación oscura puede ser usado en procesos de electrólisis microbiana y fotofermentación para la producción de hidrógeno o en el proceso de la digestión anaerobia para producir metano. Por consiguiente, es necesario seguir desarrollando investigación que conlleve hacia procesos tecnológicos relacionados al biohidrógeno para lograr una producción costo-efectiva y comercialmente viable en un futuro cercano.

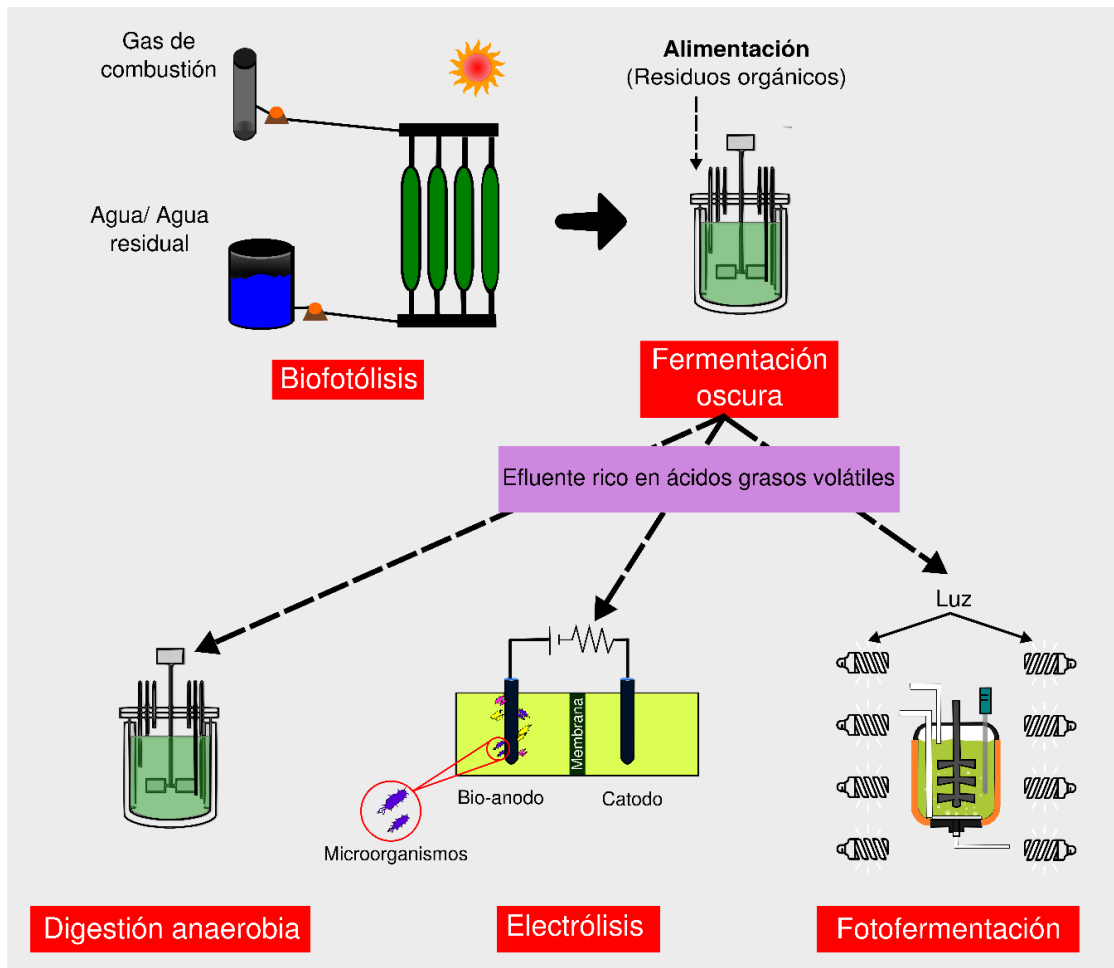


Figura 1.2. Esquema de un sistema multietapa de biorreactores. Adaptado de Tapia Venegas et al. (2015) y Wang et al. (2011).

1.4. Biocombustibles a partir de biomasa microalgal

De forma general, las microalgas están compuestas principalmente por carbohidratos, proteínas, y lípidos ([Tabla 1.1.](#)); además, contienen pigmentos y minerales (Tibbetts et al., 2015). Diversos productos y beneficios pueden obtenerse directamente de la biomasa microalgal o de posteriores procesos de transformación. Temas como el concepto de biorrefinería y biocombustibles derivados de microalgas han sido intensivamente estudiados a nivel mundial, siendo tendencia en temas de investigación ([Figura 1.3.](#)). De acuerdo a la base de datos del ISI Web of Knowledge, entre los años 2011 al 2019, México ha generado 84 artículos científicos relacionando microalgas, biorrefinerías y/o biocombustibles ([Fig. 1.3.](#)),

representando el 15% del total de las publicaciones realizadas sobre biocombustibles en México. Esta tendencia se debe a que a partir de la biomasa microalgal se pueden generar productos de alto valor (p.ej. vitaminas y antioxidantes) y puede integrarse fácilmente en un esquema de biorrefinería. Además, diferentes biocombustibles pueden generarse ya sea durante su cultivo (i.e. biofotólisis), o mediante diferentes procesos biológicos (p.ej. digestión anaerobia) o termoquímicos (p.ej. pirólisis).

Tabla 1.1. Composición bioquímica de algunas microalgas expresada en una base de peso seco. Compilado de Cabello et al. (2015); Han et al. (2015); Toledo-Cervantes et al. (2018, 2013); Zabed et al. (2020).

Microalga	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	7-52.4	18.3-63.4	15-55.7
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	31.1-47	12	1.9-31.3
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7

Diferentes microalgas eucariotas han sido usadas como sustrato para la producción de hidrógeno por fermentación oscura y metano por digestión anaerobia. Particularmente, la biomasa microalgal perteneciente a la división Chlorophyta (p.ej. *Scenedesmus*, *Chlorella*) ha sido sujeto de estudio para la producción de hidrógeno (Nagarajan et al., 2017; Wang y Yin, 2018) y metano (Ward et al., 2014; Xia et al., 2015a; Zabed et al., 2020). Dentro de la división Chlorophyta se encuentra el género *Scenedesmus*, el cual ha sido reportado como un género de microalga que acumula

gran cantidad de carbohidratos y puede cultivarse en medios no tan costosos y en aguas residuales (Ho et al., 2013), resultando en beneficios ambientales y económicos que contribuyen a una bioeconomía circular (Ansari et al., 2019; Ferreira et al., 2019).

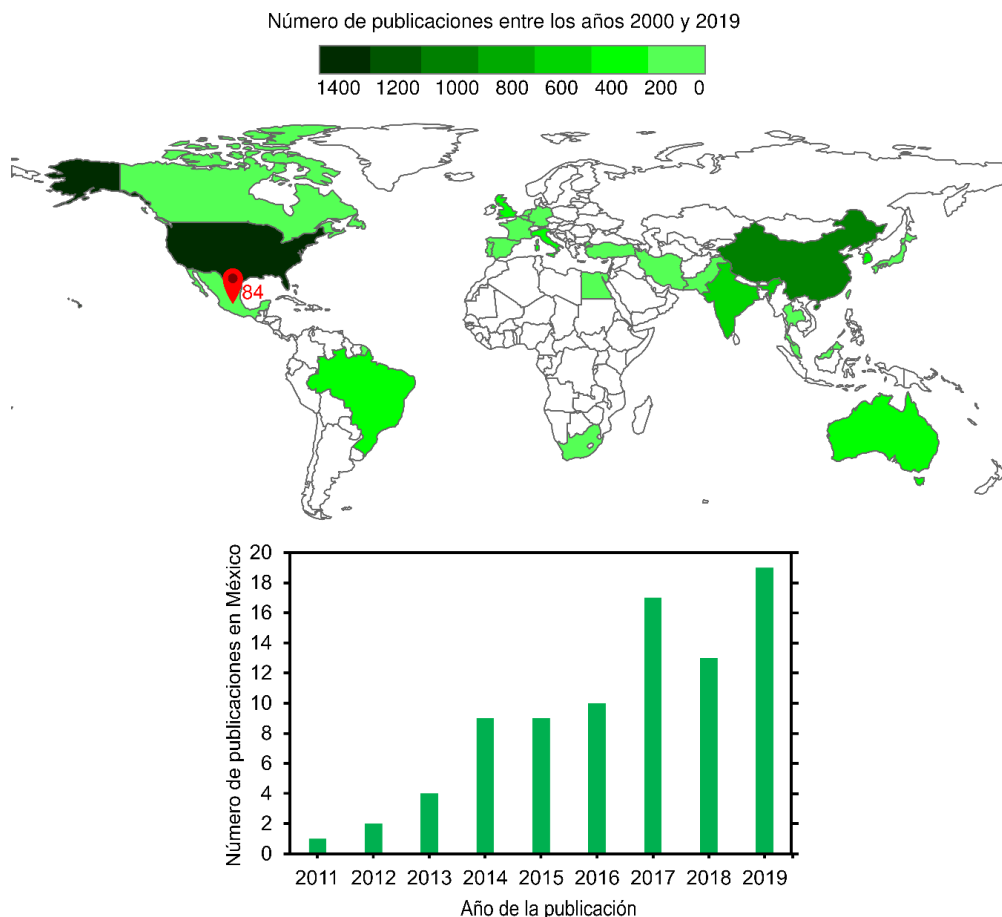


Figura 1.3. Número de artículos publicados mundialmente (arriba) y en México (abajo) relacionando microalgas con biorrefinería y biocombustibles. Fuente: ISI Web of Knowledge.

En las [Tablas 1.2.](#) y [1.3.](#) se compilan investigaciones en las cuales se usó biomasa microalgal del género *Scenedesmus* para la producción de hidrógeno por fermentación oscura y metano por digestión anaerobia, respectivamente. Las tablas muestran que hasta el momento no hay estudios sobre la producción continua de hidrógeno a partir de *Scenedesmus*, mientras que sí se han publicado algunos estudios sobre la producción continua o semicontinua de metano.

Tabla 1.2. Producción de hidrógeno en lote mediante fermentación oscura de biomasa microalgal del género *Scenedesmus*.

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de la fermentación oscura	H ₂ (mL/g ST)	Referencia
<i>S. obliquus</i>	Autoclave, 121 °C, 1.4 bar, 15 min y 2.5 g TS/L	^a V _R 129 mL, Agit: 220 rpm, Temp: 30 °C, Ino: <i>E. aerogenes</i> (0.1 g/L), Sus: 2.5 g ST/L	40.9	(Batista et al., 2018)
<i>S. obliquus</i>	Sin pretratamiento	^a Temp: 37 °C, Agit: 150 rpm, Ino: Lodo ^b y <i>C. butyricum</i> ; Sus: 50 g ST/L	48.9 ^c	(Ortigueira et al., 2015)
<i>S. obliquus</i>	Autoclave, 121 °C, 2 atm, 15 min	^a V _R 120 mL, Agit: 150 rpm, Temp: 37 °C, Ino: <i>E. aerogenes</i> (0.1 g/L), Sus: 2.5 g ST/L	45.1	(Batista et al., 2014b)
<i>S. obliquus</i>	Autoclave, 121 °C, 2 atm, 15 min	^a V _R 120 mL, Agit: 150 rpm, Temp: 37 °C, Ino: <i>C. butyricum</i> (0.1 g/L), Sus: 50 g ST/L	90.3	(Batista et al., 2014b)
<i>S. obliquus</i>	Sin pretratamiento	^a V _R 159 mL, Agit: 220 rpm, Temp: 30 °C, Ino: <i>E. aerogenes</i> , Sus: 2.5 g ST/L	56.8	(Batista et al., 2014a)
<i>S. obliquus</i> (RDEL)	100 °C, NaOH 8 g/L, 2.5 h y 6.7% (p/p) ST	^a V _R 300 mL, Agit: 180 rpm, Temp: 37 °C, pH 6.5, Ino: Lodo ^b 2.4 g SV/L, Sus: 18 g ST/L	49.5 ^c	(Yang et al., 2011)

Tabla 1.2. Continuación

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de la fermentación oscura	H ₂ (mL/g ST)	Referencia
<i>S. obliquus</i> (RDEL)	100 °C, NaOH 8 g/L, 8 h y 4% (p/p) ST	^a V _R 300 mL, Agit: 180 rpm, Temp: 37 °C, pH 6.3, Ino: lodo ^b 1.2 g SV/L, Sus: 18 g ST/L	45.54 ^c	(Yang et al., 2010)
<i>S. obliquus</i> YSW15	Sonicación 15 min	^a V _R 120 mL, Agit: 120 rpm, Temp: 35 °C, pH 5.5, Ino: lodo ^b 50% (v/v), Sus: 50% (v/v)	1.9 mol/mol eq. glucosa consumida	(Choi et al., 2011)

^aExperimentos en lote; ^bLodo anaerobio pretratado térmicamente; ^cmL/g SV; Agit: Agitación; Ino: Inóculo; RDEL: Residuos después de extracción de lípidos; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos volátiles; Sus: Sustrato; Temp: Temperatura; V_R: Volumen del reactor.

Tabla 1.3. Producción de metano mediante digestión anaerobia de biomasa microalgal del género *Scenedesmus*.

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de la digestión anaerobia	CH ₄ (mL/g SV)	Referencia
Experimentos en lote				
<i>S. obtusiusculus</i>	98 °C por 6 h	^a V _R 120 mL, Agit: 180 rpm, Temp: 37 °C, pH 7, Ino: 4 g SV/L, Sus: 2 g DQO/L	307	(Cortés-Carmona et al., 2018)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Sin pretratamiento	^{ab} V _E 150 mL, Agit: 300 rpm, Temp: 35 °C, pH ~7.5, Ino: 10 g SV/L, Sus: 5 g SV/L	356	(Fermoso et al., 2016)
<i>S. obliquus</i>	Sin pretratamiento	^{ab} V _R 8 mL, Temp: 38 °C, S/I: 1:120 (p/v)	213-401	(Klassen et al., 2015)
<i>Scenedesmus</i> sp.			140	(Ramos-Suárez et al., 2014b;
<i>Scenedesmus</i> sp. (RDEL)	Secado por congelamiento	^c V _E 1 L, Temp: 37 °C, S/I: 0.5 g SV/g SV	212.3	Ramos-Suárez y Carreras, 2014)
<i>Scenedesmus</i> sp. (RDEA)			272.8	

Tabla 1.3. Continuación.

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de la digestión anaerobia	CH ₄ (mL/g SV)	Referencia
<i>Scenedesmus</i> sp.			258	
<i>Scenedesmus</i> sp. AMDD	Sin pretratamiento	^{ab} V _R 0.5 L, Agit: 150 rpm, Temp: 35 °C, pH 7, Ino: 20 g SV/L, Sus: 10 g SV/L	306-410	(Frigon et al., 2013)
<i>S. dimorphus</i>			397	
<i>S. obliquus</i>	Sin pretratamiento	^{ab} V _E 1 L, Temp: 33 °C, Ino: 6 g SV/L, Sus: 2 g SV/L	210	(Zamalloa et al., 2012)
<i>S. obliquus</i> ^d	Sin pretratamiento	^{ab} V _R 250 mL, Temp: 38 °C, Sus: 2 g ST/L	178	(Mussnug et al., 2010)
Experimentos en continuo o semicontinuo				
<i>S.</i> <i>obtusiusculus</i>	98 °C por 6 h, 10 g DQO/L	^a RTAC, V _R 1 L, TRH 0.5 d, COV 10 g DQO/L-d, Agit: 180 rpm, Temp: 35 °C, pH 7.5; Ino: 10 g SV/L	178; ^d 1.2 L/L-d	(Cortés- Carmona et al., 2018)
<i>Scenedesmus</i> sp. AMDD	Sin pretratamiento	^{ab} RAFA, V _R 3.5 L, TRH 4.1 d, COV 3.2 g/L-d, Temp: 35 °C, Ino: 40 g SV/L, VFA: 2 m/h	180; ^d 0.6 L/L-d	(Tartakovsky et al., 2015)
<i>Scenedesmus</i> sp. (RDEA)	Secado por congelamiento	^a RTAC, V _R 3 L, TRH 20 d, COV 3.9 g SV/L-d, Agit: 35 rpm, Temp: 37 °C	291.5; ^d 1 L/L-d	(Ramos- Suárez et al., 2014a)

Tabla 1.3. Continuación.

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de la digestión anaerobia	CH ₄ (mL/g SV)	Referencia
<i>Scenedesmus</i> sp.	Sin pretratamiento	^a V _R 1.5 L, TRH 12.4 d, COV: 2-3.5 g SV/L-d, Agit: 40 rpm, Temp: 35 °C	130-140	(Tran et al., 2014)
<i>Scenedesmus</i> sp.	90 °C por 1 h, 14 g DQO/L	^a RTAC, V _R 1 L, TRH 15 d, COV 2.5 g DQO/L-d, Temp: 35 °C, pH 7-8, S/I: 0.5 g DQO/g SV	111.4	(González-Fernández et al., 2013)
<i>Scenedesmus</i> sp. AMDD	Sin pretratamiento	^{ab} RTAC, V _R 15 L, TRH: 58 d, COV: 0.2 g/L-d, Agit: 60 rpm, Temp: 35 °C, pH 7-7.4, Ino: 40 g SV/L,	370	(Tartakovsky et al., 2013)
<i>S. obliquus</i>	Sin pretratamiento	^{ab} RFH, V _R 2.3 L, TRH: 2.2 d, COV: 2.7 g SV/L-d Temp:33-54 °C, pH 7-7.5, VFA: 1 m/h	130-170; ^d 0.3-0.5 L/L-d	(Zamalloa et al., 2012)

^aLodo anaerobio granular; ^bBiomasa húmeda; ^cLodo anaerobio aclimatado; ^dVelocidad volumétrica de producción de metano; COV: Carga orgánica volumétrica; Ino: Inóculo; RAFA: Reactor anaerobio de flujo ascendente; RDEA: Residuos después de extracción de aminoácidos; RDEL: Residuos después de extracción de lípidos; RFH: Reactor de flujo híbrido; RTAC: Reactor de tanque agitado continuo; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos volátiles; Sus: Sustrato; S/I: Relación sustrato/inóculo; Temp: Temperatura; TRH: Tiempo de residencia hidráulico; V_E: Volumen efectivo; V_R: Volumen del reactor; VFA: Velocidad de flujo ascendente

Por otro lado, en las Tablas [1.2.](#) y [1.3.](#) se pueden observar variaciones en los rendimientos de hidrógeno y metano. Cabe resaltar, que estas variaciones pueden deberse a diferentes factores:

- Factores intrínsecos de la biomasa microalgal (p.ej. composición de la biomasa, tipo de biomasa i.e. pretratada, no pretratada, residuos después de extracción de lípidos o aminoácidos).
- Inóculo (p.ej. tipo de inóculo, concentración).
- Condiciones del ensayo (p.ej. duración, temperatura, etc.).

Actualmente, no existe un protocolo único o estándar de cómo realizar un ensayo de potencial bioquímico de producción de hidrógeno o metano (Carrillo-Reyes et al., 2019; Holliger et al., 2016). Generalmente, se suele seguir ya sea el protocolo descrito por Angelidaki et al. (2009) o el de la Sociedad Alemana de Ingenieros (VDI 4630, 2016). Como se mencionó anteriormente, dependiendo de las condiciones del ensayo y su duración, pueden existir apreciables variaciones en los rendimientos de hidrógeno y metano; más aún cuando algunas microalgas (p.ej. *Chlorella*, *Scenedesmus*) contienen materiales recalcitrantes, los cuales solo se pueden degradar en largos periodos de tiempo (Roberts et al., 2016). Las microalgas que poseen una pared celular recalcitrante dificultan la extracción de biocompuestos (lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos) y la producción de biocombustibles.

En general, la pared celular de las microalgas es compleja y varía de especie a especie ([Fig. 1.4.](#)) (Baudeflet et al., 2017). Las microalgas pertenecientes a la división Chlorophyta se caracterizan por poseer una pared celular compuesta por dos capas: una capa interior compuesta principalmente por una matriz de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa) y glicoproteínas (Baudeflet et al., 2017; Voigt et al., 2014) y una capa exterior con estructura trilaminar compuesta por biopolímeros como algaenan, los cuales le confieren una resistencia adicional a la pared celular (Burczyk y Dworzanski, 1988; Versteegh y Blokker, 2004). Por otra parte, la concentración de estos compuestos y la morfología de la pared celular

también puede variar dentro de una misma especie, dependiendo de las condiciones de crecimiento (p.ej. limitación de nutrientes) (Gerken et al., 2013).

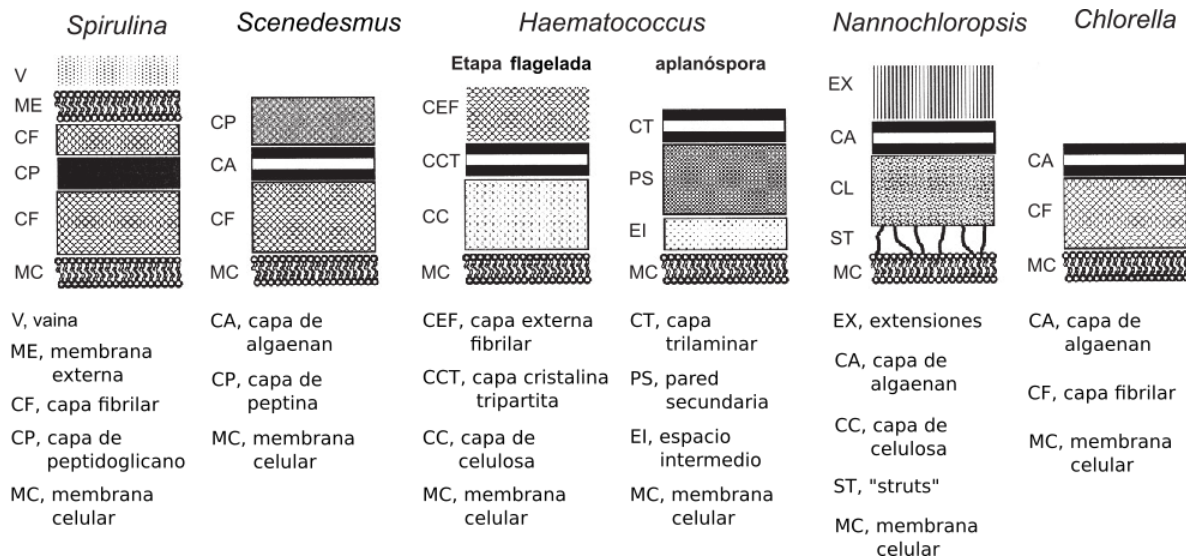


Fig. 1.4. Esquema de la pared celular de algunas microalgas de importancia biotecnológica. Modificado de D'Hondt et al. (2017).

En el caso específico de *Scenedesmus*, éste género tiene una pared celular con un alto contenido de glucosa, galactosa y manosa (Takeda, 1996). Se ha demostrado también que *Scenedesmus* es una de las microalgas que puede llegar a tener una pared celular con mayor recalcitrancia (González-Fernández et al., 2012a; Hernández et al., 2015). Mussgnug et al. (2010) monitorearon durante seis meses la digestión anaerobia de *Scenedesmus*, terminado el experimento encontraron algunas células sin ningún daño. La recalcitrancia de *Scenedesmus* se debe a la composición y estructura de su pared celular, la cual contiene algaenan (Fig. 1.5.); aunado a esto, los compuestos pécticos de la pared celular forman una red hexagonal de material denso en electrones sobre la capa superficial y se irradian en un sistema de túbulos desde la capa media para soportar la red, confiriéndole una mayor rigidez (Bisalputra y Weiser, 1963).

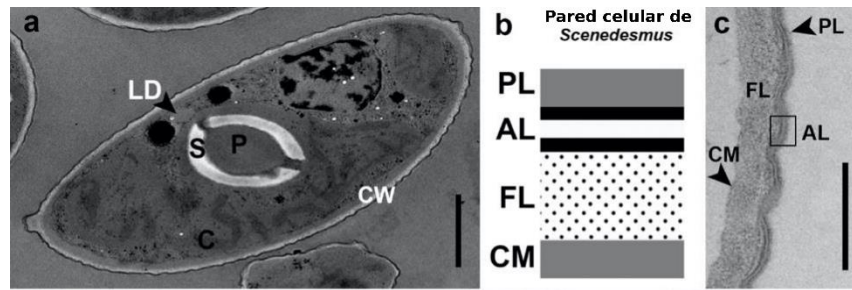


Fig. 1.5. Imágenes de microscopía electrónica de trasmisión de *Scenedesmus* AT-UAM. **a)** Componentes: C: Cloroplasto, P: Pirenoide, S: Almidón, CW: Pared celular; **b)** Esquema de la estructura de la pared celular de *Scenedesmus*, PL: Capa de pectina, AL: Capa de algaenan, FL: Capa fibrilar, CM: Membrana celular; **c)** Arquitectura y composición de la pared celular. Modificado de Sánchez-García et al. (2020).

Por otro lado, la producción de biocombustibles mediante los procesos de fermentación oscura y digestión anaerobia pueden afectarse por el alto contenido de proteínas en las microalgas (~20-60%). Esto es debido a que las proteínas son transformadas a NH_4^+ y NH_3 , causando inhibición o toxicidad a los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia, por lo que se puede producir una acumulación de ácidos grasos volátiles, los cuales también son tóxicos para los microorganismos hidrogenogénicos y metanogénicos (Montingelli et al., 2015). Sin embargo, se han reportado algunas posibles soluciones a estos inconvenientes. Por un lado, la recalcitrancia de la pared celular puede ser resuelta mediante la aplicación de uno o más pretratamientos (Tablas [1.2.](#) y [1.3.](#)). Existen reportes sobre diferentes tipos de pretratamientos (p.ej. químicos, térmicos, etc.), los cuales han sido usados tanto para biomasa algal (i.e. microalgas y macroalgas) como para residuos lignocelulósicos (Sankaran et al., 2020). Por otro lado, la inhibición por nitrógeno amoniacal puede evitarse mediante la codigestión con sustratos ricos en carbono (Solé-Bundó et al., 2019).

1.5. Justificación

El concepto de biorrefinería para la obtención y transformación de la biomasa microalgal es de gran relevancia tanto a nivel académico como industrial, debido a la amplia gama de enfoques que se pueden trabajar. Algunos de los posibles

enfoques en un esquema de biorrefinería, serían la combinación de procesos como la eliminación de compuestos contaminantes en aguas residuales que pueden eliminarse a partir del cultivo de microalgas, enriquecimiento del metano en el biogás mediante la remoción fotosintética de CO₂, extracción de productos de alto valor y la producción de biocombustibles. Sin embargo, tanto para la extracción de productos de alto valor como para la producción de biocombustibles es necesario romper la célula. Por lo tanto, es fundamental establecer las condiciones óptimas de hidrólisis, para lograr una eficiente liberación y solubilización del material intracelular y estructural de la biomasa microalgal. De esta forma, la materia orgánica soluble puede usarse en diferentes procesos, lo que dará como resultado la obtención de múltiples productos. Actualmente, no existen tecnologías comerciales para la producción de hidrógeno por fermentación oscura y de metano por digestión anaerobia a partir de biomasa microalgal. Esto debido principalmente a los bajos rendimientos de producción, bajas velocidades de producción, balances energéticos negativos y los costos no son competitivos con respecto a los combustibles fósiles. Sin embargo, se espera que en un futuro cercano mediante estas tecnologías se puedan producir combustibles que satisfagan algunas de las necesidades energéticas (p.ej. transporte). Es por ello que la investigación y desarrollo de estas alternativas energéticas renovables está creciendo, y se espera que en un futuro sea una de las alternativas que permitan poco a poco reemplazar el uso de biocombustibles de primera generación, terminando con el debate de biocombustibles *versus* seguridad alimentaria. La biomasa microalgal es clasificada como materia prima para la generación de biocombustibles de 3^a generación, se espera que junto con biocombustibles de 2^a generación compitan económicamente con los combustibles fósiles. Por lo tanto, las emisiones de gases de efecto invernadero disminuirían, así como también el calentamiento global. De acuerdo con esto, es importante encontrar estrategias que ayuden a mejorar la producción de biocombustibles. Entre las estrategias para superar los cuellos de botella del uso de biomasa microalgal, para producir hidrógeno por fermentación oscura y metano por digestión anaerobia, están los pretratamientos y codigestión con sustratos ricos

en carbono. La combinación de estas estrategias, entre otras, permitiría establecer procesos más robustos y eficientes.

1.6. Alcance y estructura de la tesis

Como se mencionó anteriormente, la producción de biocombustibles gaseosos (hidrógeno y metano) mediante la fermentación oscura o la digestión anaerobia de biomasa microalgal es un tema muy atractivo actualmente. La mayoría de los estudios de biocombustibles gaseosos derivados de biomasa microalgal tienen diferentes enfoques, como producción de hidrógeno (Yun et al., 2012) o metano (Ras et al., 2011) a partir de biomasa cruda (no pretratada), integración de la producción de hidrógeno y metano en un sistema de dos etapas (Wieczorek et al., 2014), comparación de pretratamientos (Passos et al., 2015), entre otros. En nuestro grupo de trabajo se han realizado investigaciones sobre la producción de biohidrógeno y biogás a partir de biomasa microalgal (Candia-Lomelí, 2018; Cortés-Carmona, 2016). A partir de estos trabajos se demostró que era necesario solubilizar un mayor porcentaje de carbohidratos y demanda química de oxígeno (DQO); además, como recomendación esos trabajos sugieren aclimatar el inóculo a la biomasa microalgal con el fin de aumentar los rendimientos y velocidades de producción de biohidrógeno y biogás. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue optimizar la solubilización de materia orgánica de *Scenedesmus obtusiusculus* mediante diferentes pretratamientos. Así como usar estrategias de aclimatación del inóculo y codigestión con un cosustrato rico en carbono para mejorar la producción de hidrógeno y metano en régimen en lote y semicontinuo.

En el Capítulo 2 la investigación fue dirigida a optimizar la solubilización de la materia orgánica de biomasa microalgal a través de un pretratamiento térmico con ácido diluido. Por lo que se planteó un diseño de experimentos, diseño factorial 2^4 , para evaluar la relevancia de los factores involucrados (i.e. temperatura, concentración de ácido, tiempo, y concentración de microalgas) en la solubilización de la DQO y carbohidratos. Posteriormente, el hidrolizado obtenido bajo las

condiciones óptimas predichas por el modelo estadístico se usó para evaluar su potencial bioquímico de producción de hidrógeno y metano.

Subsecuentemente, en el Capítulo 3 se presenta lo relacionado con la producción de hidrógeno en régimen continuo, mediante el proceso de fermentación oscura, usando como sustrato biomasa microalgal pretratada térmicamente. Para lograr lo anterior, el reactor fue alimentado inicialmente con un sustrato de fácil degradación (suero de leche) como estrategia para obtener un inóculo activo. Luego, el reactor se alimentó con hidrolizado de microalgas para evaluar su desempeño en la producción de hidrógeno.

En el Capítulo 4 se investigó la producción de metano mediante la digestión anaerobia de biomasa microalgal pretratada termoquímicamente. Por una parte, se usaron como estrategias la aclimatación del inóculo y la codigestión con suero de leche para mejorar la producción de metano. Por otra parte, con el fin de enriquecer el contenido de metano en el biogás, se usó como estrategia la digestión anaerobia en condiciones alcalinas.

Por último, en el Capítulo 5 se presenta una discusión profunda de los resultados obtenidos en esta tesis, así como las conclusiones y perspectivas que deja esta investigación.

Capítulo 2. Mejorando la biodegradabilidad de *Scenedesmus obtusiusculus* mediante pretratamiento termoquímico para producir hidrógeno y metano

Resumen

La hidrólisis puede ser considerada el cuello de botella en la producción de biocombustibles a partir de microalgas debido a la recalcitrancia de la pared celular de algunas microalgas (p.ej. *Scenedesmus*). El pretratamiento termoquímico es un proceso efectivo y ampliamente usado para solubilizar materia orgánica de diferentes tipos de biomasa. Sin embargo, la variabilidad de la pared celular entre diferentes especies de microalgas dificulta el desarrollo de un pretratamiento estándar. En este trabajo se analizaron e identificaron los factores más relevantes de la solubilización de materia orgánica de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus* mediante pretratamientos termoquímicos. El objetivo fue obtener hidrolizados ricos en materia orgánica soluble que permitieran alcanzar altos rendimientos de hidrógeno y metano en comparación con biomasa microalgal cruda. Se utilizó un diseño factorial 2^4 para identificar los factores significativos en el pretratamiento termoquímico. Los resultados mostraron que la temperatura (100 °C) y la concentración de HCl (3 %) fueron los factores más significativos para lograr una solubilización de carbohidratos cercana al 100%. Además, el tiempo de reacción (1.7 h) y la concentración de biomasa (30 g de sólidos totales/L) también fueron importantes para lograr hasta 60% de solubilización de demanda química de oxígeno (DQO). En general, los hidrolizados de microalga produjeron 48 NmL H₂/g sólido volátil (SV) y 296 NmL CH₄/g SV, los cuales son 1.7 y 1.3 veces más altos que el rendimiento de hidrógeno y metano, respectivamente, en comparación con la biomasa cruda. Estos resultados son relevantes debido a que altas concentraciones de carbohidratos y DQO solubles permitirán la aplicación de altas velocidades de cargas orgánicas en reactores en continuo, para la producción de biocombustibles usando biomasa renovable como lo son las microalgas.

Una versión modificada de este capítulo ha sido publicada como:

Rincón-Pérez, J.A., Razo-Flores, E., Morales, M., Alatraste-Mondragón, F., Celis, L.B. (2020). Improving the biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by thermochemical pretreatment to produce hydrogen and methane. *BioEnergy Research*. 13: 477-486. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10067-w>

2.1. Introducción

La pared celular de algunas especies de microalgas puede llegar a ser muy resistente, lo cual representa un cuello de botella en la producción de biocombustibles; aunque las bacterias hidrolíticas pueden degradar la pared celular mediante enzimas extracelulares, este proceso es demasiado lento, limitando la biodegradabilidad de las microalgas para lograr un proceso eficiente de producción de hidrógeno y metano. Una forma de superar este inconveniente es mediante el pretratamiento de la biomasa. Sin embargo, es importante considerar que la composición de la pared celular de la microalga es afectada por las condiciones de crecimiento (p.ej. limitación de nutrientes, fotoperiodo, etc.), así como la etapa de crecimiento en la cual fue cosechada (Yap et al., 2016). Eventualmente habrá una gran variación en la biodegradabilidad de diferentes lotes de microalgas, incluso cuando éstas sean de la misma cepa (Martín Juárez et al., 2018). La biomasa microalgal ha sido pretratada mediante diferentes métodos, por ejemplo:

- Físicos (p.ej. molienda, ultrasonido, microondas, térmico, etc.)
- Químicos (p.ej. alcalinos o ácidos)
- Biológicos (p.ej. enzimáticos)
- Combinados (p.ej. termoquímicos, químicos y enzimáticos, etc.)

En particular, los hidrolizados de microalgas obtenidos mediante pretratamientos térmicos con ácido diluido alcanzan a solubilizar entre 68.7 y 100% de los carbohidratos (Carrillo-Reyes y Buitrón 2016; Park et al., 2016), lo cual es superior a lo obtenido con pretratamientos hidrotérmicos (~ 12%) (Passos et al., 2015), microondas (~ 12%) (Passos et al., 2015), sonicación (~ 9%) (Passos et al., 2015), enzimáticos + autoclave (~ 55%) (Hernández et al., 2015) y alcalino térmicos (31%) (Solé-Bundó et al., 2017). A pesar de que el pretratamiento térmico con ácido diluido es un método efectivo y ampliamente usado, es necesario identificar cuáles son los factores que tienen un impacto significativo sobre el rompimiento de las células.

La razón fundamental de este trabajo es ampliar el conocimiento de la región experimental (condiciones experimentales) del pretratamiento térmico con ácido diluido para alcanzar altos porcentajes de solubilización de materia orgánica, como carbohidratos y DQO, dentro de un marco de diseño de experimentos. Esto es relevante dado que la optimización de un pretratamiento general no es factible, debido a las variaciones en la composición de la pared celular de cada especie de microalga (Dong et al., 2016). La solubilización de biomasa es primordial debido a que la materia orgánica disponible en forma soluble es indispensable para producir biocombustibles a través de procesos de fermentación o transesterificación (Kumar et al., 2016). Aunque varios pretratamientos térmicos con ácido diluido han sido aplicados a biomasa microalgal (Carrillo-Reyes y Buitrón 2016; Hernández et al., 2015; Park et al., 2016), hasta donde llega nuestro conocimiento, la mayoría de estos trabajos no evaluaron el efecto de todos los factores involucrados en la solubilización de materia orgánica (temperatura, tiempo, concentración de ácido y biomasa). En tal sentido, el principal objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de los factores involucrados en el pretratamiento térmico con ácido diluido (temperatura, tiempo de reacción, concentración de HCl y microalga) sobre la solubilización de carbohidratos y DQO, mediante un diseño de experimentos usando la microalga *Scenedesmus obtusiusculus*. Posteriormente, los hidrolizados fueron usados para evaluar su potencial bioquímico de producción de hidrógeno y metano.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Biomasa microalgal e inóculo anaerobio

La microalga usada en este trabajo fue *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, la cual fue previamente aislada de la laguna Churince de la cuenca de Cuatro Ciénegas, localizada en el desierto Chihuahuense (Coahuila, México). Las muestras tomadas fueron usadas para cultivar la microalga en medio mineral BG-11 (Toledo-Cervantes et al., 2013). Esta cepa es capaz de crecer en amplios intervalos de temperatura y radiación solar, lo que la hace apropiada para su cultivo a la intemperie. La microalga aislada fue cultivada en un fotobiorreactor de columna de

burbujeo de 24 L construido en acrílico. La velocidad de flujo del gas fue de 3 L/min, el cual contenía 2% de CO₂ y fue alimentado sólo durante las horas de luz del día. Los experimentos fueron realizados a la intemperie en la Universidad Autónoma Metropolitana - Cuajimalpa en la Ciudad de México (latitud 19° 21' 41" N y longitud 99° 04' 22" W), expuestos a ciclos circadianos de radiación solar (0–1200 μmol/m²-s), y de temperatura (10–30 °C), con un promedio de tiempo de luz diurna de 10 h. El sistema fue operado en lote por 3 semanas, la biomasa fue cosechada usando quitosano como floculante tal como fue descrito por Cortés-Carmona et al. (2018). Posteriormente la biomasa fue centrifugada (4000 rpm, 10 min), secada (60 °C), molida en un mortero y tamizada en una malla de 500 μm. La biomasa microalgal fue caracterizada en términos de sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), DQO (total y soluble), carbohidratos (totales y solubles) y contenido de proteína tal como es descrito en la sección de métodos analíticos. El inóculo usado en los ensayos de producción de hidrógeno y metano fue lodo anaerobio granular obtenido de un reactor anaerobio de flujo ascendente alimentado con vinazas de tequila, donado por la destilería Casa Herradura (Jalisco, México). El lodo granular tenía las siguientes características: 15.36 ± 0.07% ST, 13.84 ± 0.06% SV y una actividad metanogénica acetoclástica de 0.38 g DQO-CH₄/g SV-d.

2.2.2. Diseño de experimentos para los pretratamientos

El pretratamiento térmico con ácido clorhídrico (HCl) diluido fue elegido como el método de hidrólisis para solubilizar la materia orgánica de *S. obtusiusculus*. Un diseño de experimentos factorial 2⁴ con puntos centrales fue usado para determinar los factores más significativos. Cuatro parámetros operacionales fueron seleccionados como factores y cada uno tuvo tres niveles:

- I. Temperatura (A) 100, 130 y 160 °C
- II. Tiempo de reacción (B) 1.5, 2.75 y 4 h
- III. Concentración de ácido 0, 1.5 y 3 % (p/p)
- IV. Concentración de microalga 10, 20 y 30 g ST/L

El número total de ensayos fue 19 y las variables de respuesta fueron las eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO. El diseño de experimentos fue analizado con variables codificadas ([Ecuación 2.1.](#)), las cuales permiten observar la importancia relativa de cada factor.

$$X = [X' - (X'_A + X'_B) / 2] / [(X'_A - X'_B) / 2] \quad (2.1.)$$

Dónde X y X' denotan las variables codificadas y reales, respectivamente. Los subíndices A y B se refieren a nivel alto y bajo, respectivamente. Más detalles de la interpretación estadística pueden ser encontrados en Montgomery (2012). Un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial con un nivel de significancia de 5% fue usado para determinar los factores y las interacciones estadísticamente significativas. Las variables de respuesta (eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO) fueron verificadas experimentalmente bajo las condiciones predichas por el modelo.

2.2.3. Ensayo de potencial bioquímico de hidrógeno en lote

Los experimentos de potencial bioquímico de hidrógeno (PBH) fueron realizados en el equipo AMPTS II (por sus siglas en inglés *Automatic Methane Potential test system*, Bioprocess Control, Lund, Suecia), siguiendo el protocolo interlaboratorio establecido por Carrillo-Reyes et al. (2019). La solución buffer usada fue MES (ácido 2-N-Morfolino etano sulfónico), mientras que el sustrato usado fue el hidrolizado de microalga obtenido bajo las condiciones predichas por el modelo resultante del diseño de experimentos. Antes de usar el hidrolizado fue neutralizado a pH 7–7.5 con NaOH 10 M y diluido hasta obtener una concentración final de 5 g carbohidratos solubles/L. Adicionalmente, la biomasa cruda fue usada como control, a la misma concentración de SV que en el experimento con hidrolizado (14.9 g SV/L). A su vez, un control positivo fue realizado usando glucosa como sustrato (5 g carbohidratos solubles/L). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La relación sustrato/inóculo de los experimentos con hidrolizado de microalga fue 2.7 g carbohidratos solubles/g SV de acuerdo con Carrillo-Reyes et al. (2019), mientras

que en el experimento con biomasa cruda la relación fue 8.1 g carbohidratos solubles/g SV. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo modificado de Gompertz, dado que es un modelo ampliamente aceptado para describir tanto las cinéticas de producción de hidrógeno como las de metano (Zahan et al., 2018).

2.2.4. Ensayo de potencial bioquímico de metano en lote

El potencial bioquímico de metano (PBM) del hidrolizado de microalga y de la biomasa cruda (control) fueron determinados en el AMPTS II. El medio mineral usado en la producción en lote de metano fue el propuesto por Angelidaki et al. (2009). El inóculo usado fue lodo anaerobio granular y la relación inóculo/sustrato fue 1.3–2 g SV/g SV. El sustrato usado fue hidrolizado de microalga obtenido bajo las mismas condiciones de pretratamiento que en el ensayo de PBH. Este hidrolizado fue diluido hasta obtener 5 g DQO soluble/L (equivalente a 7.85 g SV/L), mientras que el experimento con biomasa cruda 7.85 g SV/L (misma concentración de SV que había en el experimento con hidrolizado). Un experimento con glucosa (5 g DQO soluble/L) como sustrato fue usado como control positivo. En todos los experimentos la alcalinidad fue ajustada con NaHCO_3 para obtener un equivalente de 3 g CaCO_3 /L y el pH inicial fue de 8.5 ± 0.26 . El espacio de cabeza de las botellas fue purgado con N_2 por 3 min para asegurar un ambiente anaerobio. El AMPTS II fue configurado para que el contenido de las botellas fuera continuamente agitado a 120 rpm y la temperatura estuviera a 37 °C.

El volumen de metano fue registrado en línea a partir de la liberación continua del biogás producido después de pasar a través de una unidad de absorción de CO_2 (NaOH 3 N). Los datos experimentales fueron ajustados al modelo modificado de Gompertz (Carrillo-Reyes y Buitrón 2016). La [Fig. 2.1.](#) muestra un diagrama del enfoque experimental utilizado.

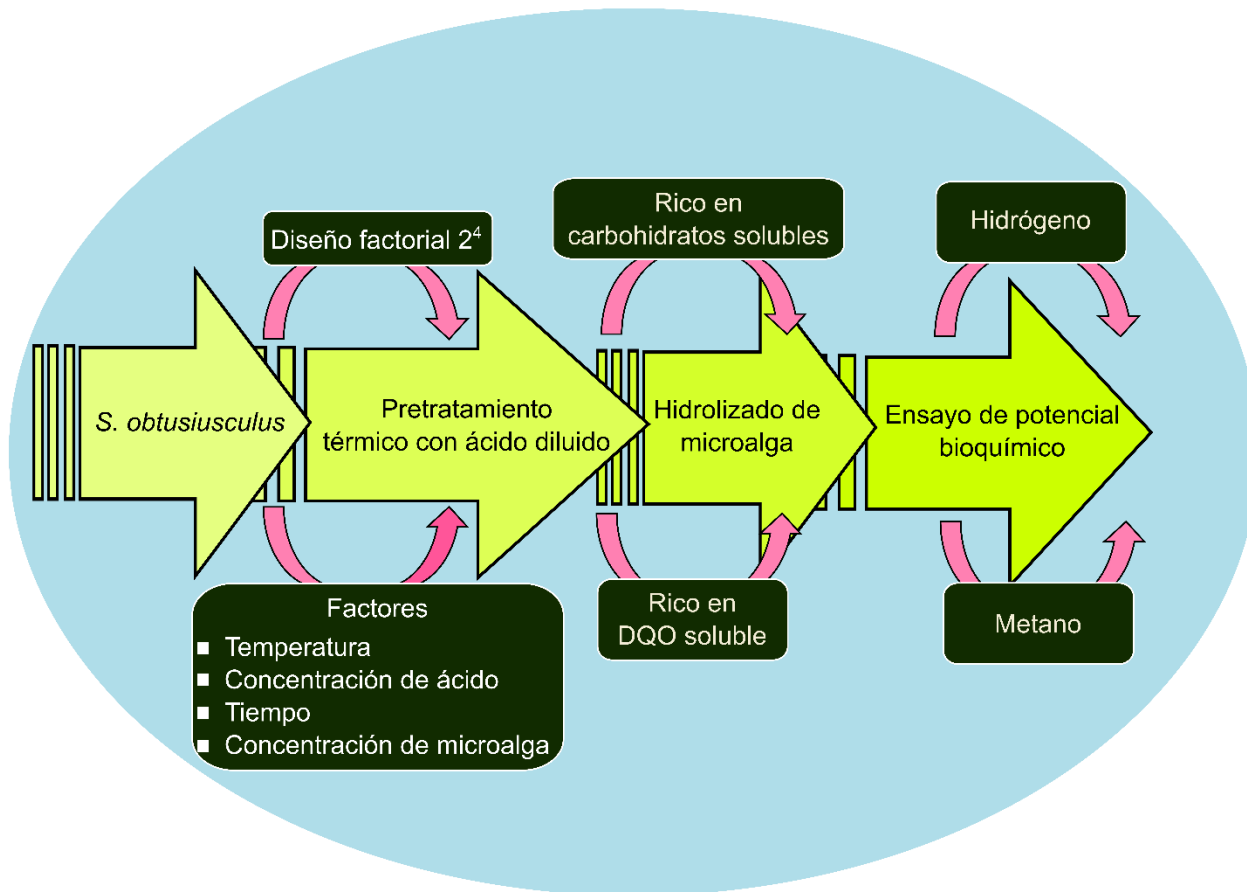


Fig. 2.1. Diagrama de la producción en lote de hidrógeno y metano a partir de biomasa microalgal.

2.2.5. Métodos analíticos

El contenido de carbohidratos y proteínas de la biomasa microalgal fue determinado de acuerdo a lo descrito por Toledo-Cervantes et al. (2018). Los ST y SV, así como la DQO total y soluble fueron determinados de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 1999). Los carbohidratos solubles fueron determinados de acuerdo al método espectrofotométrico reportado por DuBois et al. (1956). Los volúmenes de hidrógeno y metano son reportados a condiciones estándar de temperatura y presión (0 °C y 1 atm). Las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) fueron cuantificadas por electroforesis capilar (Cortés-Carmona et al., 2018), para determinar la concentración de intermediarios residuales.

2.2.6. Análisis estadístico

El software R versión 3.5.1 fue usado para crear y analizar el diseño de experimentos, así como también para los análisis estadísticos ANOVA y Tukey. Los resultados de los PBH y PBM fueron comparados a través de ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Después del ANOVA, la prueba de Tukey fue usada para determinar las diferencias mínimas entre los promedios de los factores y así encontrar los factores significativos.

2.2.7. Cálculos

Las eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO fueron calculadas de acuerdo a la [Ecuación 2.2](#):

$$Y_{ES} = (Y_P - Y_0) / (Y_T - Y_0) * 100 \quad (2.2.)$$

Dónde Y_{ES} denota la eficiencia de solubilización de carbohidratos o DQO; Y es la concentración de carbohidratos o DQO; los subíndices denotan: P, concentración soluble después de pretratar; T, concentración total (soluble y fracción particulada); 0, concentración soluble de la biomasa microalgal sin pretratar.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Pretratamientos, interacción de los factores y solubilización de materia orgánica

La biomasa cruda de *Scenedesmus obtusiusculus* tenía las siguientes características: $92.4 \pm 0.6\%$ ST, $88.4 \pm 0.6\%$ SV, 0.3 ± 0.0 g carbohidratos totales/g ST, 0.1 ± 0.0 g carbohidratos solubles/g ST, 1.4 ± 0.2 g DQO total/g ST y 0.1 ± 0.1 g DQO soluble/g ST. A partir de la biomasa microalgal cruda (no pretratada) se obtuvo un porcentaje de carbohidratos solubles de 24%, el cual fue superior al porcentaje de DQO soluble (ca. 10%).

El nivel de los factores usados en éste trabajo se eligió con base a la literatura revisada de pretratamientos termoquímicos. Estas condiciones pueden ser muy

variables, por ejemplo, los tiempos de reacción usados en biomasa algal están entre 0.5 a 5 h (Sivagurunathan et al., 2017; Solé-Bundó et al., 2017) o incluso de 0.5 a 25 min (Deng et al., 2019) para biomasa lignocelulósica.

A partir de los 19 pretratamientos evaluados ([Tabla 2.1.](#)), se alcanzaron eficiencias de solubilización de carbohidratos de 100% ([Fig. 2.2.](#)), mientras que las eficiencias de solubilización de DQO estuvieron cerca del 60% ([Fig. 2.3.](#)). El modelo predijo las siguientes condiciones: 30 g ST/L, 105 °C, 1.7 h y 3% (p/p) HCl; con las cuales se obtuvo el hidrolizado para los experimentos de PBH y PBM. El hidrolizado tuvo las siguientes características: 21.2 ± 2.2 g DQO soluble/L y 9.7 ± 0.6 g carbohidratos solubles/L, estas concentraciones equivalen a $41 \pm 6.0\%$ y $98 \pm 7.3\%$ de eficiencia de solubilización de DQO y carbohidratos, respectivamente. Los factores temperatura y concentración de ácido, así como su interacción, fueron estadísticamente significativos y tuvieron una mayor influencia en la eficiencia de solubilización de carbohidratos ([Tabla 2.2.](#)). En el caso de la eficiencia de solubilización de DQO, el efecto individual de todos los factores evaluados así como las interacciones entre ellos (temperatura:HCl, temperatura:biomasa, tiempo:HCl, temperatura:tiempo:HCl y temperatura:HCl:biomasa) fueron estadísticamente significativos ([Tabla 2.3.](#)).

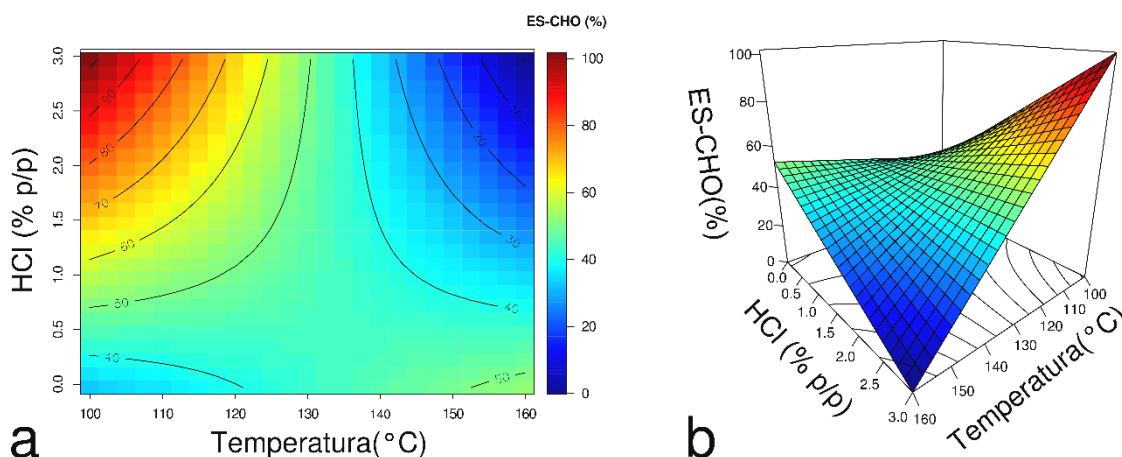


Fig. 2.2. Gráfica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) de la eficiencia de solubilización de carbohidratos (ES-CHO) a partir de la interacción temperatura:concentración de HCl.

Tabla 2.1. Diseño factorial completo con puntos centrales para los pretratamientos y los resultados de las concentraciones de carbohidratos solubles (CHO_s) y DQO soluble (DQO_s).

^a Orden est.	A: Temperatura (°C)		B: Tiempo (h)		C: HCl (%)		D: Biomasa (g ST/L)		Variable de respuesta	
	Original	Código	Original	Código	Original	Código	Original	Código	CHO _s (g/L)	DQO _s (g/L)
1	100	-1	1.5	-1	0	-1	10	-1	0.94 ± 0.16	2.89 ± 0.10
2	160	1	1.5	-1	0	-1	10	-1	1.54 ± 0.12	4.37 ± 0.43
3	100	-1	4	1	0	-1	10	-1	1.08 ± 0.13	2.97 ± 0.10
4	160	1	4	1	0	-1	10	-1	1.36 ± 0.11	6.38 ± 0.81
5	100	-1	1.5	-1	3	1	10	-1	2.33 ± 0.17	5.97 ± 0.52
6	160	1	1.5	-1	3	1	10	-1	0.48 ± 0.10	8.48 ± 0.42
7	100	-1	4	1	3	1	10	-1	2.35 ± 0.12	7.05 ± 0.63
8	160	1	4	1	3	1	10	-1	0.30 ± 0.05	7.97 ± 0.53
9	100	-1	1.5	-1	0	-1	30	1	2.98 ± 0.27	7.02 ± 0.74
10	160	1	1.5	-1	0	-1	30	1	3.84 ± 0.77	10.48 ± 0.61
11	100	-1	4	1	0	-1	30	1	3.38 ± 0.33	7.41 ± 0.56
12	160	1	4	1	0	-1	30	1	4.50 ± 0.45	14.95 ± 1.15

Tabla 2.1. Continuación.

Orden est.	A: Temperatura (°C)		B: Tiempo (h)		C: HCl (%)		D: Biomasa (g ST/L)		Variable de respuesta	
	Original	Código	Original	Código	Original	Código	Original	Código	CHO _s (g/L)	DQO _s (g/L)
13	100	-1	1.5	-1	3	1	30	1	7.45 ± 0.06	17.10 ± 0.41
14	160	1	1.5	-1	3	1	30	1	1.04 ± 0.48	19.79 ± 2.34
15	100	-1	4	1	3	1	30	1	7.42 ± 0.16	21.96 ± 1.80
16	160	1	4	1	3	1	30	1	0.95 ± 0.17	18.68 ± 0.36
17	130	0	2.75	0	1.5	0	20	0	4.20 ± 0.48	14.35 ± 0.54
18	130	0	2.75	0	1.5	0	20	0	4.20 ± 0.61	14.75 ± 0.27
19	130	0	2.75	0	1.5	0	20	0	4.16 ± 0.47	14.95 ± 0.20

^aOrden estándar

Los resultados indican que la eficiencia de solubilización de carbohidratos fue favorecida por el efecto de la temperatura, mientras que el tiempo de reacción, concentración de ácido y biomasa tuvieron un impacto negativo ([Fig. 2.4.a](#)). En contraste la solubilización de DQO fue promovida principalmente por la concentración de HCl ([Fig. 2.4.b](#)). La adición de ácido diluido resultó en eficiencias de solubilización de DQO cercanas al 55%. Interesantemente, la concentración de microalga tuvo un efecto negativo y, cuando ésta pasó de 10 a 30 g ST/L, la eficiencia de solubilización de DQO disminuyó ([Fig. 2.4.](#)). Un análisis detallado muestra que la solubilización de carbohidratos es mejorada a bajos niveles de temperatura (valores cercanos a 100 °C) y altos niveles de HCl (valores cercanos a 3% p/p). Cuando el ácido no fue adicionado la eficiencia de solubilización de carbohidratos estuvo alrededor del 50%, mientras que cuando sí se adiciono estuvo cerca del 100% ([Fig. 2.2.](#)).

Los modelos de las eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO son descritos en las Ecuaciones [2.3.](#) y [2.4.](#), respectivamente. Estas ecuaciones fueron usadas para generar sus respectivas gráficas de superficie de respuesta y de contorno (Figs. [2.2.](#) y [2.3.](#)).

$$\begin{aligned}
 & \textit{Eficiencia de} \\
 & \textit{solubilización de} \\
 & \textit{de carbohidratos} = 40.67 - 20.65A + 4.03C - 30.20AC \quad (2.3.)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \textit{Eficiencia de} \\
 & \textit{solubilización de} \\
 & \textit{de DQO} = 38.64 + 7.83A + 3.67B + 16.89C - 14.61D - 3.54AC - \\
 & \quad 3.22AD - 1.25BC - 4.57ABC - 1.60ACD \quad (2.4.)
 \end{aligned}$$

Donde A, B, C y D se refieren a las variables codificadas: temperatura, tiempo de reacción, concentraciones de ácido y biomasa, respectivamente. Los modelos de las eficiencias de solubilización (carbohidratos y DQO) tuvieron una R² de 0.95, indicando un buen ajuste entre los valores predichos y los experimentales.

A partir de los resultados del diseño de experimentos se encontró que la temperatura y la concentración de ácido clorhídrico fueron los factores que más influenciaron la solubilización de carbohidratos, lo cual confirmó observaciones previas. En el presente trabajo, la solubilización de carbohidratos estuvo cerca del 100%, siendo superior al 85% que reportó Martín Juárez et al. (2018), a partir de un cultivo mixto de microalgas dominado por *Scenedesmus*. En el presente estudio, es muy probable que la combinación de temperatura (100 °C) y ácido diluido (3% p/p) haya permitido la disrupción de la pared celular, liberando polisacáridos intracelulares y estructurales. *S. obtusiusculus* pertenece a la división *Chlorophyta*, la cual se caracteriza por tener una pared celular compuesta principalmente por hemicelulosa y celulosa, con alrededor de 70% de glucosa y 30% de galactosa y manosa; adicionalmente, esta especie de microalga contiene almidón intracelular (Chen et al., 2013). Posteriormente, los polisacáridos liberados podrían ser convertidos en oligosacáridos o monosacáridos. Estos hallazgos están alineados con los resultados reportados a partir de biomasa microalgal pretratada termoquímicamente (Carrillo-Reyes y Buitrón, 2016; Dong et al., 2016; Martín Juárez et al., 2018).

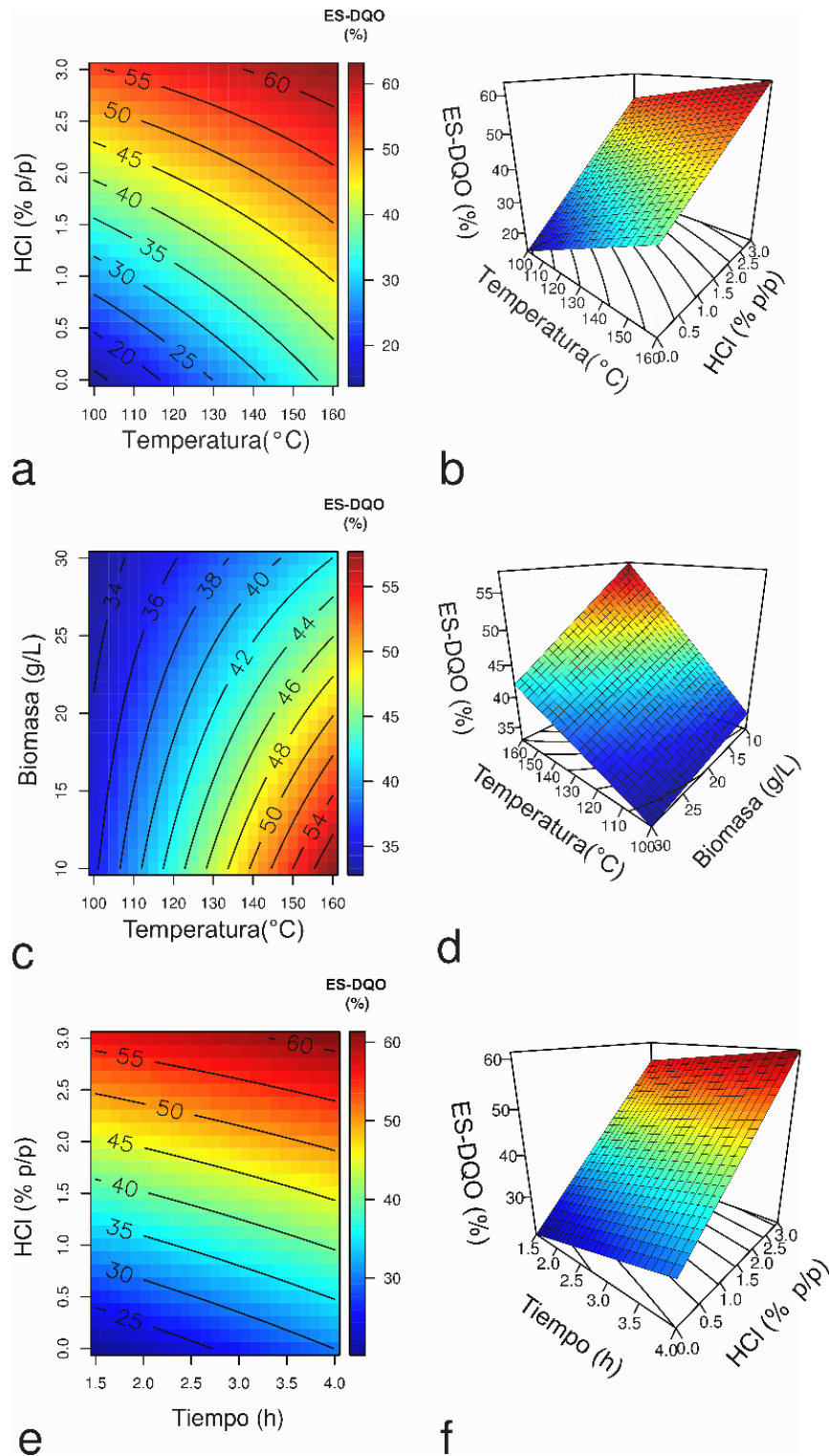


Fig. 2.3. Gráfica de contornos y sus respectivas superficies de respuesta de eficiencia de solubilización de DQO (ES-DQO), a partir de las interacciones temperatura:concentración de HCl (a y b), temperatura:biomasa (c y d) y tiempo de reacción:concentración de HCl (e y f).

Tabla 2.2. Análisis de varianza de los resultados obtenidos a partir del modelo reducido de la eficiencia de solubilización de carbohidratos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr(>F)
Modelo	3	21681.16	21681.16	369.99	< 0.0001 ***
A	1	204745	20474.89	349.40	< 0.0001 ***
C	1	781	781.01	13.33	0.0006 ***
A:C	1	43788	43787.58	747.23	< 0.0001 ***
Residuales	52	3047	58.60		
Falta de ajuste	12	755	62.88	1.10	0.3887
Error puro	40	2293	57.31		

Códigos significativos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla 2.3. Análisis de varianza de los resultados obtenidos a partir del modelo reducido de la eficiencia de solubilización de DQO.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr(>F)
Model	9	20596.07	2288.45	126.91	< 0.0001 ***
A	1	2945.33	2945.33	163.34	< 0.0001 ***
B	1	645.63	645.63	35.8	< 0.0001 ***
C	1	13686.31	13686.31	759.01	< 0.0001 ***
D	1	1021.76	1021.76	56.66	< 0.0001 ***
A:C	1	600.24	600.24	33.29	< 0.0001 ***
A:D	1	498.71	498.71	27.66	< 0.0001 ***
B:C	1	74.75	74.75	4.15	0.0475 *
A:B:C	1	1000.65	1000.65	55.49	< 0.0001 ***
A:C:D	1	122.69	122.69	6.8	0.0122 **
Residuales	46	829.46	18.03		
Falta de ajuste	6	53.18	8.86	0.46	0.8359
Error puro	40	776.28	19.41		

Códigos significativos: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

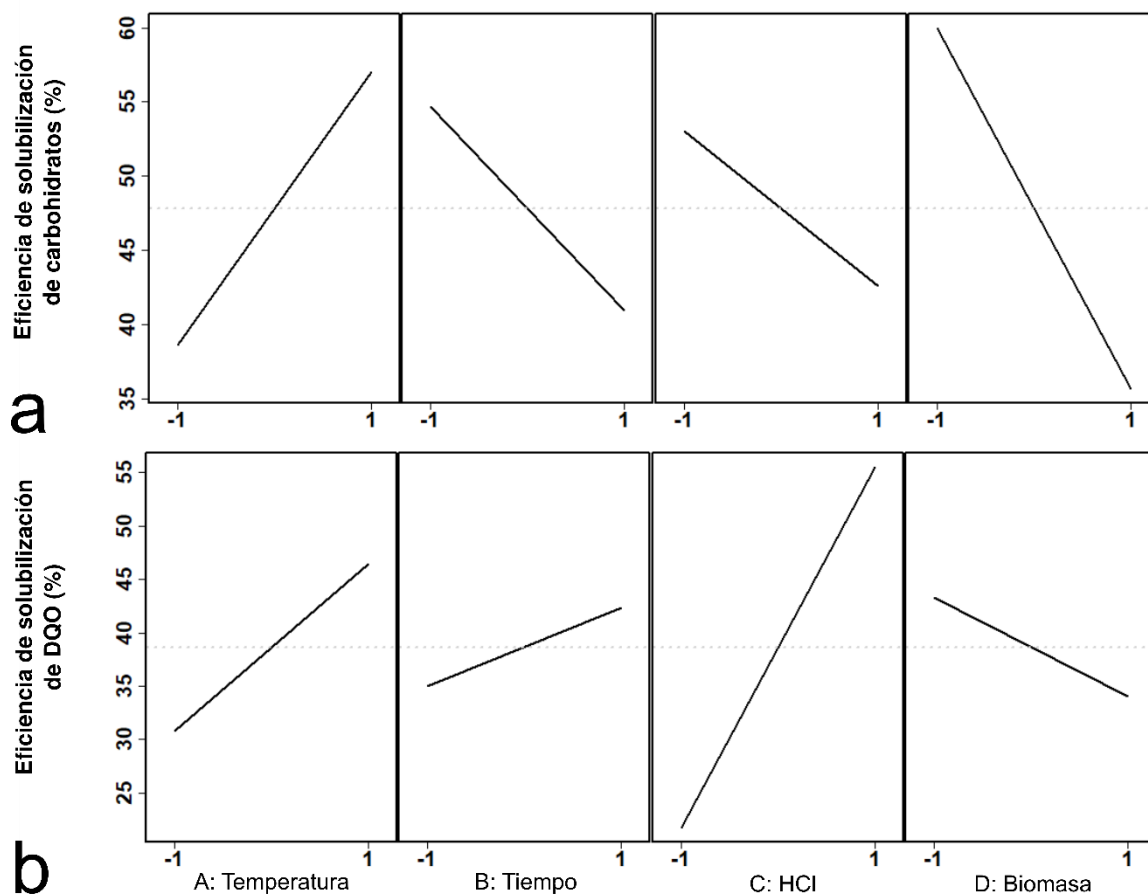


Fig. 2.4. Gráficas de efectos principales de los diferentes factores usados en el diseño de experimentos del pretratamiento termoquímico sobre la eficiencia de solubilización de a) carbohidratos y b) DQO. Los números -1 y 1 en los ejes X denotan los niveles alto y bajo del diseño de experimentos, respectivamente.

En contraste, la baja eficiencia de solubilización de carbohidratos obtenida a alta temperatura (160 °C) y tiempos de reacción entre 1.5–4 h, en la presencia de HCl (3% p/p), sugiriendo que tales condiciones podrían transformar los carbohidratos en otros compuestos. El incremento excesivo en alguno de los otros factores del pretratamiento conduce a la degradación de los carbohidratos. Este problema fue observado con biomasa microalgal y lignocelulósica. Deng et al. (2019), encontró una disminución en el rendimiento de carbohidratos cuando incrementó el tiempo de reacción de 15 a 20 min o cuando incrementó la concentración de ácido de 2 a 4%. Bajo estas condiciones los carbohidratos son transformados a compuestos

furánicos o ácidos orgánicos (Chen et al., 2013; Deng et al., 2019; Hernández et al., 2015). Dichos compuestos contribuyen en la concentración de DQO soluble, pero, debido a la severidad del pretratamiento se disminuye la concentración de carbohidratos solubles, pero no la de DQO. Otros estudios han demostrado que altas temperaturas en combinación con ácido diluido por cortos tiempos de reacción (menos de 1 h) favorece la solubilización de carbohidratos de la biomasa microalgal. Un ejemplo de esto es lo reportado por Dong et al. (2016) y Carrillo-Reyes y Buitrón (2016), los cuales obtuvieron eficiencias de solubilización similares, ~ 80 y 100% respectivamente; estos resultados son congruentes con las eficiencias de solubilización de carbohidratos obtenidas en el presente trabajo.

Un sustrato con una alta concentración de carbohidratos solubles es muy relevante en el proceso de la fermentación oscura, debido a que el hidrógeno es producido principalmente a partir de carbohidratos, esto se ha demostrado con diversos sustratos tales como suero de leche 20 g/L (Palomo-Briones et al., 2017) y glucosa 10/g/L (Bárceñas-Ruiz et al., 2016). En el presente trabajo, la más alta concentración de carbohidratos solubles fue 2.35, 4.2 y 7.45 g carbohidratos solubles/L a partir una concentración inicial de biomasa de 10, 20 y 30 g microalga/L, respectivamente ([Tabla 2.1.](#)). Estas concentraciones son superiores en comparación con lo reportado previamente a partir de biomasa microalgal pretratada con diferentes métodos de disrupción celular (Carrillo-Reyes y Buitrón, 2016; Cortés-Carmona et al., 2018; Liu et al., 2012; Passos et al., 2015). Los resultados también muestran que altas temperaturas ≥ 160 °C, tiempos de reacción ≥ 4 h y concentraciones de HCl $\geq 3\%$ p/p promueven la solubilización de DQO, mientras que altas concentraciones de biomasa producen una disminución de DQO ([Fig. 2.4.b](#)). Esta disminución también ha sido reportada en otros estudios y, es probable que sea debido al incremento de la relación sólido/líquido, la cual promueve la formación de aglomerados dificultando la transferencia de calor (Carrillo-Reyes y Buitrón, 2016; Cortés-Carmona et al., 2018; González-Fernández et al., 2012b). En consecuencia, la disrupción de la pared celular y la liberación de materia orgánica intracelular de estos aglomerados no es llevada a cabo

efectivamente. Sin embargo, en este trabajo, la eficiencia de solubilización de DQO alcanzó hasta 60%, lo cual es similar (51%) a lo reportado por Carrillo-Reyes y Buitrón (2016) con un pretratamiento termoquímico. Vale la pena mencionar que incluso este 60% de solubilización de DQO resultó superior en comparación con las eficiencias que generalmente son obtenidas con otros pretratamientos. La solubilización de DQO obtenida a partir de *Scenedesmus* con diversos pretratamientos como térmico o ultrasonificación estuvieron entre 7.6 y 8.5% (González-Fernández et al., 2013, González-Fernández et al., 2012b), mientras que con autoclave o electrólisis la eficiencia de solubilización de DQO estuvo entre 16.4 y 21.3% (G. Kumar et al., 2016).

En el presente trabajo el pretratamiento termoquímico permitió obtener altas concentraciones de DQO soluble ([Tabla 2.1.](#)), en comparación con las concentraciones de DQO soluble (~ 1.23 a 5 g/L) típicamente usadas para la digestión anaerobia de biomasa microalgal (Cortés-Carmona et al., 2018; Kumar et al., 2017; Martín Juárez et al., 2018; Santos et al., 2014; Solé-Bundó et al., 2017). Este resultado es relevante debido a que un alto contenido de DQO soluble en el hidrolizado permitiría la aplicación de altas cargas orgánicas volumétricas (COV) en reactores operados en régimen semicontinuo o continuo. Generalmente, el incremento de la COV es relacionado con un mejoramiento de la velocidad de producción de metano (Zhou et al., 2017).

2.3.2. Producción de hidrógeno a partir de biomasa microalgal pretratada termoquímicamente

El hidrolizado obtenido bajo las condiciones predichas en el diseño de experimentos: temperatura 105 ° C, tiempo de reacción 1.7 h, concentración de HCl 3% p/p y biomasa 30 g ST/L fue usado para evaluar su PBH. Los resultados muestran que la producción acumulada de hidrógeno a partir del hidrolizado de microalga (258.1 NmL) estuvo cerca a la obtenida de glucosa (290 NmL), que fue usada como control positivo y, fue 1.7 veces superior a lo obtenido con biomasa cruda ([Tabla 2.4.](#) y [Fig. 2.5.](#)).

Tabla 2.4. Parámetros del modelo modificado de Gompertz estimados a partir de los ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno.

Experimento	H_{max} (NmL)	λ (h)	R_{max} (NmL/h)	Adj. R^2	Rendimiento (NmL H_2 /g VS)	pH
Glucosa	290.0 ± 7.7^a	13.0 ± 0.1^c	32.9 ± 1.5^a	1.0 ± 0.0	161.1 ± 4.3^a	4.5 ± 0.6
Microalga cruda	153.2 ± 2.2^c	9.8 ± 0.5^b	38.3 ± 8.0^a	1.0 ± 0.0	28.5 ± 0.4^c	5.6 ± 0.2
Hidrolizado de microalga	258.1 ± 24.6^b	17.4 ± 2.5^a	27.04 ± 5.1^a	1.0 ± 0.0	48.1 ± 4.6^b	5.6 ± 0.2

Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas con la prueba de múltiples rangos de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. H_{max} : Máxima producción de Hidrógeno; λ : Fase de retardo, R_{max} : Máxima velocidad de producción de hidrógeno, rendimiento de hidrógeno por gramo de microalga, y pH final. La R^2 ajustada del modelo también se muestra.

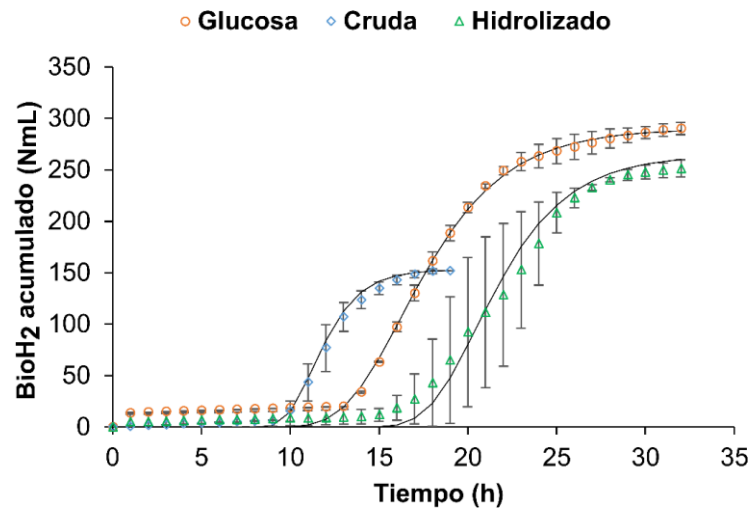


Fig. 2.5. Perfil cinético del potencial bioquímico de hidrógeno a través de fermentación oscura. Los símbolos son los valores promedio de los datos experimentales con su respectiva desviación estándar. Las líneas continuas representan los datos ajustados al modelo modificado de Gompertz.

La fase de retardo de los experimentos realizados con hidrolizado de microalgas (17.4 h) fue mayor que el de glucosa (13 h) y biomasa cruda (9.8 h). Los resultados de máxima velocidad de producción de hidrógeno a partir de los experimentos en lote de glucosa (32.9 NmL/h), microalga cruda (38.3 NmL/h) e hidrolizado de microalgas (27.0 NmL/h), no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). El rendimiento de hidrógeno a partir del hidrolizado de microalgas (49.2 NmL/g SV) fue 1.7 veces superior que el rendimiento obtenido con microalga cruda, el cual solamente alcanzó 28.5 NmL/g SV. Con respecto a los intermediarios, el acetato, butirato y lactato hicieron parte de la DQO soluble al final de los ensayos de PBH (Fig. 2.6.). En el caso del hidrolizado de microalga, el principal intermediario fue el acetato (15.2%), mientras que el lactato (7.5%) y butirato (8.2%) tuvieron una distribución similar de DQO soluble. Por el contrario, la distribución de DQO soluble en la fermentación de la microalga cruda, tuvo acetato (28.7%) y butirato (21.1%) en altos porcentajes, en cambio el lactato (7.38%) fue similar al resultado del experimento con hidrolizado. En ambos casos, entre el 36.7% y 49.5% de la DQO soluble se atribuyó a otros compuestos que no se midieron (biomasa, alcoholes, etc.).

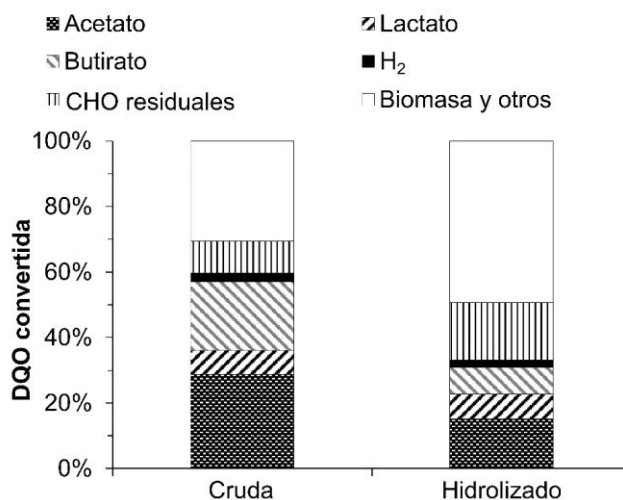


Fig. 2.6. Balance de DQO soluble al terminar los ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno a través de fermentación oscura con biomasa microalgal cruda e hidrolizado. Biomasa y otros corresponde a compuestos que no fueron medidos, como otros tipos de AGV, alcoholes o biomasa. CHO: carbohidratos.

La fermentación oscura del hidrolizado de microalga tuvo una producción de hidrógeno acumulado superior a lo obtenido con biomasa cruda y estuvo cerca de lo producido a partir de glucosa. Como era de esperarse la biomasa cruda tuvo una producción acumulada de hidrógeno menor que la del hidrolizado, esto es debido a que la biomasa cruda tenía una baja concentración de carbohidratos solubles (0.9 g/L) en comparación con el hidrolizado. Sin embargo, la biomasa cruda tuvo una fase de retardo corta en comparación con el hidrolizado, este resultado fue inesperado debido a su baja concentración de carbohidratos solubles. En general, el pretratamiento a la microalga logró el objetivo de incrementar la materia orgánica soluble, específicamente los carbohidratos. Sin embargo, como el pH del hidrolizado era ácido (< 2.0), fue necesario neutralizarlo a pH 7 antes de usarlo como sustrato. En consecuencia, después de la neutralización se formó sal (NaCl), la cual se calculó en una concentración aproximada de 15 g/L. Por lo tanto, la fase de retardo más larga en los ensayos con hidrolizado podría deberse al contenido de sal, lo cual impactó en la velocidad de producción de hidrógeno ([Tabla 2.4.](#)). Carrillo-Reyes y Buitrón (2016) también observaron un efecto similar, la fase de retardo en ensayos de fermentación oscura con microalga cruda fue menor en comparación con los ensayos de microalgas pretratadas termoquímicamente. A su vez, la fase de retardo de los ensayos con hidrolizado de microalgas (17.4 h) en el presente trabajo es similar a los reportados con biomasa de *Scenedesmus* a la cual le fueron extraídos los lípidos y fue pretratada termoquímicamente (10.5 y 12.2 h) para ser usada como sustrato en fermentación oscura (Yang et al., 2010).

El rendimiento de hidrógeno del hidrolizado de microalga resultó mayor en comparación con el de biomasa cruda, es muy probable que esto también sea debido a la baja concentración de carbohidratos solubles en la biomasa cruda. El rendimiento de hidrógeno del hidrolizado de microalga (49.2 NmL/g SV) reportado en el presente trabajo es similar a los rendimientos reportados por Carrillo-Reyes y Buitrón (2016) y Kumar et al. (2016). Sin embargo, el rendimiento de hidrógeno obtenido en el presente trabajo es superior que el obtenido con otros pretratamientos como ultrasonificación, autoclave o electrolisis ([Tabla 2.5.](#)).

Tabla 2.5. Comparación de producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura de biomasa microalgal.

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de producción de H ₂	H ₂ (mL)	Rendimiento (mL H ₂ /g SV)	Referencia
<i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Keratococcus</i> sp. ^a	1% HCl, 90 °C, 2 h	S= 10 g SV/L, I ^b = 6.7 g SV/L, pH= 6.5, 36 °C, 150 rpm		45.4	Carrillo-Reyes y Buitrón (2016)
	Ninguno			4	
	Ultrasonicación 10 w, 30 min		26.9	37	Kumar et al. (2016)
<i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. ^a	Autoclave 121 °C, 15 min, 15 psi	V _T = 80 mL, S= 8.3 g ST/L, 37 °C, 120 rpm	21.2	30	
	Electrolisis 10 V, 30 min		28.1	38	
	Ninguno		6.5	9.5	
<i>C. vulgaris</i>	Ninguno	V _T =100 mL, S= 76 g ST/L, I ^b =30%, 35 °C, 150 rpm,	~250	30.7 mL/g ST	Yun et al. (2012)
<i>S. obtusiusculus</i>	100 °C, 1.7 h, 3% HCl, 30 g ST/L	V _T : 72 mL, S= 22.18 g SV/L, I ^b = 1.85 g SV/L, pH= 7.5,	258.07	48.08	Este estudio
	Ninguno	37 °C, 120 rpm	153.16	28.53	

^aConsortio mixto; ^bCultivo mixto (pretratado).

I: Inóculo; S: Sustrato; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos Volátiles; V_T: Volumen de trabajo.

Por otro lado, los principales metabolitos solubles obtenidos a partir de la fermentación oscura del hidrolizado de microalga fueron el acetato y el butirato; estos representaron el 49.3 y 26.5%, respectivamente, del total de los AGV medidos al final de los ensayos de PBH del hidrolizado. Similarmente, el acetato y el butirato contribuyeron con el 50.2 y 36.9%, respectivamente, del total de los AGV en los ensayos con biomasa microalgal cruda. La semejanza en la producción de metabolitos en los ensayos con hidrolizado y microalga cruda sugiere que la producción de hidrógeno fue principalmente por la vía de fermentación acetato-butirato ya que ambos AGV han sido comúnmente encontrados en la fermentación de biomasa microalgal (Liu et al., 2012).

2.3.3. Producción de metano a partir del hidrolizado de microalgas

Los resultados de los ensayos de PBM son mostrados en la [Tabla 2.6.](#) y [Fig. 2.7.](#) La mayor producción acumulada de metano fue obtenida con los ensayos de hidrolizado de microalga (840.7 NmL) y biomasa cruda (662.7 NmL), mientras que la producción acumulada de metano a partir del control positivo (glucosa) fue como se esperaba (583.8 NmL). Los ensayos de PBM con hidrolizado de microalga presentaron una larga fase de retardo de 3.6 días comparado con los 1.4 días de la biomasa cruda. Una posible inhibición podría explicar la larga fase de retardo en el hidrolizado de microalga en comparación con la microalga cruda y glucosa. Passos et al. (2016) reportaron un incremento de la fase de retardo en los ensayos de PBM cuando incrementaron la concentración de HCl en el pretratamiento de la biomasa microalgal. La formación de sal después de neutralizar el hidrolizado a pH 7 es otra posible explicación de la larga fase de retardo en los ensayos con hidrolizado de microalga comparado con la biomasa cruda. Esto fue evaluado mediante un ensayo de PBM con glucosa y sal (NaCl 15 g/L), siendo la misma concentración calculada a partir del hidrolizado de microalgas después de ser neutralizado.

Tabla 2.6. Parámetros del modelo modificado de Gompertz estimados a partir de los ensayos de potencial bioquímico de metano.

Experimento	H_{\max} (NmL)	λ (d)	R_{\max} (NmL/d)	R^2 ajustada	Rendimiento (NmL CH ₄ /g SV)	pH
Glucosa	583.8 ± 16.0 ^b	0.8 ± 0.0 ^b	176.0 ± 8.7 ^a	0.99 ± 0.0	324.3 ± 8.9 ^a	7.5 ± 0.0
Microalga cruda	662.7 ± 10.1 ^{ab}	1.4 ± 0.1 ^b	108.7 ± 7.7 ^b	0.99 ± 0.0	233.6 ± 3.6 ^b	7.4 ± 0.0
Hidrolizado de microalgas	840.7 ± 135.2 ^a	3.6 ± 1.0 ^a	56.2 ± 2.5 ^c	0.97 ± 0.01	296.4 ± 47.7 ^{ab}	7.4 ± 0.0

Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas con la prueba de múltiples rangos de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

H_{\max} : Máxima producción de metano, λ : Fase de retardo, R_{\max} : Máxima velocidad de producción de metano, rendimiento de metano por gramo de microalga, y pH final. La R^2 ajustada del modelo también se muestra.

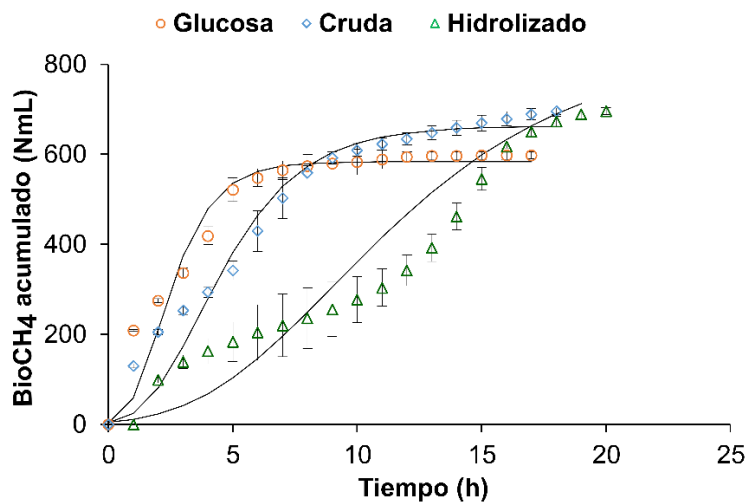


Fig. 2.7. Perfil cinético del potencial bioquímico de metano a través de la digestión anaerobia. Los símbolos son los valores promedio de los datos experimentales con su respectiva desviación estándar. Las líneas continuas representan los datos ajustados al modelo modificado de Gompertz.

En dicho experimento se observó que la producción de metano disminuyó $32.3 \pm 4.5\%$, en comparación con el control positivo de glucosa, sugiriendo que altas concentraciones de sal causan una larga fase de retardo en los ensayos de PBM. Se ha reportado que la metanogénesis puede ser inhibida con concentraciones de $\text{NaCl} \geq 5 \text{ g/L}$. A su vez, la sal también puede afectar la etapa de acidogénesis a concentraciones de $\text{NaCl} \geq 20 \text{ g/L}$ (Wang et al., 2017).

La máxima velocidad de producción de metano a partir de la biomasa cruda (108.7 NmL/ día) fue inesperadamente alta en comparación con el hidrolizado de microalgas (56.2 NmL/día). Es probable que la concentración de sal en el hidrolizado haya afectado su velocidad de producción de metano. Sin embargo, como se muestra en la [Tabla 2.6](#), no hubo diferencias estadísticas significativas entre el rendimiento de metano obtenido con hidrolizado de microalga (296.4 NmL/g SV) y biomasa cruda (233.6 NmL/g SV). A pesar de que el pretratamiento incrementó la solubilización de DQO en el hidrolizado, el rendimiento de metano obtenido con biomasa cruda estuvo cerca de alcanzar el rendimiento del hidrolizado (no hubo diferencias estadísticas, $p < 0.05$). Este resultado fue inesperado, debido a que la biomasa microalgal cruda tenía una baja concentración de carbohidratos solubles (0.5 g/L) y DQO soluble (2.3 g/L) en comparación con el hidrolizado. Sin embargo, el rendimiento de metano a partir de microalga cruda en el presente trabajo es similar a lo que han reportado otros autores tal como se muestra en la [Tabla 2.7](#). Solé Bundó et al. (2017) y Wieczorek et al. (2014) obtuvieron rendimientos de metano similares a partir de un consorcio de microalgas y biomasa de *Chlorella*, respectivamente (ambas biomasas no recibieron pretratamiento). Otros autores también han observado este efecto, en algunos casos la biomasa microalgal no pretratada puede producir rendimientos de metano similares o incluso un poco mayor a los de biomasa microalgal pretratada, como con pretratamiento alcalino usando CaO (Solé-Bundó et al., 2017). Del mismo modo, Martín Juárez et al. (2018) reportaron una disminución del rendimiento de metano cuando la biomasa fue sometida a algunos pretratamientos (ultrasonido, ácido y álcali) en comparación con microalga no pretratada.

Tabla 2.7. Comparación de producción de metano a partir de la digestión anaerobia de biomasa microalgal.

Microalga	Condiciones del pretratamiento	Condiciones de producción de CH ₄	Rendimiento (mL CH ₄ /g VS)	Referencia
<i>S. obtusiusculus</i>	98 °C, 6 h	V _T = 80 mL, S= 1.3 g SV/L, I= 2 g SV/L, pH= 7, 37 °C, 180 rpm	193 ó 251 mL/L	Cortés-Carmona et al. (2018)
	Ninguno		109 ó 142 mL/L	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mezcla de Onozuka R-10 y Macerozyme R-10	S= 10 g SV/L, 35 °C	414	Wieczorek et al. (2014)
	Ninguno		245	
<i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. ^a	72 °C + 10% CaO	V _T = 100 mL, S= 4 g SV/L, I= 4 g SV/L, 35 °C	325	Solé-Bundó et al. (2017)
	Ninguno		260	
<i>Stigeoclonium</i> sp. y <i>Monoraphidium</i> sp. ^a	95 °C, 10 h	V _T = 100 mL, S= 5.7 g ST/L, I= 14.6 g ST/L, 35 °C	181	Passos et al. (2015)
	Ninguno		106	
<i>S. obtusiusculus</i>	100 °C, 1.7 h, 3% HCl, 30 g ST/L	V _T = 360 mL, S= 7.85 g SV/L, I= 3.9 g SV/L, 37 °C, 120 rpm	296 ó 2326 mL/L	Este estudio
	Ninguno		234 ó 1834 mL/L	

^aConsortio mixto

I: Inóculo, S: Sustrato, ST: Sólidos totales, SV: Sólidos Volátiles, V_T: Volumen de trabajo.

Estos estudios y el presente trabajo sugieren que puede haber una relación entre la severidad del pretratamiento y la disminución del rendimiento de metano. La severidad del pretratamiento también puede implicar la adición de un agente neutralizante del pH, en nuestro caso fue una base, lo que promovió una inhibición por salinidad como se discutió previamente.

El consumo de carbohidratos solubles y DQO soluble en los ensayos con biomasa cruda fue de $67 \pm 2.54\%$ y $33.7 \pm 13.5\%$, respectivamente (Fig. 2.8). Estos resultados fueron más bajos cuando se compara con el consumo de carbohidratos solubles y DQO soluble de los ensayos con el hidrolizado de microalgas, $88.6 \pm 0.44\%$ y $37.5 \pm 4.8\%$, respectivamente. En ambos ensayos, los carbohidratos solubles fueron consumidos en un mayor porcentaje comparado con el consumo de DQO soluble, indicando que la producción de metano se debió principalmente a la degradación de carbohidratos como fuente orgánica de sustrato.

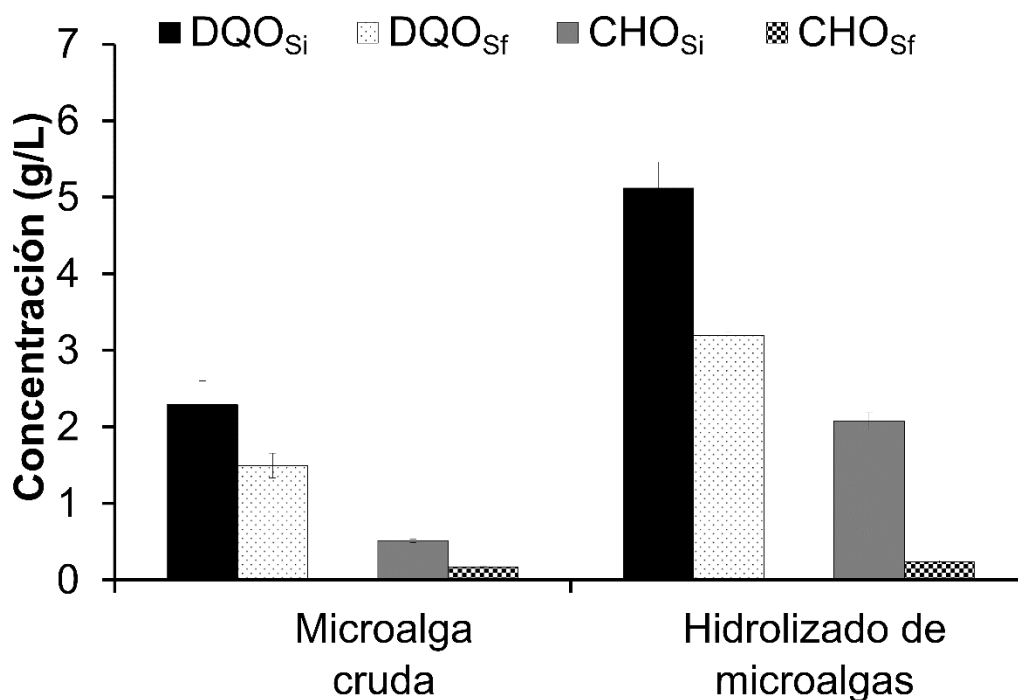


Fig. 2.8. Concentraciones de carbohidratos solubles (CHO_S) y DQO soluble (DQO_S) de los ensayos de potencial bioquímico de metano. Subíndices i y f se refieren al tiempo inicial y final, respectivamente.

Al final de los ensayos de PBM se midieron los ácidos grasos volátiles. Sin embargo, solamente en los ensayos con hidrolizado de microalgas fueron detectados lactato y butirato en bajas concentraciones, 95.3 ± 23.6 y 83.9 ± 4.6 mg/L, respectivamente. Tales concentraciones y la ausencia de AGV en los ensayos con microalga cruda sugieren que los microorganismos metanogénicos consumieron estos productos intermediarios de las rutas metabólicas

2.4. Conclusiones

El pretratamiento termoquímico de *S. obtusiusculus* dio como resultado una alta eficiencia de solubilización de carbohidratos, cercana al 100%. De igual forma, la DQO (60%) solubilizada con este pretratamiento es una de las más altas en comparación con otros pretratamientos. La alta concentración de carbohidratos solubles en el hidrolizado de microalga incrementó los rendimientos de hidrógeno y metano en comparación con la microalga cruda. En consecuencia, estos resultados demuestran que el pretratamiento termoquímico a condiciones no tan severas, es adecuado para pretratar biomasa microalgal de *S. obtusiusculus* y obtener un sustrato con características deseables para la fermentación oscura y la digestión anaerobia.

Capítulo 3. Experimento de producción continua de hidrógeno a partir de biomasa microalgal

3.1. Introducción

La producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura es uno de los procesos para producir energía renovable que en un futuro cercano promete jugar un papel importante en la economía energética (Singh et al., 2017). Además, ofrece como ventaja la capacidad de una producción en continuo a partir de diversas biomásas, como residuos agroindustriales, residuos lignocelulósicos y microalgas. La producción de hidrógeno mediante fermentación oscura de biomasa microalgal solamente se ha realizado en experimentos en lote, siendo los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella* los más usados para éste propósito (Xia et al., 2015a). Los rendimientos de hidrógeno a partir de dichos experimentos están en un intervalo entre 7–168 mL/g SV, ésta amplia variación es debido a varios factores, como las características intrínsecas de la microalga, el tipo de biomasa usada (húmeda, seca), la aplicación de pretratamiento(s) o no (biomasa cruda), fermentación junto con otro(s) sustrato(s), el tipo y características del inóculo (p.ej. cepa pura, consorcio mixto, aclimatación), así como las condiciones de operacionales de la fermentación oscura (p.ej. temperatura, pH). En este trabajo se usó biomasa microalgal de *S. obtusiusculus*, a la cual se le aplicó un pretratamiento térmico (140 °C por 2.7 h) como método de disrupción con base a un trabajo previo en el cual se duplicó la digestibilidad de *S. obtusiusculus* en comparación con la biomasa microalgal no pretratada (Cortés-Carmona et al., 2018). El principal objetivo de este trabajo fue emplear dos estrategias para estudiar la producción de hidrógeno en un reactor de tanque agitado continuo: el pretratamiento térmico de la biomasa microalgal y la activación del inóculo con suero de leche. Además, se estudió el efecto del incremento de la carga orgánica volumétrica (COV) del hidrolizado de microalga sobre la producción de hidrógeno.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Biomasa microalgal e inóculo

La biomasa microalgal de *S. obtusiusculus* se secó, molió, y tamizó de acuerdo a lo descrito en la [Sección 2.2.1](#). El suero de leche en polvo usado en la activación del inóculo fue comprado a la empresa Darigold (USA), el cual tenía un contenido \geq 75% de lactosa. El inóculo usado para la producción de hidrógeno fue lodo anaerobio granular obtenido de un reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho de lodos a escala industrial que trata vinazas de tequila proporcionado por Casa Herradura (Jalisco, México). Antes de la inoculación, el lodo fue tratado térmicamente a 105 °C durante 24 h, para eliminar microorganismos consumidores de hidrógeno. Las características de los sustratos y el inóculo se muestran en la [Tabla 3.1](#).

Tabla 3.1. Características del inóculo, suero de leche, biomasa cruda e hidrolizado de microalga.

Parámetro	Inóculo ^a	Suero de leche ^a	Microalga cruda ^a
ST (%)	98.3 \pm 0.3	96.9 \pm 0.4	94.1 \pm 0.4
SV (%)	88.6 \pm 0.4	89.1 \pm 0.4	79.9 \pm 0.7
DQO _T (g/L)	-	1.7 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2
DQO _S (g/L)	-	1.5 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
CHO (g/L)	-	0.6 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
sCHO (g/L)	-	0.6 \pm 0.0	ND

^aLas determinaciones fueron hechas a partir de 1 g ST/L.

CHO: Carbohidratos; DQO: Demanda química de oxígeno; ND: No detectado; ES: Eficiencia de solubilización; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos volátiles; subíndices S y T se refieren a soluble y total, respectivamente.

3.2.2. Pretratamiento de la biomasa microalgal

En el Capítulo 3 se decidió usar un pretratamiento térmico ya que se observó en el Capítulo 2 que la presencia de sal (NaCl) debida a la neutralización del hidrolizado de microalga obtenido mediante pretratamiento termoquímico podría afectar la

fermentación oscura. Con el fin de evitar éste inconveniente se usó un pretratamiento térmico para biomasa microalgal, el cual fue reportado en nuestro grupo de trabajo (Cortés-Carmona et al., 2018). Concentraciones de biomasa microalgal de 2.3 y 7.8 g sólidos totales (ST)/L fueron pretratadas térmicamente en botellas Schott-Duran® a 140 °C durante 2.7 h. Las eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO se determinaron de acuerdo a la [Sección 2.2.7.](#)

3.2.3. Configuración experimental

Un reactor de tanque agitado continuo con un volumen de trabajo de 1 L se inoculó con 4.5 g SV/L y se aforó con una mezcla de suero de leche (21.1 g DQO_S/L), medio mineral y solución buffer (Palomo-Briones et al., 2017). Posteriormente, el reactor se selló herméticamente y el espacio de cabeza se purgó con una mezcla de N₂/CO₂ (80/20%). El reactor se controló a las siguientes condiciones: 300 rpm, 37 °C y pH 5.9, y se operó en lote durante las primeras 24 h. Con el fin de tener un inóculo activo, el reactor se alimentó en continuo con suero de leche durante 7 días con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 6 h. Posteriormente, se evaluó la producción de hidrógeno a partir de hidrolizado de microalga con un TRH de 1 d y con dos diferentes COV ([Tabla 3.2.](#)). Durante la operación del reactor se tomaron muestras diarias de 5 mL del líquido del reactor para determinar el consumo de DQO y carbohidratos, así como también la producción de ácidos grasos volátiles (AGV).

3.2.4. Métodos analíticos

Los ST, SV, DQO (total y soluble) de la biomasa cruda, hidrolizado, suero de leche e inóculo fueron determinados de acuerdo a métodos estándar (APHA, 1999). El contenido total de carbohidratos de la biomasa microalgal fue determinado de acuerdo a Toledo-Cervantes et al. (2018), mientras que los carbohidratos solubles de la biomasa microalgal, hidrolizado, suero de leche e inóculo fueron determinados usando un método colorimétrico (DuBois et al., 1956). Las concentraciones de AGVs fueron determinadas mediante electroforesis capilar de acuerdo a lo descrito por Cortés-Carmona et al. (2018).

El volumen de gas producido en el reactor fue medido usando un flujómetro de gas basado en el desplazamiento del líquido. La composición del gas (H₂, CH₄, y CO₂) se cuantificó diariamente tomando una muestra del gas usando una jeringa Pressure-Lok ® de 0.5 mL y se analizó en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica, el cual fue calibrado con gases de H₂, CH₄, y CO₂ de alta pureza, de acuerdo a lo descrito por Cortés-Carmona et al. (2018).

Tabla 3.2. Condiciones operacionales durante la producción de hidrógeno en régimen continuo.

Parámetro	Etapa		
	I	II	III
Sustrato (g ST/L)	Suero de leche 14.2	Hidrolizado de microalgas 2.3	7.8
Tiempo de operación (d)	7	3	4
TRH (d)	0.25	1	1
COV (g DQO _s /L-d)	84.4 ± 10.64	0.54 ± 0.02	1.65 ± 0.07
COV de CHO _s (g/L-d)	54.42 ± 1.98	0.08 ± 0.00	0.17 ± 0.01

CHO: Carbohidratos; COV: Carga orgánica volumétrica; DQO: Demanda química de oxígeno; TRH: Tiempo de residencia hidráulico; el subíndice S denota soluble.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Solubilización de materia orgánica

La biomasa microalgal fue pretratada a partir de 2.3 y 7.8 g ST/L (equivalente a 3 y 10 g DQO_T/L), con base a un trabajo previo en el cual se solubilizó el 29 y 22% de DQO, respectivamente (Cortés-Carmona et al., 2018). Aunque las eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO disminuyen al incrementar la concentración de microalgas en el pretratamiento, en el presente trabajo se incrementó la concentración de biomasa microalgal con el fin de aumentar la COV para la producción de hidrógeno (discutido en la sección desempeño del reactor). Las eficiencias de solubilización de carbohidratos y DQO obtenidas a partir del hidrolizado de microalgas se pueden observar en la [Tabla 3.3](#). El incremento de la

concentración inicial de biomasa microalgal usada en el pretratamiento afectó tanto la eficiencia de solubilización de carbohidratos como la de DQO. Dicho incremento tiene un efecto en la relación sólido/líquido, ya que una mayor cantidad de sólidos puede crear agregados o grumos que afectan la transferencia de calor durante el pretratamiento. Este mismo efecto se reportó en otros estudios que pretrataron biomasa microalgal del género *Scenedesmus* (González-Fernández et al., 2012b; Miranda et al., 2012). La eficiencia de solubilización de carbohidratos alcanzada en el presente trabajo fue 1.5 veces superior a lo obtenido en un estudio previo en nuestro grupo de trabajo a partir de la microalga *S. obtusiusculus* (2.3 g/L), la cual también fue pretratada térmicamente (98 °C por 6 h) (Cortés-Carmona et al., 2018). Este incremento puede atribuirse a que en el presente trabajo el pretratamiento térmico fue más severo (140 °C por 2.7 h) comparado con el usado por Cortés-Carmona et al. (2018).

Tabla 3.3. Características del hidrolizado de microalga y eficiencias de solubilización del pretratamiento térmico.

Parámetro	Hidrolizado de microalga	
	(2.3 g/L) ^a	(7.8 g/L) ^a
DQO _T (g/L)	3	10
DQO _S (g/L)	0.8 ± 0.0	2.5 ± 0.2
CHO (g/L)	0.4	1.3
sCHO (g/L)	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Eficiencia de solubilización de DQO (%)	8.1 ± 1.1	6.7 ± 1.2
Eficiencia de solubilización de CHO (%)	28.5 ± 0.5	19.4 ± 1.4

^aConcentración inicial de biomasa microalgal en peso seco.

CHO: Carbohidratos; DQO: Demanda química de oxígeno; Subíndice S denota soluble.

Por otra parte, la composición de la pared celular de las microalgas puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y la etapa de crecimiento en la cual son cosechadas (Córdova et al., 2018; Dong et al., 2016); la recalcitrancia de la microalga dependerá de la composición de su pared celular. El pretratamiento

térmico de biomasa microalgal usando las condiciones del presente trabajo resultó en porcentajes de solubilización de carbohidratos superiores a los obtenidos con otro tipo de pretratamiento como ultrasonificación (5%), electrólisis (7%) y autoclavado (10%) (Kumar et al., 2016).

3.3.2. Desempeño del reactor

En la Etapa I de operación del reactor con suero de leche, el consumo de carbohidratos solubles fue superior a 80% y la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) promedio fue de $11,171 \pm 986$ mL/L-d. Estos resultados indican que las bacterias fermentativas estaban activas, cumpliendo el objetivo de la primera etapa ([Fig. 3.1.](#)). Similarmente, Palomo-Briones et al. (2018) reportó una VVPH de 13,700 mL/L-d usando suero de leche como sustrato y condiciones similares (TRH de 0.25 d y una COV de 88 g DQO/L-d) a las del presente trabajo. Posteriormente, en la Etapa II se usó como sustrato hidrolizado de microalga a una COV de 0.54 g DQO_s/L-d. Esta COV fue lograda a partir de alimentar el reactor con el hidrolizado de microalga sin diluir. Sin embargo, dicha COV fue baja en comparación con la Etapa I. La Etapa II duró tres días y la producción de hidrógeno fue nula, posiblemente debido a la baja concentración de carbohidratos solubles en el hidrolizado de microalgas (0.08 g/L-d). Por tal razón, se decidió incrementar la COV en la Etapa III, esto se logró aumentando la concentración de biomasa microalgal en el pretratamiento. En la Etapa III el hidrolizado de microalgas también se alimentó sin diluir y la COV alcanzada fue de 1.65 g DQO_s/L-d, con el fin de proveer una mayor cantidad de carbohidratos solubles (0.17 g/L-d) a los microorganismos en el reactor. Al igual que en la Etapa II, la producción de hidrógeno en la Etapa III tampoco se detectó, sugiriendo que el incremento de la COV no fue suficiente. Vale la pena resaltar que la Etapa I tuvo una alta disponibilidad de carbohidratos solubles (54.4 g/L-d), mientras que las Etapas II y III tuvieron una disminución de 680 y 320 veces, respectivamente. Debido al cambio tan drástico en la COV se presume que la comunidad microbiana presente en el reactor se vio afectada y por tal motivo disminuyó el consumo de carbohidratos solubles en las etapas alimentadas con hidrolizado de microalga.

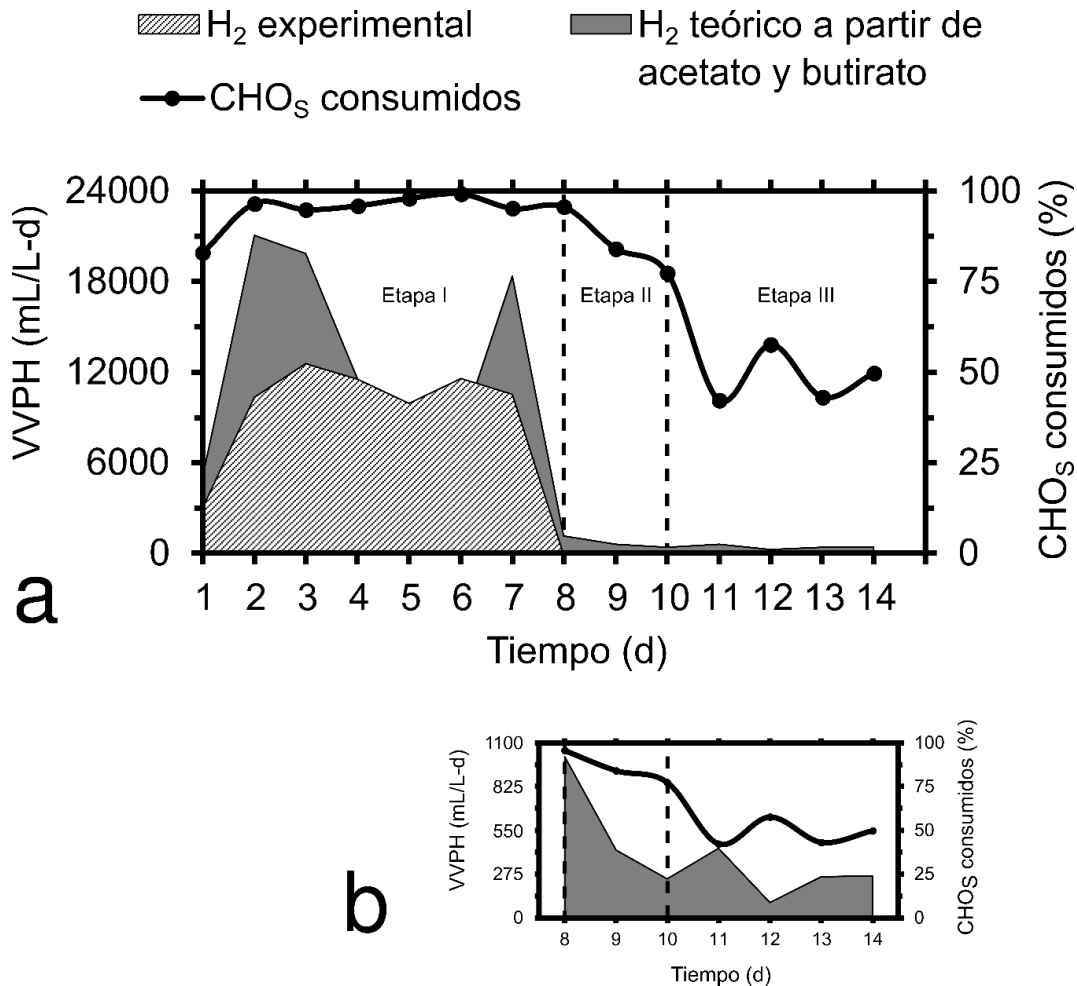


Fig. 3.1. **a)** Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y consumo de carbohidratos solubles (CHO_s) durante la operación del reactor; **b)** acercamiento de la región de tiempo del día 8 al 14. Líneas punteadas indican el cambio de etapa.

Aunque la producción de hidrógeno fue nula en las Etapas II y III, sí se pudieron detectar los metabolitos involucrados en las rutas metabólicas de producción de hidrógeno (acetato y butirato), aunque en bajas concentraciones ([Fig. 3.2.](#)). La presencia de butirato y acetato está correlacionada con la producción de hidrógeno; teóricamente una alta relación de butirato/acetato (1-2) conduce a un alto rendimiento de hidrógeno (Lee y Rittmann, 2009). De acuerdo con la concentración de butirato y acetato, la producción teórica de hidrógeno en las Etapas II y III debió haber estado en un intervalo entre 90 a 1100 mL/L-d ([Fig. 3.1 b](#)). Sin embargo, la producción de hidrógeno puede estar sobrestimada, ya que es probable que la

producción de acetato no sea debida solamente al metabolismo de bacterias hidrogenogénicas, sino que también al de bacterias homoacetogénicas (consumidoras de H_2). Durante la operación del reactor, fue notable que durante la Etapa I, los microorganismos mostraron una mayor actividad y ésta fue disminuyendo progresivamente en las Etapas II y III, siguiendo la misma tendencia del consumo de carbohidratos solubles ([Fig. 3.1.](#)).

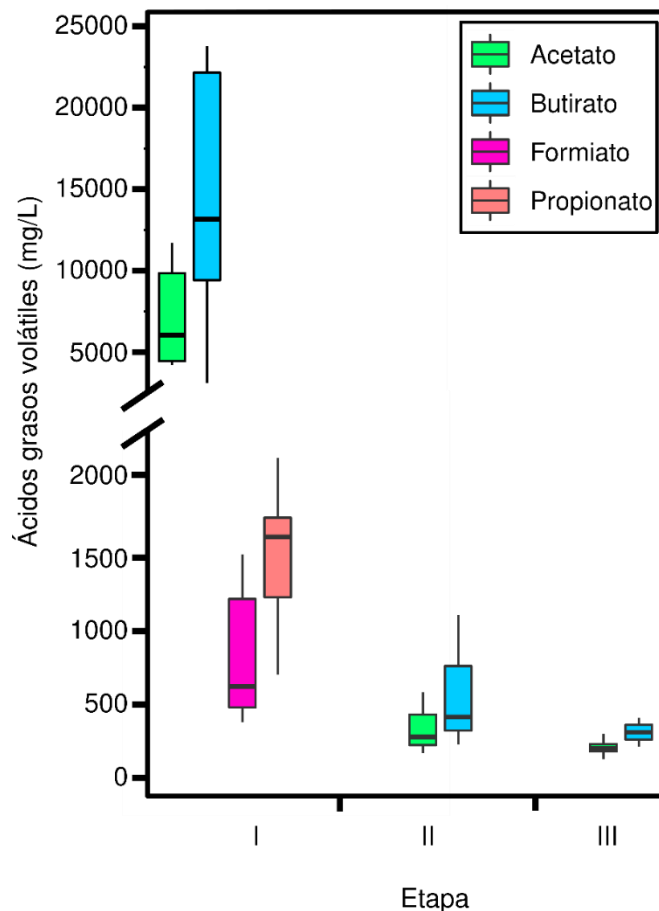


Fig. 3.2. Diagrama de cajas mostrando los ácidos grasos volátiles producidos durante las etapas de operación del reactor. La caja representa el 50% de los valores, la línea horizontal dentro de las cajas es la mediana y las líneas verticales (bigotes) representan el 25% de los valores menores y 25% de los valores mayores.

Estos resultados sugieren que la alimentación de suero de leche en el reactor seleccionó una comunidad microbiana predispuesta a un sustrato de fácil degradación, por lo que dicha comunidad microbiana no pudo consumir el

hidrolizado de microalga cuando este sustrato se alimentó al reactor. Dicho esto, es posible que se hayan requerido TRH más largos en las etapas que se alimentó hidrolizado de microalga, puesto que ello hubiera permitido generar una comunidad microbiana capaz de consumir eficientemente el hidrolizado de microalga. Palomo-Briones et al. (2017) demostró que las comunidades microbianas involucradas en la fermentación oscura varían dependiendo del TRH en reactores de tanque agitado continuo. Aunado a esto, se sugiere que bajas COVs de hidrolizado de microalga no son adecuadas para la producción de hidrógeno en sistemas continuos. Similar a estos resultados, González-Fernández et al. (2013) estudiaron la producción de metano mediante digestión anaerobia de biomasa de *Scenedesmus* sp. pretratada térmicamente, aplicando bajas COVs (1.5–2.5 g DQO/L-d); concluyendo que este tipo de biomasa no es adecuada para la producción de biocombustibles gaseosos debido a su baja biodegradabilidad como consecuencia de una pared celular recalcitrante. Sin embargo, los autores también argumentaron que dicha desventaja podría superarse mediante un pretratamiento efectivo con mínimos requerimientos de calor y energía. Por lo tanto, es primordial encontrar un pretratamiento con las características anteriormente mencionadas, así como evaluar diferentes COVs (p.ej. superiores a las evaluadas en este estudio) con el fin de vislumbrar la factibilidad de la producción de hidrógeno en régimen continuo a partir de biomasa microalgal. Esto es relevante ya que, de acuerdo a nuestro conocimiento, hasta la fecha no hay ningún estudio de producción de hidrógeno en régimen continuo usando biomasa microalgal como sustrato.

Por lo anterior, es claro que, si se quisiera operar un reactor productor de hidrógeno alimentado con hidrolizado de microalga a una COV de carbohidratos similar a la de la Etapa I, es necesario alcanzar eficiencias de solubilización más altas. Por ejemplo, suponiendo que en este trabajo se hubiera logrado 100% de eficiencia de solubilización de carbohidratos, se hubiera necesitado 272 g microalga/L (operando a un TRH de 1 d) para lograr la COV de carbohidratos de la Etapa I. Lograr una eficiencia de solubilización de 100% con esa concentración de sólidos parece poco probable; además de que es factible de que el hidrolizado contendría una alta

cantidad de nitrógeno amoniacal y compuestos inhibitorios, como furanos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Los compuestos furánicos, como el furfural y el 5-hidroximetilfurfural se generan a partir de la deshidratación de pentosas y hexosas, respectivamente (Rasmussen et al., 2014). En la [Fig. 3.3](#) se puede observar algunas de las vías por las cuales se pueden generar algunos compuestos inhibitorios, los cuales afectarían a los microorganismos hidrogenogénicos en la fermentación oscura.

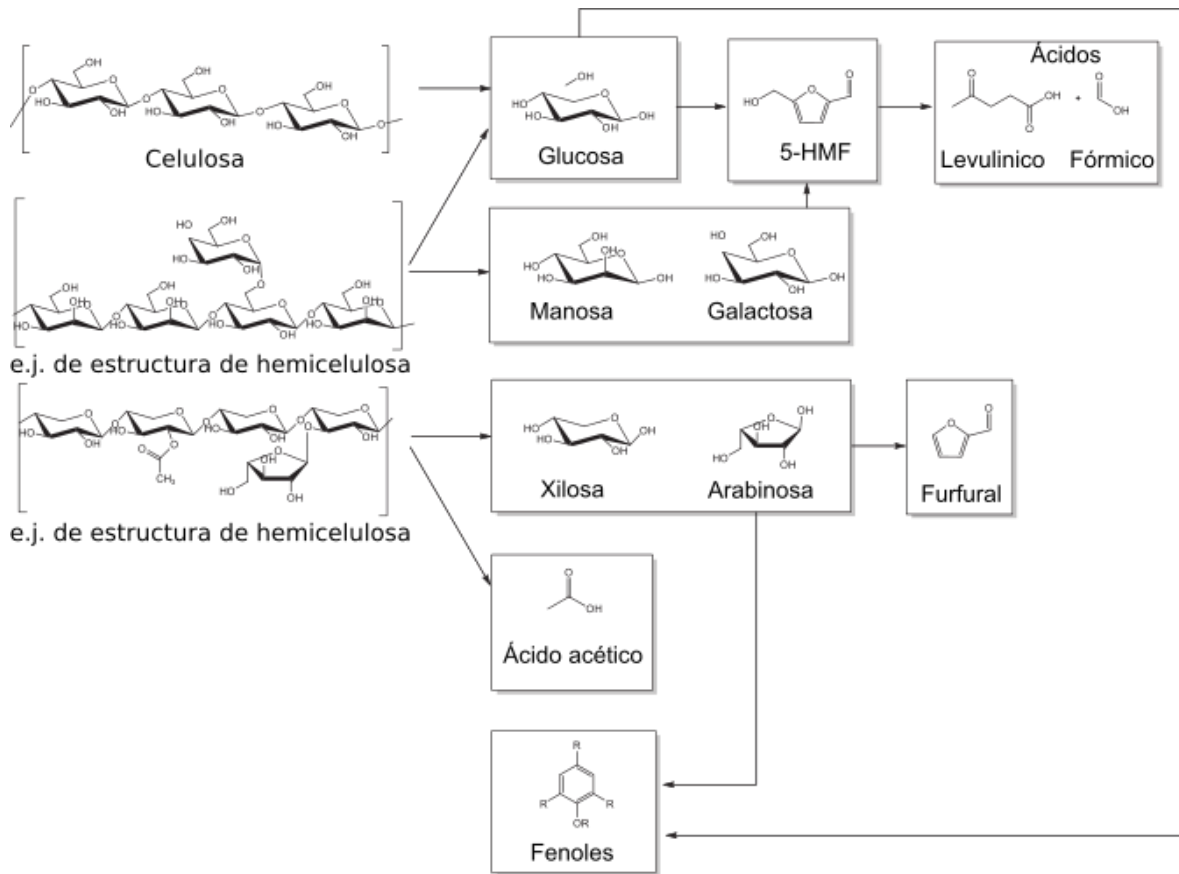


Fig. 3.3. Esquema de vías de transformación de celulosa y hemicelulosa en compuestos inhibitorios para los microorganismos involucrados en la fermentación oscura y digestión anaerobia. Modificado de Rasmussen et al., (2014).

Actualmente hay otras líneas de investigación diferentes a las estudiadas en éste trabajo que podrían resolver los problemas anteriormente discutidos. Por ejemplo, el uso de ingeniería genética y metabólica para el incremento de carbohidratos (o lípidos), así como también para obtener microalgas con una pared celular menos recalcitrante (Salas-Montantes et al., 2018; Yap et al., 2016). Esto es relevante ya

que, a partir de una microalga con mayor contenido de carbohidratos y con una pared celular menos recalcitrante, se podrían aplicar pretratamientos menos severos, alcanzar mayores eficiencias de solubilización y, por lo tanto, COVs similares a las aplicadas en reactores productores de hidrógeno con alta eficiencia (Palomo-Briones et al., 2018).

3.4. Conclusiones

La biomasa microalgal fue sometida a pretratamiento térmico con el fin de solubilizar carbohidratos y utilizarlos en la producción de hidrógeno. La eficiencia de solubilización de la hidrólisis térmica de biomasa microalgal fue afectada por la concentración inicial de microalga: 7.8 g ST/L en el pretratamiento térmico hizo que las eficiencias de solubilización de DQO y carbohidratos disminuyeran 17.3 y 31.9%, respectivamente, en comparación con la concentración inicial de 2.3 g ST/L. La Etapa I de operación del reactor demostró que el suero de leche aportó los carbohidratos necesarios para una producción de hidrógeno eficiente. Sin embargo, esta etapa tuvo una alta carga orgánica volumétrica (84.4 g DQO_s/L-d) comparada con las posteriores etapas en las que se usó hidrolizado de microalga como sustrato, con lo cual la producción de hidrógeno no pudo cuantificarse. Por lo tanto, en futuras investigaciones se debe evaluar la producción de H₂ a partir de hidrolizado de microalga usando COVs más altas que las evaluadas en el presente trabajo.

Capítulo 4. Estrategias para mejorar el contenido y producción de metano a partir de la digestión anaerobia de biomasa microalgal

Resumen

En este trabajo se evaluó la producción de metano (CH_4) a partir de la monodigestión de hidrolizado de microalga y codigestión con suero de leche en un reactor anaerobio discontinuo secuencial. El reactor fue alimentado con 5 g DQO_T/L desde la Etapa I hasta la IX y operado a pH alcalino y neutro. Posteriormente en las Etapas X, XI y XII se evaluó un incremento gradual de la carga orgánica a pH neutro. Los resultados del reactor muestran que el contenido de CH_4 en el biogás estuvo cerca del 90 y 50% a pH alcalino y neutro, respectivamente. El rendimiento de CH_4 a partir de la codigestión a 5 g DQO_T/L fue de aproximadamente 230 NmL/g DQO_T en ambos pH, siendo 1.8 veces superior que el rendimiento obtenido a partir de la monodigestión. El incremento de la carga orgánica no produjo un mejoramiento en el rendimiento de CH_4 . Sin embargo, en las Etapas X y XI se alcanzaron picos de velocidades de producción de CH_4 cercanas a 1000 NmL/L-d , mientras que en las etapas con una baja carga orgánica estuvo alrededor de 200-800 mL/L-d . Por otro lado, en ensayos por lote se analizó la producción de CH_4 a partir de la fracción particulada del hidrolizado de microalga, y su codigestión con suero de leche. Los resultados demostraron que los sólidos del hidrolizado de microalga son hidrolizados y consumidos para producir CH_4 . Aunque su codigestión con suero de leche no condujo a un mejoramiento del rendimiento de CH_4 , su fase lag fue 1.9 veces más corta que la de monodigestión. Este estudio revela que la digestión anaerobia de biomasa microalgal puede operarse a cortos tiempos de residencia hidráulico siempre y cuando se realice en codigestión con un sustrato rico en carbono.

Palabras clave: Producción de metano, hidrolizado de microalga, pretratamiento termoquímico, codigestión, biocombustibles

4.1. Introducción

La digestión anaerobia de biomasa microalgal como única fuente de sustrato tiene algunos inconvenientes, entre los cuales están: baja relación C/N (i.e. entre 5-10) y poseer una pared celular recalcitrante; éstas características perjudican la producción de CH₄ (Calicioglu y Demirer 2016; Rétfalvi et al., 2016). Sin embargo, estos problemas podrían ser superados mediante la aplicación de pretratamientos que rompan la célula y la codigestión con sustratos ricos en carbono (Mendez et al., 2013; Solé-Bundó et al., 2019). Por otra parte, el biogás producido mediante la digestión anaerobia no puede ser inyectado de manera directa en la red de gas natural debido a su bajo contenido de CH₄, el cual está entre 35–65% (Awe et al., 2017). Sin embargo, Nolla-Ardèvol et al. (2015) demostró que la digestión anaerobia de biomasa microalgal a condiciones de pH alcalino produce un alto contenido de CH₄ (ca. 90%) en el biogás. En consecuencia, un enfoque incluyendo esas condiciones podría conducir al mejoramiento del contenido de CH₄ en el biogás producido a partir de la digestión anaerobia de biomasa microalgal. El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes estrategias para mejorar la producción y el contenido de CH₄ en el biogás generado por la digestión anaerobia de biomasa microalgal en un reactor anaerobio discontinuo secuencial, incluyendo la codigestión con suero de leche para mejorar la producción de CH₄, así como la monodigestión y codigestión a pH alcalino para enriquecer el contenido de CH₄ en el biogás.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Sustratos e inóculo anaerobio

Como sustratos fueron usados biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus* y suero de leche en polvo. La biomasa microalgal de *S. obtusiusculus* se secó, molió, y tamizó de acuerdo a lo descrito en la [Sección 2.2.1](#). Por otra parte, el suero de leche contenía 63% de lactosa y fue adquirido con proveedor nacional (DIFER S.A de C.V. Jalisco, México). El inóculo usado para los ensayos de producción de CH₄ (lodo granular), se obtuvo de un reactor anaerobio a escala industrial que trata vinazas de tequila, el cual fue amablemente donado por Casa Herradura (Jalisco,

México). La [Tabla 4.1.](#) muestra las características de los sustratos y el inóculo. La biomasa microalgal fue pretratada termoquímicamente de acuerdo a Rincón-Pérez et al. (2020) con el fin de obtener un hidrolizado de microalga rico en carbohidratos solubles. Se eligió aplicar dicho pretratamiento, puesto que en el Capítulo 3 se observó que las concentraciones de carbohidratos y DQO soluble en el hidrolizado de microalga obtenido mediante pretratamiento térmico no fueron suficientes para soportar la producción de H₂. Sin embargo, el hidrolizado de microalga obtenido mediante pretratamiento termoquímico contiene sal (NaCl), por lo que el inóculo tuvo una fase de aclimatación ([Sección 4.2.2.](#)) con el fin de evitar posibles inhibiciones por salinidad, y además, tener una comunidad microbiana capaz de consumir eficientemente el hidrolizado.

Tabla 4.1. Características de la biomasa microalgal no pretratada, suero de leche, y lodo anaerobio granular.

	Microalga cruda	Suero de leche	Lodo granular
ST (%)	96.49 ± 0.13	96.97 ± 0.41	15.36 ± 0.07
SV (%)	84.34 ± 0.42	88.95 ± 0.49	13.84 ± 0.06
DQO (g/g ST)	1.57 ± 0.39	1.08 ± 0.06	
DQO _s (g/g ST)	0.14 ± 0.01	1.03 ± 0.03	
CHO (g/g TS)	0.17 ± 0.01		
CHO _s (g/g ST)	0.04 ± 0.00		

Promedio ± desviación estándar. CHO: Carbohidratos; DQO: Demanda química de oxígeno; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos volátiles. Subíndice S denota soluble.

4.2.2. Reactor anaerobio discontinuo secuencial

Para la producción semicontinua de CH₄, se usó un reactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 1 L que fue inoculado con 10 g sólidos volátiles (SV)/L de lodo anaerobio granular, se alimentó con 4 g DQO_T/L de suero de leche y se suplementó con medio mineral (Angelidaki et al., 2009). Posteriormente, el reactor fue sellado herméticamente y purgado con N₂ por 10 min. Subsecuentemente la temperatura y agitación del líquido en el reactor se controlaron a 37 °C y 120 rpm,

respectivamente. Los primeros 19 días de operación del reactor fueron una fase de aclimatación del inóculo al hidrolizado de microalga y condiciones de pH alcalino. La fase de aclimatación inicialmente se alimentó con 100% de suero de leche (4 g DQO_T/L) y posteriormente se alimentó 5 g DQO_T/L, cambiando progresivamente la composición del sustrato en la alimentación a 25:75, 50:50 y 75:25% (base DQO_T) de hidrolizado de microalga y suero de leche, respectivamente.

Una vez terminada la fase de aclimatación, se evaluaron doce etapas que incluían tanto la monodigestión de la microalga (100% hidrolizado de microalga) como la codigestión (mezcla de 75% hidrolizado de microalga y 25% suero de leche, con base en la DQO_T). Además, en las Etapas I–V se evaluó la digestión anaerobia en condiciones de pH 9.0, mientras que las Etapas VI–XII fueron operadas a pH 7.5 con el fin de comparar la producción de CH₄ a ambos pH ([Tabla 4.2.](#)).

Tabla 4.2. Descripción de las etapas evaluadas durante la operación del reactor.

Etapa (días de operación)	Hidrolizado de microalga (%)	Suero de leche (%)	Alimentación (g τ COD/L)	pH _{inicial}
I (1-8)	100	0	5	9
II (9-22)	75	25	5	9
III (23-39)	75	25	5	9
IV (40-53)	75	25	5	9
V (54-74)	100	0	5	9
VI (75-84)	75	25	5	7.5
VII (85-90)	100	0	5	7.5
VIII (91-94)	75	25	5	7.5
IX (95-97)	75	25	5	7.5
X (98-100)	75	25	7.5	7.5
XI (101-103)	75	25	10	7.5
XII (104-108)	75	25	12.5	7.5

Una desaceleración de la velocidad de producción de CH_4 del 80% con respecto a la máxima registrada en cada etapa fue el parámetro para el cambio en la alimentación. Este parámetro fue elegido debido al hecho de que, aunque el tiempo de residencia hidráulico (TRH) es generalmente usado como parámetro para cambiar de etapa en un reactor discontinuo secuencial, usar el mismo TRH para la degradación del sustrato durante la monodigestión o codigestión podría ser un parámetro no adecuado. El ciclo de alimentación del reactor fue el siguiente: la agitación fue detenida por 30 min, 500 mL del sobrenadante fueron extraídos, se repusieron 500 mL de líquido (sustrato y medio) de acuerdo a la [Tabla 4.2.](#), y por último la agitación fue reiniciada nuevamente ([Fig. 4.1](#)). Se tomaron muestras al inicio y al final de cada etapa de operación del reactor y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análisis.

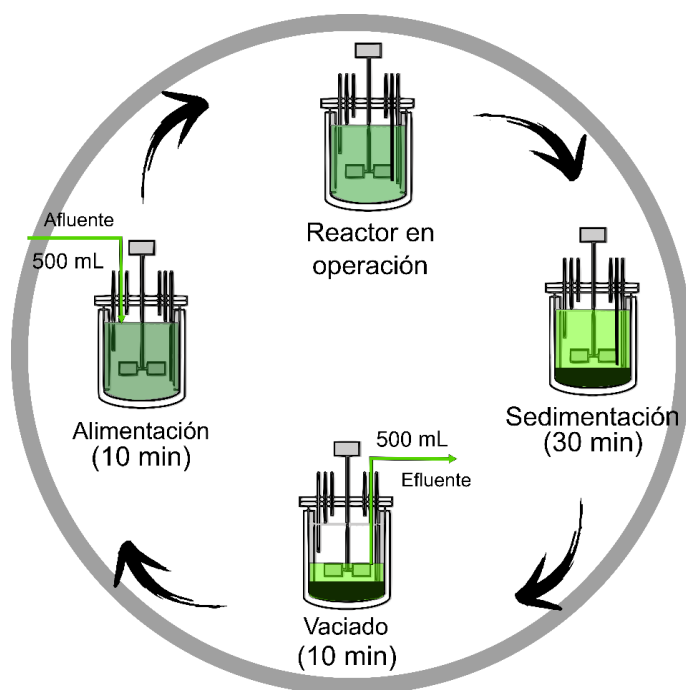


Fig. 4.1. Ciclo de alimentación del reactor anaerobio discontinuo secuencial.

4.2.3. Experimentos en lote

Con el fin de elucidar el consumo y producción de metano a partir de la fracción particulada del hidrolizado de microalga, así como en la codigestión con suero de leche, se realizaron una serie de experimentos en lote de acuerdo a la [Fig. 4.2.](#)

Brevemente, los ensayos en lote fueron llevados a cabo en botellas serológicas de 120 mL, la temperatura y agitación fueron controladas a 37 °C y 120 rpm, respectivamente. Se tomaron muestras al inicio y al final de cada ensayo, las cuales fueron almacenadas a -20 °C para posteriores análisis. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado a excepción del control endógeno que fue por duplicado.

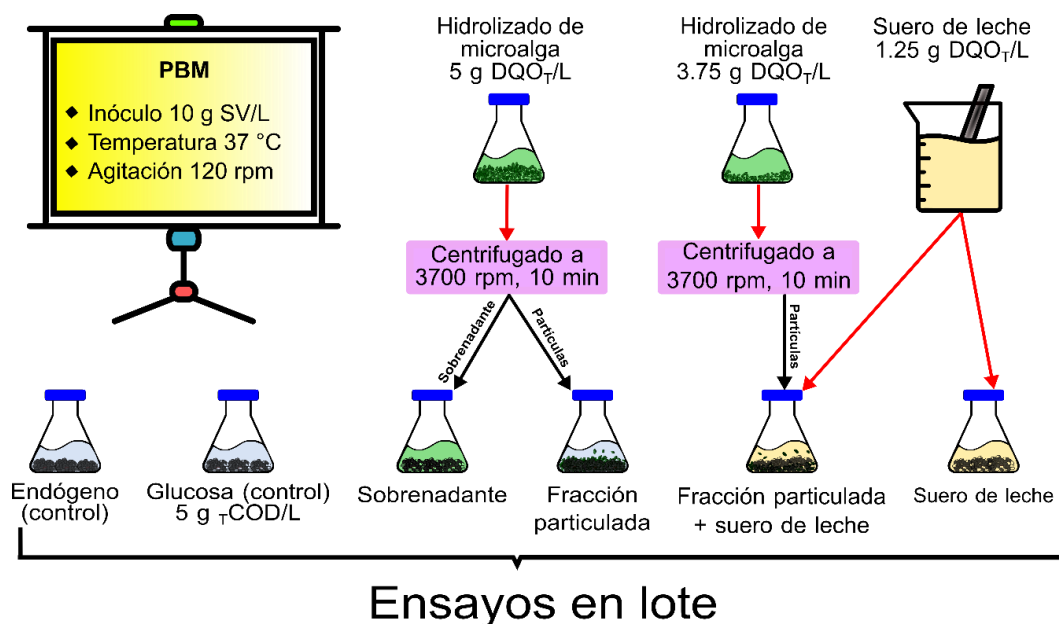


Fig. 4.2. Representación esquemática de los ensayos de potencial bioquímico de metano (PBM).

4.2.4. Modelo cinético

Los datos experimentales de la producción de metano fueron ajustados al modelo logístico ([Ecuación 4.1.](#)) para determinar los parámetros cinéticos (Zwietering et al., 1990).

$$M = P / (1 + \exp((4 * R_{max} * (\lambda - t)) / P + 2)) \quad (4.1.)$$

Donde M (mL/L) es la producción acumulada de metano, P (mL/L) es el máximo volumen de metano producido, R_{max} (mL/L-d) es la máxima velocidad de producción de metano y λ (días) es la fase lag antes de la producción exponencial de metano.

4.2.5. Métodos analíticos

Los sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), DQO (total y soluble), caracterización del contenido de carbohidratos de *S. obtusiusculus*, y carbohidratos del hidrolizado de microalga fueron determinados de acuerdo a la [Sección 2.2.5](#). Además, al final de cada etapa de operación del reactor, así como al finalizar los ensayos en lote, se determinaron los ácidos grasos volátiles (AGV) de acuerdo a Montiel Corona y Razo-Flores (2017). El nitrógeno amoniacal también se determinó, usando el kit Hach Test 'N Tube™ (AmVer™ High Range Ammonia Reagent Set, Method 10031, Hach Corporation).

La producción y composición del biogás fue medida diariamente de acuerdo a la [Sección 2.2.5](#). Condiciones estándar de temperatura (0 °C) y presión (1 atm) fueron usadas para reportar el volumen de CH₄ producido.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Fase de aclimatación del inóculo

El reactor tuvo un periodo de 22 días de aclimatación del inóculo a pH alcalino, de los cuales 19 días se incrementó gradualmente la concentración de hidrolizado de microalga en la mezcla de alimentación ([Fig. 4.3.a](#)). La fase de aclimatación presentó eficiencias de remoción de DQO_T de 65 a 77% ([Fig. 4.3.b](#)) y el contenido de CH₄ en el biogás fue de 92 ± 7%. Durante esta fase se observó que el volumen acumulado de CH₄ incrementó con el reemplazo gradual de suero de leche por hidrolizado de microalga. Estos resultados indican que el inóculo logró adaptarse hasta una relación de 75:25% (base DQO_T) de hidrolizado de microalga y suero de leche, respectivamente. Varios autores han indicado que la aclimatación del inóculo es una estrategia recomendada para mejorar la digestibilidad de las microalgas. Tal aclimatación ha sido enfocada en la adaptación del inóculo a condiciones ya sea de altos niveles de amonio (Tian et al., 2018) o de salinidad (Mottet et al., 2014). Durante la fase de aclimatación, la concentración más alta de amonio registrada fue de 0.6 g/L. Esta concentración es similar a la obtenida en etapas posteriores ([Tabla 4.3.](#)). Por otro lado, aunque la salinidad no se midió; se sabe que la concentración

de sal aumentó en la alimentación, puesto que el hidrolizado de microalga contenía NaCl debido a la neutralización de su pH después de ser pretratado, por lo que conforme se incrementaba la proporción de hidrolizado de microalga en la alimentación se aumentaba la concentración de sal. A pesar de esto, la producción de CH₄ en la fase de aclimatación no se vio afectada por amonio o salinidad. Lo cual sugiere que la fase de aclimatación logró que el inóculo se adaptará a las posibles condiciones adversas (amonio, salinidad, recalcitrancia) que generaba el hidrolizado de microalga.

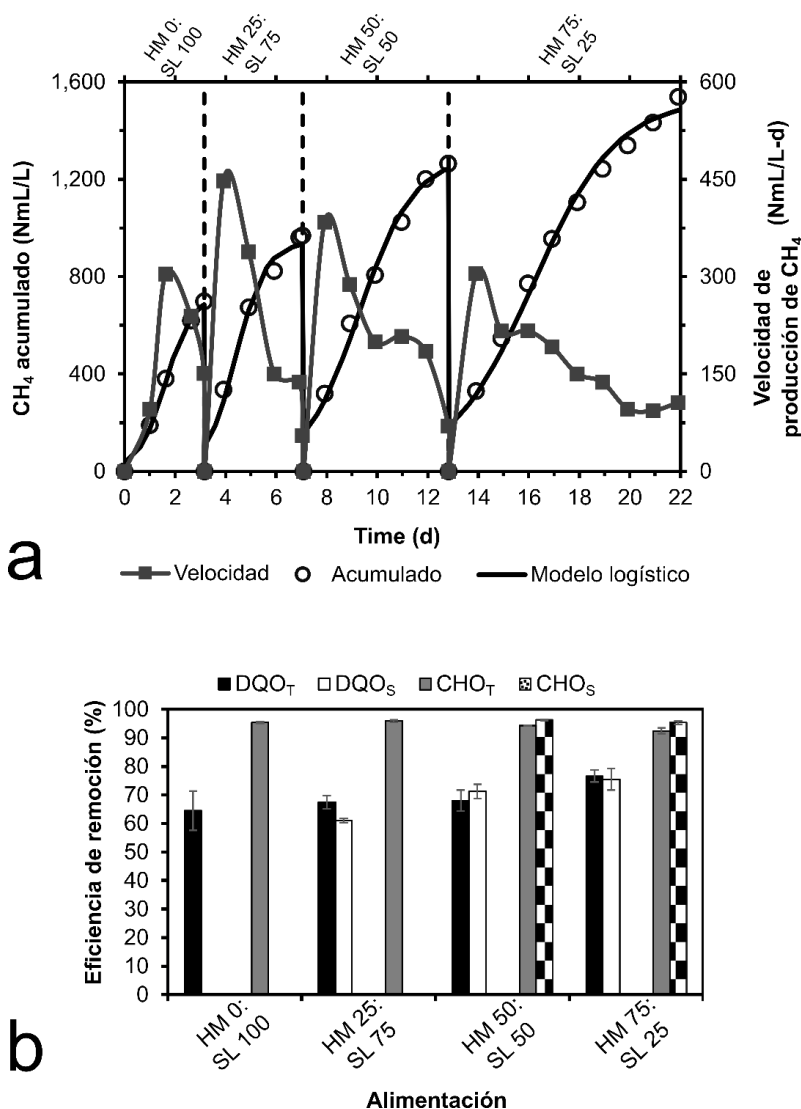


Fig. 4.3. Desempeño de la fase de aclimatación del inóculo en el reactor; **a)** producción de CH₄ y **b)** eficiencia de remoción de materia orgánica. CHO: Carbohidratos; DQO: Demanda química de oxígeno; HM: Hidrolizado de microalga; SL: Suero de leche. Subíndices S y T denotan soluble y total, respectivamente.

Tabla 4.3. Principales parámetros de la monodigestión y codigestión anaerobia en el reactor secuencial discontinuo.

Etapa	Efluente pH	Contenido de CH ₄ (%)	Rendimiento de CH ₄ (NmL/g DQO _T)	Remoción de DQO _T (%)	Remoción de DQO _S (%)	Remoción de CHO (%)	Remoción de CHO _S (%)	Efluente N-NH ₃ (g/L)
I	8.6	85.6 ± 8.3	126.4	52.4 ± 8.7	39.6 ± 8.8	66.6 ± 3.2	83.5 ± 0.9	0.5 ± 0.0
II – IV	8.8 ± 0.1	89.8 ± 7.5	233 ± 48	34.2 ± 31.2	69.8 ± 16.0	85.4 ± 0.8	96.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1
V	8.5	73.9 ± 15.3	91.5	59.1 ± 5.3	40.2 ± 13.5	39.5 ± 5.2	92.9 ± 0.7	0.6 ± 0.0
VII	7.4	66.2 ± 1.6	88.4	47.8 ± 2.9	56.5 ± 5.2	49.9 ± 1.8	77.7 ± 0.6	0.8 ± 0.0
VI, VIII y IX	7.4 ± 0.1	63.4 ± 7.8	226.0 ± 29.0	62.7 ± 6.0	77.4 ± 1.0	93.6 ± 0.7	98.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1
X ^a	7.4	59.9 ± 8.4	200.6	74.4 ± 2.0	87.7 ± 1.4	95.4 ± 0.2	98.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1
XI ^b	7.5	57.0 ± 7.9	165.2	24.3 ± 2.6	62.9 ± 8.6	79.3 ± 1.4	96.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2
XII ^c	7.7	59.6 ± 10.5	99.4	31.0 ± 4.4	58.4 ± 1.1	96.6 ± 0.4	98.9 ± 0.0	1.6 ± 0.1

La carga orgánica fue ^a 7.5, ^b 10 y ^c 12.5 g DQO_T/L, en el resto de las etapas la COV fue de 5 g DQO_T/L; CHO: Carbohidratos; DQO: Demanda química de oxígeno; Subíndice S y T denotan soluble y total, respectivamente.

4.3.2. Monodigestión y codigestión del hidrolizado de microalga

En el presente trabajo la biomasa microalgal se pretrató termoquímicamente con el fin de acelerar su biodegradabilidad. El rendimiento de CH₄ más alto logrado cuando el hidrolizado de microalga fue la única fuente de sustrato (monodigestión) fue de 126 NmL/g DQO_T. Sin embargo, cuando el hidrolizado de microalga (75%) fue codigerido con suero de leche (25%), a la misma concentración inicial de DQO que la monodigestión (5 g DQO_T/L) el rendimiento de CH₄ estuvo en un intervalo de 226 a 233 NmL/g DQO_T ([Tabla 4.3.](#)). El suero de leche ayudó a incrementar el rendimiento de metano 1.8 veces en comparación con la monodigestión del hidrolizado de microalga. En años recientes, la codigestión de biomasa microalgal con diferentes sustratos (p.ej. lodos y residuos agroindustriales) ha ganado atención como estrategia para mejorar el rendimiento de CH₄ (Solé-Bundó et al., 2018). Carminati et al. (2018) y Cea-Barcia et al. (2018) realizaron estudios de codigestión de un consorcio de biomasa microalgal con bacterias, logrando un mejoramiento del rendimiento de CH₄ de 81 a 216 mL/g DQO y de 144 a 230 mL/g DQO con suero de leche desproteinizado y residuos de papaya, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el CH₄ es producido principalmente a partir de carbohidratos solubles, presentando un consumo global de 93.6 ± 6.7%, mientras que el consumo global de DQO soluble fue de 65.5 ± 16.3% ([Tabla 4.3.](#)). En la literatura se pueden encontrar resultados similares, donde sustratos ricos en carbohidratos son recomendados para la codigestión de biomasa microalgal (Xia et al., 2015b).

4.3.3. Efecto del pH sobre la producción de metano

El contenido de CH₄ resultante de la monodigestión y codigestión a pH alcalino estuvo en un intervalo de 70-90%, mientras que a pH neutro estuvo cerca de 50%. Estos resultados demuestran que la digestión anaerobia a pH alcalino puede ser una opción para obtener un biogás rico en CH₄, lo cual permitiría integrarlo en la red de gas natural. Similarmente, Nolla-Ardèvol et al. (2015) reportaron un promedio de 83% de CH₄ en el biogás a partir de la digestión anaerobia de *Spirulina* a

condiciones alcalinas. Con respecto al volumen acumulado y rendimiento de CH_4 , ambos parámetros fueron similares a condiciones de pH alcalino y neutro (Fig. 4.4. y Tabla 4.3.). Sin embargo, la velocidad de producción de CH_4 a pH neutro fue más rápida que a pH alcalino; consecuentemente el TRH de las etapas a pH neutro fue más corto. Por otro lado, se observó que en la codigestión de hidrolizado de microalga (75%) y suero de leche (25%) los parámetros cinéticos λ y R_{max} tuvieron una mayor variabilidad a pH neutro que a pH alcalino (Fig. 4.5.). Esta variabilidad puede deberse al abrupto cambio de pH 9 a pH 7.5, lo cual pudo haber causado una alteración en las comunidades microbianas. En la Fig. 4.4.b se puede observar que la primera etapa a pH neutro (Etapa VI) tuvo una baja R_{max} y un largo TRH en comparación con las subsecuentes Etapas VIII y IX. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que compara la producción de CH_4 a pH alcalino y neutro, usando hidrolizado de biomasa microalgal.

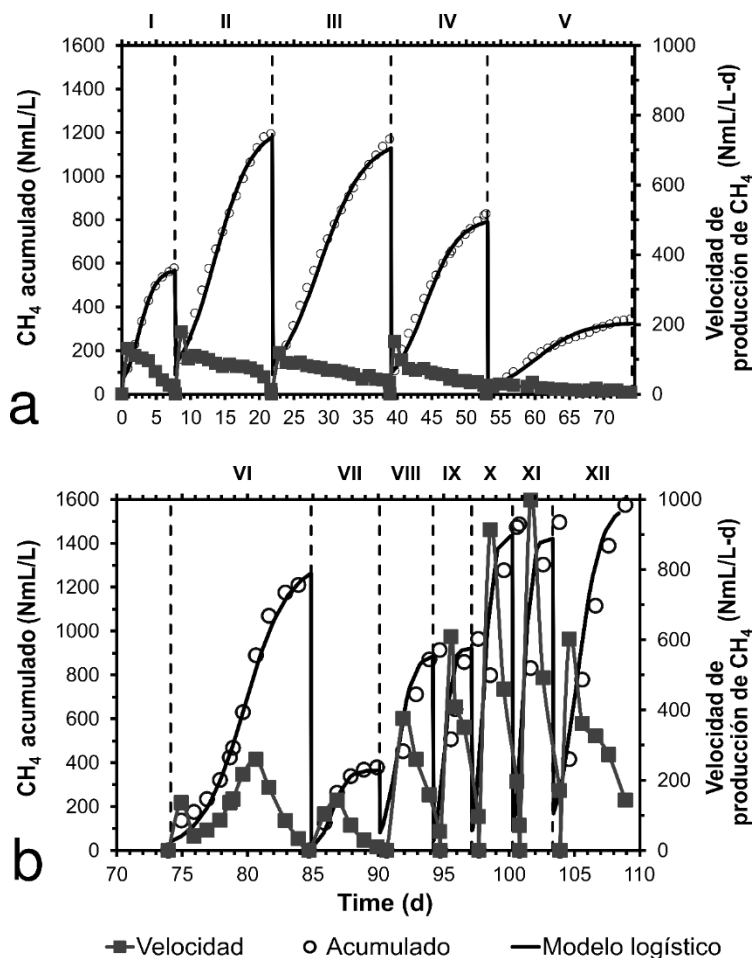


Fig. 4.4. Evolución del volumen acumulado y velocidad de producción de CH_4 durante la operación del reactor discontinuo secuencial a) pH alcalino y b) pH neutro con incremento de la carga orgánica en la alimentación de 7.5, 10 y 12.5 g DQO_T/L para las Etapas X, XI y XII, respectivamente.

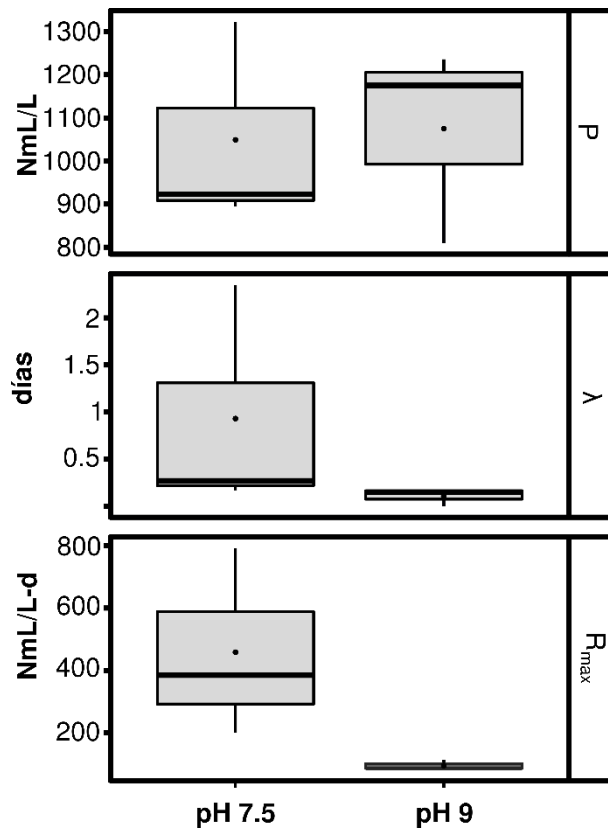


Fig. 4.5. Comparación de los parámetros cinéticos de la operación del reactor a condiciones de pH alcalino y neutro.

4.3.4. Efecto del incremento de la carga orgánica

Después de la Etapa IX se evaluó el incremento gradual de la carga orgánica en la alimentación con el fin de determinar la máxima carga posible. Por lo tanto, las Etapas X, XI y XII fueron alimentadas con 7.5, 10 y 12.5 g DQO_T/L, respectivamente. El incremento de la carga orgánica volumétrica en la digestión anaerobia en un reactor en continuo está relacionado con el mejoramiento del rendimiento de biogás (Comino et al., 2010; Sun et al., 2017). Sin embargo, este concepto debe ser tomado con cuidado debido a que un incremento fuera del rango apropiado en la COV puede conducir a una disminución del rendimiento del biogás y a una falla del proceso (Comino et al., 2010; Sun et al., 2017). Las etapas que tuvieron un incremento de la carga orgánica (Etapas X-XII) produjeron un volumen acumulado de CH₄ similar, cerca de 1500 NmL/L. Este resultado es superior a lo obtenido con las etapas

operadas a una carga de 5 g DQO_T/L tanto a condiciones de pH alcalino (1064 ± 205 NmL/L) como de pH neutro (1031 ± 162 NmL/L).

Con respecto a la velocidad de producción de CH₄, ésta fue similar en las Etapas X y XI las cuales alcanzaron picos máximos de ~1300 NmL/L-d, mientras que la Etapa XII solamente alcanzó un pico máximo de 602 NmL/L-d. Vale la pena resaltar que la velocidad de producción de CH₄ fue notoriamente mayor en las Etapas X y XI siendo el promedio de estas dos etapas 2.6 veces superior que el promedio de las etapas de codigestión operadas a pH neutro. En las últimas tres etapas los carbohidratos solubles y estructurales de la biomasa microalgal fueron consumidos de manera eficiente. La DQO soluble fue consumida entre 58-88%, mientras que el consumo de DQO particulada estuvo entre 24-74%. El menor consumo de DQO particulada se observó en las etapas con una alta carga orgánica (XI y XII, [Tabla 4.3.](#)), sugiriendo que la producción de CH₄ se debió principalmente al consumo de carbohidratos.

Por otro lado, los rendimientos de CH₄ en las Etapas X-XII fueron menores en comparación con los de las etapas que tuvieron una carga orgánica de 5 g DQO_T/L. Una disminución en el rendimiento de CH₄ puede atribuirse a una sobrecarga de sustrato, lo que resultó en una ineficaz metanización del sustrato adicional. Nolla-Ardèvol et al. (2015) reportaron una disminución en la producción de CH₄ causada por una sobrecarga de sustrato a partir de una COV de 0.5 a 1 g DQO/L-d en la digestión anaerobia de biomasa microalgal a pH alcalino. La sobrecarga de sustrato causa un desequilibrio en la relación sustrato-inóculo, donde una excesiva cantidad de sustrato conduce a que los microorganismos sean incapaces de llevar a cabo la digestión anaerobia. Similarmente, Polizzi et al. (2018) concluyeron que un incremento en la carga orgánica puede conducir a un incremento de los sólidos totales en el reactor, lo cual causa una falla del sistema. Por otro lado, los AGV presentaron bajas concentraciones durante toda la operación del reactor y apenas contribuyeron en el balance de DQO ([Fig. 4.6.](#)). Esto indica que los microorganismos metanógenos estaban activos y no sufrieron inhibición por los AGV.

En resumen, el incremento de la carga orgánica no fue una buena estrategia para mejorar el rendimiento de CH₄. Sin embargo, un incremento en la carga orgánica puede ser una buena estrategia en el caso de requerir altas velocidades de producción de CH₄.

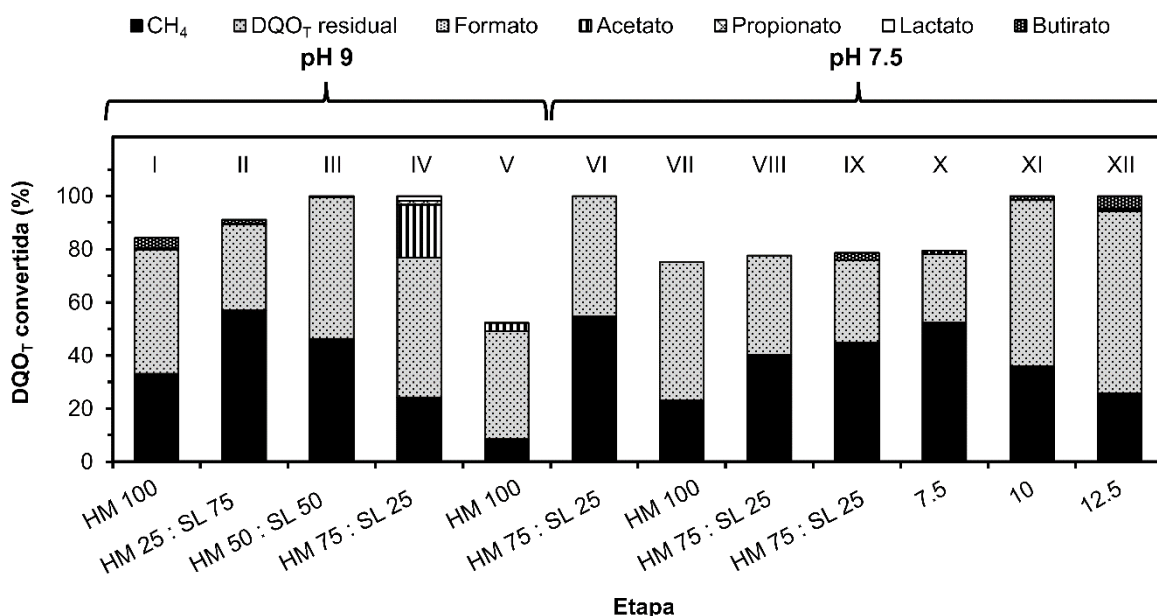


Fig. 4.6. Balance de DQO_T de cada una de las etapas evaluadas en el reactor discontinuo secuencial. HM: hidrolizado de microalga, SL: suero de leche.

4.3.5. Ensayos en lote de producción de metano

A partir de la digestión anaerobia de la fracción particulada del hidrolizado de microalga se esperaba obtener un volumen acumulado de CH₄ de 749 NmL/L, sin embargo, experimentalmente se obtuvo 313.6 NmL/L. El ensayo de producción de CH₄ a partir de la fracción particulada del hidrolizado de microalga demuestra que el inóculo fue capaz de consumir este sustrato recalcitrante. Aunque se observó una fase lag de 5.6 días en este ensayo, la cual fue 2.1 veces más larga que los 2.7 días de la digestión anaerobia del ensayo donde se usó solamente el sobrenadante del hidrolizado de microalga ([Fig. 4.2](#); [Tabla 4.4.](#)).

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos obtenidos de los experimentos en lote para evaluar la producción de CH₄ a partir de la fracción particulada del hidrolizado de microalga.

Ensayo	Teórico P^a (NmL/L)	P (NmL/L)	λ (d)	R_{max} (NmL/L-d)	pH ^b	Rendimiento de CH ₄ (NmL/g DQO _T)
SL + HM _{part}	1295	747.4	2.9	53.4	6.3 ± 0.0	159.7
SL	690	634.0	1.6	47.3	6.3 ± 0.0	217.4
HM _{sobr}	1029	460.1	2.7	45.5	6.6 ± 0.0	91.8
HM _{part}	749	313.6	5.6	60.1	6.7 ± 0.0	62.6

^aVolumen acumulado de CH₄ teórico a partir de la DQO_T inicial alimentada; ^bpH final de los experimentos. SL: Suero de leche; HM_{part}: Fracción particulada del hidrolizado de microalga; HM_{sobr}: Sobrenadante del hidrolizado de microalga.

Por otro lado, 947.6 NmL/L es el volumen acumulado de CH₄ teórico esperado a partir del efecto sinérgico de la codigestión de la fracción particulada de hidrolizado de microalga y suero de leche. Este valor resulta de la suma de los volúmenes acumulados de CH₄ (valor experimental) individuales de los ensayos de cada sustrato (Fracción particulada del hidrolizado de microalga y suero de leche). Sin embargo, experimentalmente se obtuvo 747.4 NmL/L a partir del ensayo de codigestión de la fracción particulada de hidrolizado de microalga y suero de leche. Suponiendo una completa metanización del suero de leche, este pudo haber aportado hasta 92% del volumen acumulado de CH₄ en el ensayo de codigestión con la fracción particulada de hidrolizado de microalga. Por lo tanto, se sugiere que la codigestión de la fracción particulada del hidrolizado de microalga con suero de leche no tuvo un efecto sinérgico sobre el volumen acumulado de CH₄. Sin embargo, sí tuvo un efecto sobre la fase lag, siendo ésta 1.9 veces menor que la del ensayo de la fracción particulada de hidrolizado de microalga como única fuente de sustrato. Con respecto a la distribución de la DQO, no se detectaron AGV en ninguno de los ensayos. La eficiencia de remoción de materia orgánica en estos ensayos fue similar a la obtenida en el reactor, donde la tendencia fue un consumo de casi 100% de los carbohidratos solubles ([Fig. 4.7.](#)).

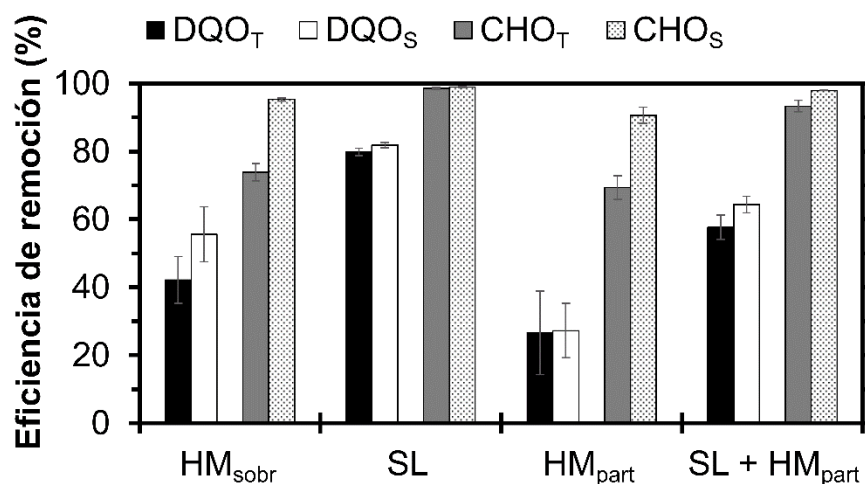


Fig. 4.7. Eficiencia de remoción de materia orgánica en los experimentos en lote. HM: Hidrolizado de microalga; SL: Suero de leche. Los subíndices part y sobr denotan fracción particulada y sobrenadante, respectivamente.

4.4. Conclusiones

La digestión anaerobia llevada a cabo en el reactor discontinuo secuencial a condiciones de pH alcalino enriqueció el contenido de CH₄ en el biogás. La producción de CH₄ mejoró cuando el hidrolizado de microalga fue codigerido con suero de leche. Los tiempos de residencia hidráulica fueron menores cuando la codigestión se llevó a cabo a pH 7.5 en lugar de pH 9.0. El incremento de la carga orgánica en la alimentación no contribuyó en mejorar el rendimiento de CH₄; sin embargo, cuando se aumentó la carga a 7.5 y 10 g DQO_T/L la velocidad de producción de CH₄ mejoró con respecto a las etapas que tuvieron una menor carga orgánica. Los experimentos en lote demostraron que el CH₄ puede ser producido a partir de la fracción particulada del hidrolizado de microalga. La codigestión de la fracción particulada del hidrolizado de microalga con suero de leche no tuvo un efecto sinérgico sobre la producción de CH₄, aunque sí lo tuvo sobre la fase lag.

Capítulo 5. Consideraciones para la producción de biocombustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal: Conclusiones y perspectivas

5.1. Discusión general y conclusiones

La producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal es un tema clave, ya que podría reforzar el potencial de desarrollo económico y ambiental de los biocombustibles mediante un esquema de biorrefinería ([Fig. 5.1.](#)). Actualmente, existen diferentes líneas de investigación sobre la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal ([Tabla 5.1.](#)). Sin embargo, varias investigaciones sugieren que la biomasa microalgal debe ser usada en un esquema de biorrefinería para que sea competitiva con los combustibles fósiles (Chandra et al., 2019; Koutra et al., 2020; Kumar et al., 2020). Adicionalmente es de vital importancia optimizar cada uno de los procesos involucrados en la biorrefinería para sacar el máximo provecho de cada uno de los productos obtenidos. Por lo tanto, en el proceso de producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal, es crucial establecer las condiciones a las cuales se pueden potenciar los rendimientos y velocidades de producción de los biocombustibles.

En esta tesis, la microalga *S. obtusiusculus* se usó como sustrato debido a que a partir de este género de microalga se han producido diferentes combustibles: biocrudo (Bordoloi et al., 2016), bioetanol (Chng et al., 2017), biodiesel (Mandal y Mallick, 2009), hidrógeno (Ortigueira et al., 2015) y metano (Tartakovsky et al., 2013). La pared celular del género *Scenedesmus* está compuesta principalmente por polisacáridos (p.ej. celulosa, almidón, pectina, agar), monosacáridos (p.ej. glucosa, galactosa, manosa), así como también pueden estar presentes otros compuestos tales como lípidos, proteínas (p.ej. glicoproteínas) y otros polímeros (Allard y Templier, 2001; Takeda, 1996). Cabe resaltar que la composición de la pared celular puede variar dependiendo de la especie de microalga y sus condiciones de crecimiento (Córdova et al., 2018).

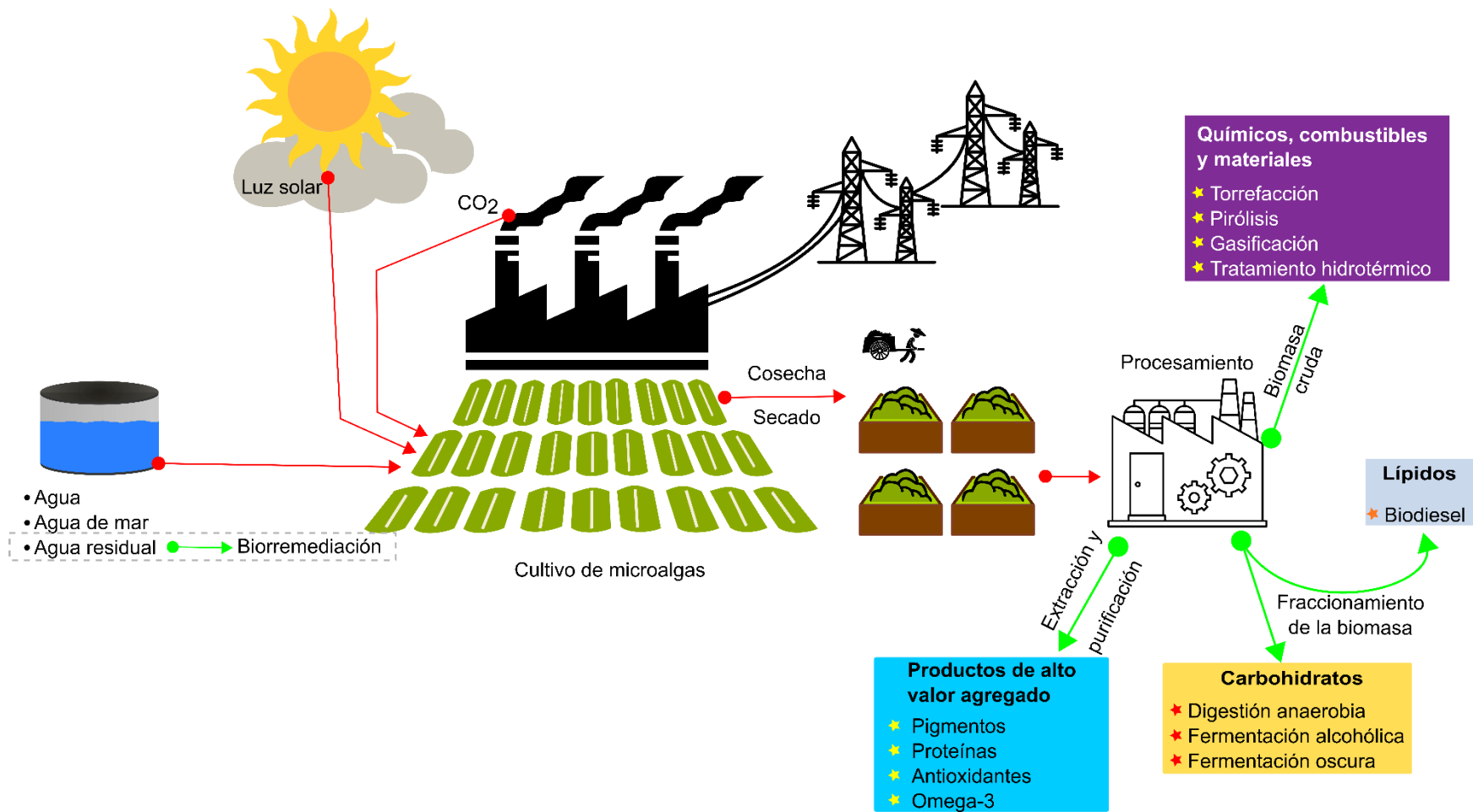


Fig. 5.1. Esquema de biorrefinería de microalgas.

Tabla 5.1. Comparación de algunos procesos para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas.

Enfoque del estudio	Principales conclusiones	Perspectivas	Referencia
Diseño de un modelo basado en un sistema de información geográfico para optimizar la cadena de suministro de biocombustibles derivados de microalgas	El modelo consiste de tres etapas: diseño de la biorrefinería de microalgas, selección de las ubicaciones y optimización matemática. Los escenarios estudiados dan como resultado precios de biocombustibles muy altos, los cuales no son competitivos con combustibles tradicionales.	Para que los biocombustibles derivados de microalgas sean económicamente competitivos se requieren de tecnologías de procesamiento rentables y el desarrollo de coproductos de alto valor.	(Kang et al., 2020)
Uso de pirólisis térmica para valorizar residuos de <i>A. platensis</i> después de haber extraído sus lípidos y proteínas.	La pirólisis térmica condujo a una disminución de compuestos nitrogenados y a un incremento de hidrocarburos en los productos de reacción. El poder calorífico de los residuos sólidos incrementó >20% con respecto a la biomasa inicial.	Biomasa de <i>A. platensis</i> tiene potencial para ser usada en una biorrefinería. La pirólisis térmica permitiría valorizar residuos después de haber extraído productos de alto valor (pigmentos, aminoácidos). Los residuos sólidos después de la pirólisis podrían servir como precursores de biocombustibles a base de carbono.	(Casazza et al., 2020)

Continuación Tabla 5.1.

Enfoque del estudio	Principales conclusiones	Perspectivas	Referencia
<p>Mejora de la producción de CH₄ a partir de <i>Chlorella</i> sp. usando estrategias como la codigestión con glicerol y optimización mediante diseño de experimentos con metodología de superficie de respuesta.</p>	<p>Las condiciones óptimas de relación de concentración de inóculo y sustrato (microalga y glicerol) fueron encontradas. Lo cual condujo a un mejoramiento de la producción de CH₄ de 58 veces más en comparación con las condiciones menos óptimas del diseño de experimentos.</p>	<p>El uso de sustratos ricos en carbono en codigestión con biomasa microalgal ayudaría a evitar problemas relacionados a la amonificación en la digestión anaerobia de microalgas. El uso de la metodología de superficie de respuesta permitirá optimizar la producción de CH₄.</p>	<p>(Sittijunda y Reungsang, 2020)</p>
<p>Mejora de la producción de hidrógeno por fermentación oscura mediante el aumento de la biodegradabilidad de biomasa microalgal por la aplicación del pretratamiento con amoníaco.</p>	<p>El pretratamiento con amoníaco mejoró la solubilización de la microalga conduciendo a un aumento del potencial de producción y la velocidad de producción de H₂.</p>	<p>El pretratamiento con amoníaco puede ser un pretratamiento ideal ya que sigue un modelo económico circular debido a que la forma no ionizada de amonio proviene del líquido de la fermentación oscura, el cual es un residuo del tratamiento de aguas residuales.</p>	<p>(Wang et al., 2019)</p>

La producción de biocombustibles gaseosos como el hidrógeno y el metano a partir de biomasa microalgal fue investigado en esta tesis, teniendo como objetivos mejorar la biodegradabilidad de *S. obtusiusculus* mediante la aplicación de pretratamientos térmicos y termoquímicos. Así como el uso de estrategias de aclimatación del inóculo, codigestión, digestión anaerobia a pH alcalino e incremento de la carga orgánica en la alimentación para mejorar el rendimiento y la velocidad de producción de biocombustibles gaseosos.

En el capítulo 2 se demostró que la biodegradabilidad de *S. obtusiusculus* es mejorada cuando se aplica un pretratamiento térmico con ácido diluido. Un diseño de experimentos permitió determinar que 105 °C, 1.7 h, 3% HCl (p/p) y 30 g/L de sólidos totales de microalga fueron las condiciones óptimas a las cuales el pretratamiento alcanzó los mayores porcentajes de solubilización de materia orgánica. En la literatura se pueden encontrar una gran variedad de pretratamientos, los cuales son usados tanto para biomasa lignocelulósica como para biomasa microalgal (Carrere et al., 2016; Hassan et al., 2018). Aunque los procesos de pretratamiento de la biomasa microalgal son similares a los aplicados a la biomasa lignocelulósica, la ausencia de lignina en las microalgas puede simplificar los procesos. La presencia de lignina en la biomasa lignocelulósica le confiere una protección adicional a la holocelulosa durante la hidrólisis. Además, la lignina es un compuesto muy recalcitrante y su fracción de masa en la biomasa lignocelulósica puede alcanzar hasta 36%, haciendo muy complejo el proceso de fermentación o biodegradación bajo condiciones anaerobias (Ruan et al., 2019). Por lo tanto, la celulosa de la pared celular de las microalgas es mucho más fácil de transformarse en glucosa en comparación con la biomasa lignocelulósica (Chisti, 2019). Sin embargo, en los últimos años se ha reportado que los rendimientos de producción de biocombustibles como hidrógeno por fermentación oscura, metano por digestión anaerobia y bioetanol por fermentación alcohólica pueden ser afectados por la recalcitrancia del algaenan presente en la pared celular de las microalgas (Sankaran et al., 2020). El algaenan es un biopolímero con una estructura química similar a la lignina, está formado por ácidos grasos hidroxilados, compuestos fenólicos y

derivados de fenilpropanoides los cuales también están presentes en la lignina (Ciudad et al., 2014; Delwiche et al., 1989).

Distintos pretratamientos han sido empleados para romper las células de las microalgas y así poder liberar y solubilizar su materia orgánica intracelular y estructural. En la [Tabla 5.2](#). se resumen las ventajas y desventajas de algunos de los pretratamientos más usados en biomasa microalgal (y también en biomasa lignocelulósica). A pesar de la variedad de pretratamientos existentes, el pretratamiento termoquímico con ácido diluido parece ser uno de los pretratamientos más adecuados tanto para la biomasa microalgal como para la biomasa lignocelulósica, ya que solubiliza hemicelulosa y remueve parte de la lignina en la biomasa lignocelulósica (Mahmood et al., 2019). Adicionalmente, el pretratamiento termoquímico con ácido diluido es de bajo costo, efectivo y su operación es muy simple comparado con otros pretratamientos; se ha reportado en varios trabajos que conduce a un mejoramiento del rendimiento de metano en comparación con biomasa no pretratada (Monlau et al., 2013; Taherdanak et al., 2016; Zhang et al., 2011). Además, puede ser realizado en cualquier laboratorio y es potencialmente escalable. De hecho, recientemente algunas compañías como DSM (www.dsm.com), ABENGOA (www.abengoa.es), IOGEN (www.iogen.ca), producen bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica pretratada termoquímicamente con ácido sulfúrico diluido (Zhang y Bao, 2018). A pesar de esto, no hay mucha información sobre sus efectos en la biomasa microalgal y el uso del hidrolizado obtenido para la producción H₂ y CH₄ por fermentación oscura y digestión anaerobia, respectivamente.

Tabla 5.2. Resumen de ventajas y desventajas de los principales pretratamientos usados en biomasa lignocelulósica y algal. Adaptado de Atelge et al. (2020); Bhatt y Shilpa (2014); Carrere et al. (2016); Onumaegbu et al. (2018); Rodriguez et al. (2015); Shankaran et al. (2020).

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Molienda mecánica	Control del tamaño de partícula. Incrementa el área superficial. Facilita el manejo de la materia prima. Maquinaria existente.	Alta demanda energética. El mantenimiento de los equipos es costoso. Sensible a materiales inertes.
Térmico (< 100 °C)	Alta solubilización de la biomasa. Eliminación de malos olores. Bajo riesgo de formación de compuestos tóxicos. Sanitización de la materia prima.	Alta demanda energética. Alto costo de capital. Liberación de amoníaco. Engrosamiento de la biomasa.
Hidrotérmico (100-250 °C)	Alta solubilización de la biomasa. Eliminación de malos olores. Se puede usar directamente biomasa húmeda. Incrementa el área superficial. Solubilización de hemicelulosa y lignina.	Alta demanda energética. Alto costo de capital. Riesgo de formación de compuestos tóxicos. Liberación de amoníaco. Engrosamiento de la biomasa.
Explosión de vapor	Alta recuperación de azúcares. Es uno de los pretratamientos más rentables. Se requiere bajo capital de inversión.	Degradación parcial de la hemicelulosa. Riesgo de formación de compuestos tóxicos.
Químico (ácido y álcali)	Baja demanda energética. Bajos costos. Su operación es simple. Efectivo en biomasa lignocelulósica. Altera la estructura de la lignina.	Generación de sales que pueden inhibir la fermentación y metanogénesis. Alto riesgo de degradación de azúcares. Riesgo de corrosión en los equipos.
Biológico (enzimas)	Baja demanda energética. Alta solubilización de azúcares. No genera compuestos tóxicos. Degrada lignina y hemicelulosa.	La velocidad de hidrólisis es lenta. Requiere de largos tiempos de reacción. Las enzimas tienen un alto costo. Las enzimas son específicas para ciertos sustratos.

Tabla 5.2. Continuación.

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Ultrasonificación	Su operación es simple. El tiempo de reacción es rápido. No se usan solventes. No requiere de altas temperaturas. No se producen residuos.	Alta demanda energética. No es adecuado para biomasa lignocelulósica. Algunas partes del equipo necesitan ser reemplazadas cada 1.5 - 2 años. Difícil de escalar.
Microondas	El calor aplicado es uniforme. Es uno de los pretratamientos con tiempo de reacción más corto. Su operación es simple. No se producen residuos.	Alta demanda energética. Baja penetración de la radiación en materia prima gruesa. Los equipos suelen ser costosos. Difícil de escalar.
Combinado (dos o más)	Mejoramiento en la solubilización (comparado con un solo pretratamiento). Los tiempos de reacción pueden ser notablemente reducidos.	Los costos de capital pueden elevarse significativamente dependiendo del sistema elegido.

En el Capítulo 2, también se evaluó el potencial bioquímico de producción de hidrógeno y metano a partir del hidrolizado obtenido después de pretratar la biomasa de *S. obtusiusculus* termoquímicamente con ácido clorhídrico diluido. Como resultado del pretratamiento se obtuvo un hidrolizado rico en carbohidratos solubles (7.45 g/L), los cuales fueron consumidos por microorganismos anaerobios mejorando el rendimiento de hidrógeno (1.7 veces) y metano (1.3 veces) en comparación con la biomasa microalgal no pretratada. Los resultados obtenidos demostraron que el pretratamiento térmico con ácido diluido es un método efectivo para solubilizar la materia orgánica de la microalga. Sin embargo, es necesario que en futuras investigaciones se realicen análisis tecnoeconómicos y de ciclo de vida para vislumbrar la factibilidad de producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal a gran escala. Después de una exhaustiva revisión bibliográfica, se encontró que solamente hay ocho estudios que han aplicado pretratamiento térmico con ácido diluido a biomasa microalgal eucariota para producir biocombustibles

(CarrilloReyes y Buitrón, 2016; Ferreira et al., 2013; Kumar et al., 2013; Mendez et al., 2013; Passos et al., 2016; Roy et al., 2014; Xia et al., 2014a, 2014b).

Después de determinar las condiciones óptimas para pretratar la biomasa microalgal, la atención fue puesta en producir hidrógeno (Capítulo 3) y metano (Capítulo 4) en régimen continuo. Los resultados del Capítulo 2 sugieren que la velocidad de producción de hidrógeno y la fase lag fueron afectadas por la sal (NaCl) formada después de la neutralización del hidrolizado. Por lo tanto, la estrategia más adecuada para evitar este inconveniente fue pretratar térmicamente la biomasa microalgal. En el Capítulo 3 el reactor fue inicialmente alimentado con suero de leche para activar a las bacterias productoras de hidrógeno. Sin embargo, la producción de hidrógeno en el reactor no se pudo cuantificar cuando el hidrolizado de microalga fue usado como sustrato. Esto sucedió debido a la baja carga orgánica volumétrica (COV) usada en el reactor, la cual estuvo en el orden de 0.54 g DQOs/L-d, haciendo que la producción de hidrógeno fuera muy baja y prácticamente imposible de cuantificar por los medios disponibles. La COV está directamente relacionada con la concentración del hidrolizado ([Ecuación 5.1.](#)), es por ello que es necesario obtener un hidrolizado con altas concentraciones de carbohidratos o DQOs para poder aplicar altas COV. Por ejemplo, a partir de hidrolizado enzimático de bagazo de *A. tequilana* se evaluaron COV en un intervalo de 17 a 60 g DQO/L-d para la producción continua de hidrógeno (Contreras-Dávila et al., 2017); COV similares a las anteriormente mencionadas deberían ser evaluadas en la producción continua de hidrógeno mediante fermentación oscura de biomasa microalgal en futuras investigaciones. En consecuencia, es necesario seguir investigando cuales son las condiciones óptimas que permiten obtener un hidrolizado de microalga rico en carbohidratos o DQOs más allá de las obtenidas en esta tesis.

COV = concentración del sustrato/tiempo de residencia hidráulico (5.1.)

Existen distintos tipos de estrategias que podrían usarse para mejorar la producción continua de hidrógeno o de metano a partir de biomasa microalgal ([Fig. 5.2.](#))

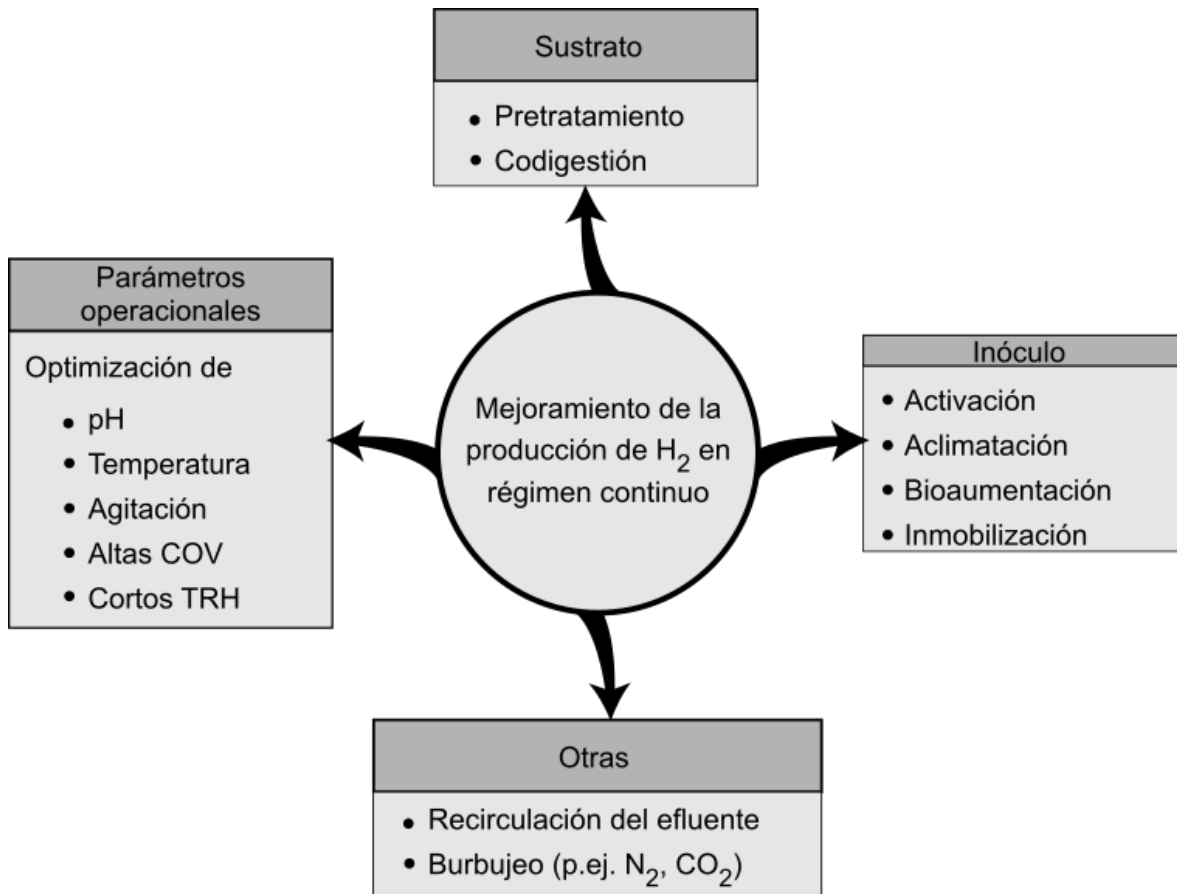


Fig. 5.2. Estrategias a tener en cuenta para mejorar la producción continua de hidrógeno a partir de biomasa microalgal. COV: Carga orgánica volumétrica; TRH: Tiempo de residencia hidráulico. Adaptado de Sivagurunathan et al. (2016).

Por ejemplo, una estrategia es la aclimatación del inóculo a biomasa microalgal. Se ha demostrado que la fuente del inóculo tiene un importante efecto sobre la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (Palomo-Briones et al., 2017). Otra estrategia es la codigestión de la biomasa microalgal con sustratos ricos en carbono, de esta forma se puede balancear la relación C/N, ya que las microalgas aportan un gran contenido de nitrógeno. Cabe resaltar que, aparte de la estrategia del pretratamiento, existe poca información sobre otras estrategias para mejorar la producción de hidrógeno a partir de biomasa microalgal. De hecho, de la exhaustiva revisión bibliográfica realizada para esta tesis sólo se encontraron tres artículos que reportan estrategias como activación del inóculo, aclimatación, codigestión (Carver

et al., 2011; Ding et al., 2016; Sivagurunathan et al., 2018). Sin embargo, estos estudios han sido en lote, en este sentido, es crucial que las futuras investigaciones se enfoquen en analizar otras estrategias para que la producción continua de hidrógeno a partir de biomasa microalgal pueda prosperar.

Posteriormente, el Capítulo 4 se enfoca en el estudio de la producción continua de metano a partir de biomasa microalgal, usando estrategias como la activación del inóculo, aclimatación y codigestión con un sustrato rico en carbono (suero de leche). Adicionalmente, se estudió la digestión anaerobia bajo condiciones alcalinas para obtener un biogás rico en metano y con bajo contenido de CO₂. Los resultados demostraron que el uso de biomasa microalgal como único sustrato para la producción de metano, al igual que para la producción de hidrógeno, tampoco es adecuada. Esto es debido a la naturaleza recalcitrante de la pared celular de *Scenedesmus*, la presencia de algaenan y proteoglicanos en la pared celular que perjudican la digestión anaerobia (He et al., 2016; Mishra et al., 2017). Shah et al. (2015) realizaron una revisión de los aspectos que deben considerarse para mejorar la metanogénesis, entre estos aspectos, adicional al pretratamiento de la biomasa microalgal, la codigestión con sustratos ricos en carbono es una estrategia que puede ofrecer los siguientes beneficios:

- Dilución de algún compuesto tóxico (p.ej. furfural).
- Mejoramiento en el balance de nutrientes (p.ej. relación C/N ~ 20-30).
- Un efecto sinérgico sobre la comunidad microbiana.
- Un incremento de la materia orgánica biodegradable.
- Un incremento en el rendimiento de metano (25-400%).

Por todo lo anteriormente mencionado, es importante enfocarse en la selección de un cosustrato adecuado (p.ej. barato, rico en carbohidratos, etc.) y la optimización de la relación de biomasa microalgal/cosustrato. En la [Tabla 5.3.](#) se pueden observar algunos de los sustratos comúnmente usados para la producción de biocombustibles. Estos se destacan por ser residuos o materias primas que tienen

poco valor económico y alto contenido de carbono; por lo tanto, se les considera que tienen el potencial para ser usados en la codigestión con biomasa microalgal.

Tabla 5.3. Tipos de biomasa con potencial para ser usados como cosustrato en la codigestión de biomasa microalgal.

Biomasa	Relación C/N	Referencia
Residuos de papas	35-60	(Rabii et al., 2019; Zhang et al., 2019)
Paja de avena	48-55	(Hagos et al., 2017; Zhao et al., 2018)
Olote/paja de maíz	60-70	(Li et al., 2014; Zhong et al., 2013)
Paja de arroz	43-67	(Kainthola et al., 2019; Wang et al., 2014)
Macroalgas	15-79	(Divya et al., 2015; edesco y Daniels, 2018)
Bagazo de caña de azúcar	48-101	(Leite et al., 2015; Stanmore, 2010)
Residuos de frutas y vegetales	104-114	(Basak et al., 2018; Gomez-Romero et al., 2014)
Suero de leche	39-97	(Niño-Navarro et al., 2020; Vivekanand et al., 2018)

Con respecto al biogás producido durante la digestión anaerobia bajo condiciones alcalinas, este fue rico en metano (70-90%). Esto se explica porque el líquido del reactor, al estar a pH alcalino, actúa como un depurador del biogás producido, ya que el CO₂ en un medio líquido con pH > 8 se transforma en bicarbonato y queda solubilizado en el líquido (Nolla-Ardèvol et al., 2015). La producción continua de un biogás rico en metano abre la posibilidad para que sea inyectado en la red de gas natural (dependiendo de las normas de cada país) o para que sea usado directamente como combustible en vehículos de transporte (IEA, 2019). La principal vía de producción de biogás es mediante la digestión anaerobia de materia orgánica; sin embargo, este biogás tiene un contenido de metano < 75%, lo cual

imposibilita su inyección a la red de gas natural sin un acondicionamiento previo. Por lo que es necesario que el biogás sea tratado y se elimine el CO₂ o su concentración sea muy pequeña, para que el metano sea prácticamente una corriente pura o con una concentración similar a la del gas natural (IEA, 2019). Por ejemplo, en México el gas natural debe contener entre 83-84% de metano (NOM-001-SECRE-2010, 2010). En Europa, para el año 2030, el uso de biometano tratado para inyectarse a la red de gas natural o para uso vehicular podría llegar a alcanzar entre 18-20 billones Nm³ (Scarlat et al., 2018). Actualmente, existen diferentes tecnologías para tratar el biogás y obtener biometano; de acuerdo con Sahota et al. (2018) las siguientes son algunas de las tecnologías en tendencia:

- Adsorción (p.ej. física, química).
- Absorción (p.ej. Adsorción por cambio de presión o temperatura).
- Membranas (p.ej. inorgánicas, poliméricas).
- Criogenia.
- Tecnologías híbridas (p.ej. combinación de membranas con depuración con agua presurizada).

Sin embargo, existen otras tecnologías que involucran tratamientos biológicos:

- Fotobiorreactores con consorcios microalgas-bacterias (Rodero et al., 2019; Toledo-Cervantes et al., 2017)
- Biofiltros percoladores (Cano et al., 2018)
- Sistemas bioelectroquímicos (Verbeeck et al., 2019)

Recientemente, varios artículos de revisión han examinado y comparado diferentes tecnologías para tratar el biogás, señalando las ventajas y desventajas de cada proceso (Angelidaki et al., 2019; Hosseinipour y Mehrpooya, 2019; Kadam y Panwar, 2017; Sahota et al., 2018), así como también presentan análisis tecnoeconómicos (Barbera et al., 2019; Lombardi y Francini, 2020; Wasajja et al., 2020). Sin embargo, ninguno menciona algo sobre la digestión anaerobia bajo condiciones alcalinas como estrategia para obtener un biogás rico en metano. El uso de cualquiera de las tecnologías de tratamiento/purificación del biogás implican

un costo de inversión y/o mantenimiento, lo cual puede incrementar hasta un 40% el costo anual de operación de una planta de biogás (Wasajja et al., 2020). Barbera et al. (2019) realizó un análisis tecnoeconómico de tres tecnologías comerciales de tratamiento de biogás, concluyendo que en la ausencia de incentivos del gobierno ninguna de las tecnologías evaluadas es viable. En tal sentido, la estrategia usada en el Capítulo 4 puede ser promisoría, ya que de acuerdo con Sousa et al. (2015), la digestión anaerobia puede integrarse con el cultivo de microalgas en condiciones alcalinas (Fig. 5.3.) y ofrecer beneficios muy interesantes como:

- Captura de CO_2 en el medio de cultivo.
- Enriquecimiento de metano en el biogás producido por digestión anaerobia.
- Recirculación del carbono inorgánico para ser aprovechado en el cultivo de microalgas.
- Los ácidos grasos volátiles (AGV) están en forma disociada, con lo cual se reduce su toxicidad ya que no pueden penetrar a la membrana celular de los microorganismos y causar un desequilibrio del balance de protones.
- Al reducir la toxicidad por AGV se pueden aplicar altas COV en la digestión anaerobia.
- En la digestión anaerobia el ácido sulfhídrico estaría en forma ionizada (HS^-), siendo menos volátil y tóxico. Por lo tanto, el biogás tendría una concentración prácticamente nula de H_2S .

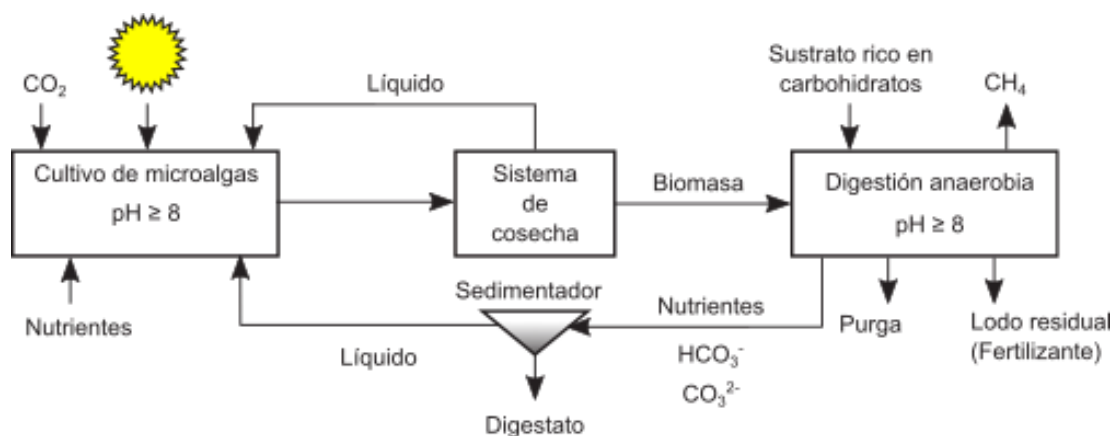


Fig. 5.3. Esquema simplificado de integración de cultivo de microalgas y producción de metano mediante digestión anaerobia bajo condiciones alcalinas. Adaptado de Canon-Rubio et al. (2016).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que los tiempos de residencia hidráulicos (TRH) en la producción de metano a partir de biomasa microalgal usualmente están en un intervalo de 15 a 100 días (Jankowska et al., 2017; Solé-Bundó et al., 2019). Sin embargo, en el Capítulo 4 se demostró que la producción de metano a partir de un hidrolizado de microalga puede ser llevada a cabo a TRH de hasta 3 días (Etapa IX), siempre y cuando se codigiera con un sustrato rico en carbohidratos como lo es el suero de leche. Este resultado es atribuido al incremento gradual del hidrolizado de microalga en la alimentación, esta estrategia hizo que el inóculo se adaptará progresivamente a un sustrato de difícil degradación como lo es la pared celular de la biomasa microalgal. Zamorano-López et al. (2020) encontraron que el tiempo de residencia de sólidos y la aclimatación del inóculo en la digestión anaerobia de la biomasa microalgal puede modificar a la comunidad microbiana y su abundancia relativa. A la estrategia de aclimatación se le atribuye la selección de microorganismos hidrolíticos con la capacidad de producir las enzimas necesarias para catalizar la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa. Yen & Brune (2007) observaron un incremento de la actividad de la enzima celulasa en la codigestión de biomasa microalgal y residuos de papel, lo cual lo correlacionaron con el aporte de micronutrientes (p.ej. Mo, Co, Ni, Fe) por parte de la biomasa microalgal. En tal sentido, tanto la aclimatación del inóculo como la codigestión ayudarían a mejorar la velocidad y la eficiencia de hidrólisis de moléculas complejas presentes en la biomasa microalgal. Nuestros resultados sugieren que ambas estrategias contribuirían en el mejoramiento de la producción de metano en comparación con la monodigestión de biomasa microalgal.

De forma general, esta tesis contribuye a elucidar los factores más importantes en la solubilización de carbohidratos y DQO a partir de biomasa microalgal usando el pretratamiento térmico con ácido diluido. Además, se vislumbran algunas de las estrategias que podrían conducir al éxito o al fracaso de la producción continua de hidrógeno y metano. Con los resultados obtenidos en esta Tesis se puede concluir que el pretratamiento térmico con ácido diluido permitió obtener un hidrolizado rico

en carbohidratos solubles y DQO soluble. Este hidrolizado contiene NaCl, por lo que si se quiere usar para la fermentación oscura o digestión anaerobia es necesario que el inóculo tenga una fase de aclimatación. Además, se demostró que la producción continua de hidrógeno a partir de hidrolizado de microalga obtenido mediante pretratamiento térmico no es factible, puesto que el pretratamiento térmico tiene bajas eficiencias de solubilización comparado con el pretratamiento termoquímico, con lo cual no se pueden alcanzar COV que soporten la producción de hidrógeno. Por último, se demostró que la producción continua de biogás a partir de hidrolizado de microalga (monodigestión) es mejorada cuando se realiza en codigestión con un sustrato rico en carbono; asimismo, se demostró que el contenido de metano en el biogás se enriqueció cuando la digestión anaerobia (monodigestión y codigestión) fue realizada a condiciones de pH alcalino.

5.2. Perspectivas

Estudios recientes, incluyendo esta tesis, se han enfocado en la producción de biocombustibles a partir de biomasa microalgal. Hoy en día, este enfoque no es económicamente competitivo con los combustibles fósiles, por lo que su comercialización es inviable actualmente (Kumar et al., 2016; Perin y Jones, 2019). Esto es debido a algunos inconvenientes como la elección de la especie de microalga, la cual debe tener ciertas capacidades o características, por ejemplo:

- Tener altas productividades de biomasa (i.e. ≥ 0.4 g/L-d).
- Acumular ya sea pigmentos, lípidos, carbohidratos y/o proteínas.
- Tener una alta biodegradabilidad (i.e. sin pared celular o con una pared celular no recalcitrante).
- Resiliencia (p.ej. crecer en aguas residuales o con alta salinidad o con contaminantes).

Entre más de estas características posea, la microalga tendrá un mayor potencial para ser usada como materia prima en una biorrefinería o para la producción de biocombustibles. Otros inconvenientes pueden ser el impacto ambiental y el costo

del o los pretratamientos (si es que se usan), baja productividad de biomasa (Najih Badar et al., 2018) y los costos del método de cosecha (Goswami et al., 2019; Roy y Mohanty, 2019). Por último, hay temas que no están totalmente esclarecidos como los son los costos de operación y el capital de inversión, así como políticas e incentivos del gobierno.

Por lo tanto, es recomendable que las futuras investigaciones integren temas de esquema de biorrefinería, ingeniería genética y metabólica de microalgas acompañado de un análisis tecnoeconómico y ambiental. Estas estrategias podrían hacer que los biocombustibles y coproductos derivados de las microalgas sean económicamente viables y competitivos con los combustibles fósiles. En consecuencia, es crítico el enfoque y las estrategias que sean elegidas para lograr una aceleración en la transición hacia sistemas energéticos renovables y sustentables a partir de biomasa microalgal.

5.3. Referencias

- Adeniyi, O.M., Azimov, U., Burluka, A., 2018. Algae biofuel: Current status and future applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90, 316–335.
- Ahring, Birgitte K, Ahring, B K, Angelidaki, I., Dolfig, J., EUegaard, L., Gavala, H.N., Haagensen, F., Mogensen, A.S., Lyberatos, G., Pind, P.F., Schmidt, J.E., Skiadas, I. V, Stamatelatou, K. (Eds.), 2003. *Biomethanation II, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Allard, B., Templier, J., 2001. High molecular weight lipids from the trilaminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* 57, 459–467.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, a. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59, 927–934.
- Angelidaki, I., Xie, L., Luo, G., Zhang, Y., Oechsner, H., Lemmer, A., Munoz, R., Kougias, P.G., 2019. Biogas Upgrading: Current and Emerging Technologies, in: *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*. pp. 817–843.
- Ansari, F.A., Ravindran, B., Gupta, S.K., Nasr, M., Rawat, I., Bux, F., 2019. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus*

- obliquus microalgae. *J. Environ. Manage.* 240, 293–302.
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Pashchenko, V.Z., Rubin, A.B., Stensjo, K., Tyystjärvi, E., Ramakrishna, S., Los, D.A., Carpentier, R., Nishihara, H., Allakhverdiev, S.I., 2012. State of the Art and Progress in Production of Biohydrogen, State of the Art and Progress in Production of Biohydrogen. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS.
- APHA, 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Atelge, M.R., Atabani, A.E., Banu, J.R., Krisa, D., Kaya, M., Eskicioglu, C., Kumar, G., Lee, C., Yildiz, Y.Ş., Unalan, S., Mohanasundaram, R., Duman, F., 2020. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. *Fuel* 270, 117494.
- Awe, O.W., Zhao, Y., Nzihou, A., Minh, D.P., Lyczko, N., 2017. A Review of Biogas Utilisation, Purification and Upgrading Technologies. *Waste and Biomass Valorization* 8, 267–283.
- Barbera, E., Menegon, S., Banzato, D., D'Alpaos, C., Bertucco, A., 2019. From biogas to biomethane: A process simulation-based techno-economic comparison of different upgrading technologies in the Italian context. *Renew. Energy* 135, 663–673.
- Bárceñas-Ruiz, C.D., Carrillo-Reyes, J., Arellano-García, L., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2016. Pretreatment and upward liquid velocity effects over granulation in hydrogen producing EGSB reactors. *Biochem. Eng. J.* 107, 75–84.
- Basak, B., Fatima, A., Jeon, B.-H., Ganguly, A., Chatterjee, P.K., Dey, A., 2018. Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. *Energy Sustain. Dev.* 47, 39–52.
- Batista, A.P., Ambrosano, L., Graça, S., Sousa, C., Marques, P.A.S.S., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro Neto, P., Gouveia, L., 2014a. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – An integrated microalgae-based approach. *Bioresour. Technol.* 184, 230–235.
- Batista, A.P., Gouveia, L., Marques, P.A.S.S., 2018. Fermentative hydrogen production from microalgal biomass by a single strain of bacterium *Enterobacter aerogenes* – Effect of operational conditions and fermentation kinetics. *Renew. Energy* 119, 203–209.
- Batista, A.P., Moura, P., Marques, P. a S.S., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., 2014b. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel* 117, 537–543.
- Baudelet, P.-H., Ricochon, G., Linder, M., Muniglia, L., 2017. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res.* 25, 333–371.
- Bhatt, S.M., Shilpa, 2014. Lignocellulosic feedstock conversion, inhibitor detoxification and cellulosic hydrolysis – a review. *Biofuels* 5, 633–649.
- Bisalputra, T., Weier, T.E., 1963. The Cell Wall of *Scenedesmus quadricauda*. *Am. J. Bot.* 50, 1011.
- Bordoloi, N., Narzari, R., Sut, D., Saikia, R., Chutia, R.S., Katak, R., 2016. Characterization of bio-oil and its sub-fractions from pyrolysis of *Scenedesmus dimorphus*. *Renew. Energy* 98, 245–253.
- Burczyk, J., Dworzanski, J., 1988. Comparison of sporopollenin-like algal resistant polymer from cell wall of *Botryococcus*, *scenedesmus* and *lycopodium clavatum* by GC-pyrolysis. *Phytochemistry*

27, 2151–2153.

- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresour. Technol.* 181, 128–135.
- Calicioglu, O., Demirer, G.N., 2016. Biogas Production from Waste Microalgal Biomass Obtained from Nutrient Removal of Domestic Wastewater. *Waste and Biomass Valorization* 7, 1397–1408.
- Candia-Lomelí, M., 2018. Microalgas como fuente de biomasa para la producción de biogás. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Cano, P.I., Colón, J., Ramírez, M., Lafuente, J., Gabriel, D., Cantero, D., 2018. Life cycle assessment of different physical-chemical and biological technologies for biogas desulfurization in sewage treatment plants. *J. Clean. Prod.* 181, 663–674.
- Canon-Rubio, K.A., Sharp, C.E., Bergerson, J., Strous, M., De la Hoz Siegler, H., 2016. Use of highly alkaline conditions to improve cost-effectiveness of algal biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1611–1622.
- Carminati, P., Gusmini, D., Pizzera, A., Catenacci, A., Parati, K., Ficara, E., 2018. Biogas from mono- and co-digestion of microalgal biomass grown on piggery wastewater. *Water Sci. Technol.* 78, 103–113.
- Carrere, H., Antonopoulou, G., Affes, R., Passos, F., Battimelli, A., Lyberatos, G., Ferrer, I., 2016. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. *Bioresour. Technol.* 199, 386–397.
- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., 2016. Biohydrogen and methane production via a two-step process using an acid pretreated native microalgae consortium. *Bioresour. Technol.* 221, 324–330.
- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H.O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., Trably, E., Wenzel, J., Zaiat, M., 2019. A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 26237–26247.
- Carver, S.M., Hulatt, C.J., Thomas, D.N., Tuovinen, O.H., 2011. Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H₂ production. *Biodegradation* 22, 805–814.
- Casazza, A.A., Spennati, E., Converti, A., Busca, G., 2020. Production of carbon-based biofuels by pyrolysis of exhausted *Arthrospira platensis* biomass after protein or lipid recovery. *Fuel Process. Technol.* 201, 106336.
- Cea-Barcia, G., Pérez, J., Buitrón, G., 2018. Co-digestion of microalga-bacteria biomass with papaya waste for methane production. *Water Sci. Technol.* 78, 125–131.
- Chandra, R., Iqbal, H.M.N., Vishal, G., Lee, H.-S., Nagra, S., 2019. Algal biorefinery: A sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery. *Bioresour. Technol.* 278, 346–359.

- Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.J., Bai, F.W., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1–10.
- Chisti, Y., 2019. Introduction to algal fuels, in: *Biofuels from Algae*. Elsevier, pp. 1–31.
- Chng, L.M., Lee, K.T., Chan, D.J.C., 2017. Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. *Energy Convers. Manag.* 141, 410–419.
- Choi, J.-A., Hwang, J.-H., Dempsey, B.A., Abou-Shanab, R.A.I., Min, B., Song, H., Lee, D.S., Kim, J.R., Cho, Y., Hong, S., Jeon, B.-H., 2011. Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent. *Energy Environ. Sci.* 4, 3513.
- Ciudad, G., Rubilar, O., Azócar, L., Toro, C., Cea, M., Torres, Á., Ribera, A., Navia, R., 2014. Performance of an enzymatic extract in *Botryococcus braunii* cell wall disruption. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 75–80.
- Comino, E., Rosso, M., Riggio, V., 2010. Bioresource Technology Investigation of increasing organic loading rate in the co-digestion of energy crops and cow manure mix. *Bioresour. Technol.* 101, 3013–3019.
- Contreras-Dávila, C.A., Méndez-Acosta, H.O., Arellano-García, L., Alatríste-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. *Chem. Eng. J.* 313, 671–679.
- Córdova, O., Ruiz-Filippi, G., Feroso, F.G., Chamy, R., 2018. Influence of growth kinetics of microalgal cultures on biogas production. *Renew. Energy* 122, 455–459.
- Cortés-Carmona, M., Tapia-Rodríguez, A., Morales, M., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2018. Methane production from thermally pretreated *Scenedesmus obtusiusculus* biomass in semi-batch reactors at low reaction times. *Biochem. Eng. J.* 136, 61–68.
- Cortés-Carmona, M.A., 2016. Combustibles gaseosos a partir de biomasa microalgal de *Scenedesmus obtusiusculus*.
- D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., Bastiaens, L., 2017. Cell disruption technologies, in: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Elsevier, pp. 133–154.
- Delwiche, C.F., Graham, L.E., Thomson, N., 1989. Lignin-Like Compounds and Sporopollenin Coleochaete, an Algal Model for Land Plant Ancestry. *Science* (80-.). 245, 399–401.
- Deng, C., Lin, R., Cheng, J., Murphy, J.D., 2019. Can acid pre-treatment enhance biohydrogen and biomethane production from grass silage in single-stage and two-stage fermentation processes? *Energy Convers. Manag.* 195, 738–747.
- Ding, L., Cheng, J., Xia, A., Jacob, A., Voelklein, M., Murphy, J.D., 2016. Co-generation of biohydrogen and biomethane through two-stage batch co-fermentation of macro- and micro-algal biomass. *Bioresour. Technol.* 218, 224–231.

- Divya, D., Gopinath, L.R., Merlin Christy, P., 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 690–699.
- Dong, T., Van Wychen, S., Nagle, N., Pienkos, P.T., Laurens, L.M.L., 2016. Impact of biochemical composition on susceptibility of algal biomass to acid-catalyzed pretreatment for sugar and lipid recovery. *Algal Res.* 18, 69–77.
- DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J.K., Rebers, P. a., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- EBA, 2018. EBA Statistical Report 2018, Annual Report.
- Fermoso, F.G., Beltran, C., Jimenez, A., Fernández, M.J., Rincón, B., Borja, R., Jeison, D., 2016. Screening of biomethane production potential from dominant microalgae. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 51, 1062–1067.
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Ferreira, A.F., Tavares, M.L.A., Vladic, J., Vidović, S., Cvetkovic, D., Melkonyan, L., Avetisova, G., Goginyan, V., Gouveia, L., 2019. Scenedesmus obliquus microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 13, 1169–1186.
- Ferreira, A.F., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., Moura, P., Silva, C.M., 2013. Energy requirement and CO₂ emissions of bioH₂ production from microalgal biomass. *Biomass and Bioenergy* 49, 249–259.
- Frigon, J.C., Matteau-Lebrun, F., Hamani Abdou, R., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl. Energy* 108, 100–107.
- García, C.A., Masera, O., 2017. Estado del Arte de la bioenergía en México.
- Gerken, H.G., Donohoe, B., Knoshaug, E.P., 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta* 237, 239–253.
- Gomez-Romero, J., Gonzalez-Garcia, A., Chairez, I., Torres, L., García-Peña, E.I., 2014. Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 12541–12550.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.-P., 2012a. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 6, 205–218.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresour. Technol.* 129, 219–223.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012b. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy* 40, 105–111.
- Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., Maiti, S.K., Chandra Dutta, B., Singh, H., Das, D., 2019. A low-cost and scalable process for harvesting microalgae using commercial-grade flocculant. *RSC*

Adv. 9, 39011–39024.

- Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., Lu, X., 2017. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76, 1485–1496.
- Han, L., Pei, H., Hu, W., Jiang, L., Ma, G., Zhang, S., Han, F., 2015. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. *Bioresour. Technol.* 175, 262–268.
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 262, 310–318.
- He, X., Dai, J., Wu, Q., 2016. Identification of sporopollenin as the outer layer of cell wall in microalga *Chlorella protothecoides*. *Front. Microbiol.* 7, 1–11.
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M.C., 2015. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* 262, 939–945.
- Ho, S.-H., Li, P.-J., Liu, C.-C., Chang, J.-S., 2013. Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 145, 142–149.
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., De Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.C., De Lacroix, H.F., Ghasimi, D.S.M., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Horvath, I.S., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Pfund, F.R., Strömberg, S., Torrijos, M., Van Eekert, M., Van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Sci. Technol.* 74, 2515–2522.
- Hosseinipour, S.A., Mehrpooya, M., 2019. Comparison of the biogas upgrading methods as a transportation fuel. *Renew. Energy* 130, 641–655.
- IEA, 2019. *World Energy Outlook 2019*.
- Jankowska, E., Sahu, A.K., Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 75, 692–709.
- Kadam, R., Panwar, N.L., 2017. Recent advancement in biogas enrichment and its applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 73, 892–903.
- Kainthola, J., Kalamdhad, A.S., Goud, V. V., 2019. Optimization of methane production during anaerobic co-digestion of rice straw and hydrilla verticillata using response surface methodology. *Fuel* 235, 92–99.
- Kang, S., Heo, S., Realf, M.J., Lee, J.H., 2020. Three-stage design of high-resolution microalgae-based biofuel supply chain using geographic information system. *Appl. Energy* 265, 114773.
- Khanna, N., Das, D., 2013. Biohydrogen production by dark fermentation. *Wiley Interdiscip. Rev. Energy Environ.* 2, 401–421.

- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Hoekzema, Y., Mussgnug, J.H., Kruse, O., 2015. A novel one-stage cultivation/fermentation strategy for improved biogas production with microalgal biomass. *J. Biotechnol.* 215, 44–51.
- Koutra, E., Tsafrakidou, P., Sakarika, M., Kornaros, M., 2020. Microalgal Biorefinery, in: *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier, pp. 163–185.
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Thi, N.B.D., Zhen, G., Kobayashi, T., Kim, S.-H., Xu, K., 2016. Evaluation of different pretreatments on organic matter solubilization and hydrogen fermentation of mixed microalgae consortia. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 21628–21640.
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Zhen, G., Kobayashi, T., Kim, S.-H., Xu, K., 2017. Combined pretreatment of electrolysis and ultra-sonication towards enhancing solubilization and methane production from mixed microalgae biomass. *Bioresour. Technol.* 245, 196–200.
- Kumar, K., Ghosh, S., Angelidaki, I., Holdt, S.L., Karakashev, D.B., Morales, M.A., Das, D., 2016. Recent developments on biofuels production from microalgae and macroalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 65, 235–249.
- Kumar, K., Roy, S., Das, D., 2013. Continuous mode of carbon dioxide sequestration by *C. sorokiniana* and subsequent use of its biomass for hydrogen production by *E. cloacae* IIT-BT 08. *Bioresour. Technol.* 145, 116–122.
- Kumar, M., Sun, Y., Rathour, R., Pandey, A., Thakur, I.S., Tsang, D.C.W., 2020. Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: Opportunities and challenges. *Sci. Total Environ.* 716, 137116.
- Lee, H.-S., Rittmann, B.E., 2009. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 749–758.
- Leite, A.F., Janke, L., Harms, H., Zang, J.W., Fonseca-Zang, W.A., Stinner, W., Nikolausz, M., 2015. Assessment of the Variations in Characteristics and Methane Potential of Major Waste Products from the Brazilian Bioethanol Industry along an Operating Season. *Energy & Fuels* 29, 4022–4029.
- Li, Y., Zhang, R., He, Y., Zhang, C., Liu, X., Chen, C., Liu, G., 2014. Anaerobic co-digestion of chicken manure and corn stover in batch and continuously stirred tank reactor (CSTR). *Bioresour. Technol.* 156, 342–347.
- Liu, C.H., Chang, C.Y., Cheng, C.L., Lee, D.J., Chang, J.S., 2012. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15458–15464.
- Lombardi, L., Francini, G., 2020. Techno-economic and environmental assessment of the main biogas upgrading technologies. *Renew. Energy* 156, 440–458.
- Mahmood, H., Moniruzzaman, M., Iqbal, T., Khan, M.J., 2019. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 20, 18–24.
- Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel

- production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 281–291.
- Martín Juárez, J., Riol Pastor, E., Fernández Sevilla, J.M., Muñoz Torre, R., García-Encina, P.A., Bolado Rodríguez, S., 2018. Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. *Bioresour. Technol.* 257, 30–38.
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R. a., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2013. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour. Technol.* 149, 136–141.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L., 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 104, 342–348.
- Mishra, V., Dubey, A., Prajapati, S.K., 2017. Algal Biomass Pretreatment for Improved Biofuel Production, in: *Algal Biofuels*. Springer International Publishing, Cham, pp. 259–280.
- Monlau, F., Latrille, E., Da Costa, A.C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2013. Enhancement of methane production from sunflower oil cakes by dilute acid pretreatment. *Appl. Energy* 102, 1105–1113.
- Montgomery, D.C., 2012. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons.
- Montiel Corona, V., Razo-Flores, E., 2017. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341.
- Montingelli, M.E., Tedesco, S., Olabi, A.G., 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 43, 961–972.
- Mottet, A., Habouzit, F., Steyer, J.P., 2014. Anaerobic digestion of marine microalgae in different salinity levels. *Bioresour. Technol.* 158, 300–306.
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56.
- Nagarajan, D., Lee, D.-J., Kondo, A., Chang, J.-S., 2017. Recent insights into biohydrogen production by microalgae ? From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresour. Technol.* 227, 373–387.
- Najih Badar, S., Mohammad, M., Emdadi, Z., Yaakob, Z., 2018. Algae and their growth requirements for bioenergy: a review. *Biofuels* 1–19.
- Nguyen, D., Gadhamshetty, V., Nitayavardhana, S., Khanal, S.K., 2015. Automatic process control in anaerobic digestion technology: A critical review. *Bioresour. Technol.* 193, 513–522.
- Niño-Navarro, C., Chairez, I., Christen, P., Canul-Chan, M., García-Peña, E.I., 2020. Enhanced hydrogen production by a sequential dark and photo fermentation process: Effects of initial feedstock composition, dilution and microbial population. *Renew. Energy* 147, 924–936.
- Nolla-Ardèvol, V., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2015. Anaerobic digestion of the microalga *Spirulina* at extreme alkaline conditions: biogas production, metagenome, and metatranscriptome. *Front. Microbiol.* 6, 1–21.
- NOM-001-SECRE-2010, 2010. NORMA Oficial Mexicana. NOM-001-SECRE-2010, Especificaciones del gas natural, Diario Oficial de la Federación.
- Oey, M., Sawyer, A.L., Ross, I.L., Hankamer, B., 2016. Challenges and opportunities for hydrogen

- production from microalgae. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1487–1499.
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., Olabi, A.G., 2018. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 93, 16–26.
- Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., Moura, P., 2015. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. *Fuel* 153, 128–134.
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., Trably, E., 2017. Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Appl. Energy* 198, 77–87.
- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N.E., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Razo-Flores, E., 2018. Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium-Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2465–2475.
- Park, C., Lee, Ja Hyun, Yang, X., Yoo, H.Y., Lee, Ju Hun, Lee, S.K., Kim, S.W., 2016. Enhancement of hydrolysis of *Chlorella vulgaris* by hydrochloric acid. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39, 1015–1021.
- Passos, F., Carretero, J., Ferrer, I., 2015. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chem. Eng. J.* 279, 667–672.
- Passos, F., Felix, L., Rocha, H., Pereira, J. de O., de Aquino, S., 2016. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. *Bioresour. Technol.* 209, 305–312.
- Perin, G., Jones, P.R., 2019. Economic feasibility and long-term sustainability criteria on the path to enable a transition from fossil fuels to biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 57, 175–182.
- Pires, J.C.M., 2017. COP21: The algae opportunity? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 867–877.
- Polizzi, C., Alatraste-Mondragón, F., Munz, G., 2018. The role of organic load and ammonia inhibition in anaerobic digestion of tannery fleshing. *Water Resour. Ind.* 19, 25–34.
- Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., Elbeshbishy, E., 2019. A Review on Anaerobic Co-Digestion with a Focus on the Microbial Populations and the Effect of Multi-Stage Digester Configuration. *Energies* 12, 1106.
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N., 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chem. Eng. J.* 242, 86–95.
- Ramos-Suárez, J.L., Cuadra, F.G., Acién, F.G., Carreras, N., 2014a. Benefits of combining anaerobic digestion and amino acid extraction from microalgae. *Chem. Eng. J.* 258, 1–9.
- Ramos-Suárez, J.L., Martínez, A., Carreras, N., 2014b. Optimization of the digestion process of *Scenedesmus* sp. and *Opuntia maxima* for biogas production. *Energy Convers. Manag.* 88, 1263–1270.
- Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Bernet, N., Steyer, J.P., 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 102,

200–206.

- Rasmussen, H., Sørensen, H.R., Meyer, A.S., 2014. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydr. Res.* 385, 45–57.
- Rétfalvi, T., Szabó, P., Hájos, A.-T., Albert, L., Kovács, A., Milics, G., Neményi, M., Lakatos, E., Ördög, V., 2016. Effect of co-substrate feeding on methane yield of anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 28, 2741–2752.
- Rincón-Pérez, J., Razo-Flores, E., Morales, M., Alatrliste-Mondragón, F., Celis, L.B., 2020. Improving the Biodegradability of *Scenedesmus obtusiusculus* by Thermochemical Pretreatment to Produce Hydrogen and Methane. *BioEnergy Res.* 13, 477–486.
- Roberts, K.P., Heaven, S., Banks, C.J., 2016. Comparative testing of energy yields from micro-algal biomass cultures processed via anaerobic digestion. *Renew. Energy* 87, 744–753.
- Rodero, M. del R., Lebrero, R., Serrano, E., Lara, E., Arbib, Z., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2019. Technology validation of photosynthetic biogas upgrading in a semi-industrial scale algal-bacterial photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 279, 43–49.
- Rodríguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., Olabi, A.G., 2015. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Process. Technol.* 138, 765–779.
- Roy, M., Mohanty, K., 2019. A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. *Algal Res.* 44, 101683.
- Roy, S., Kumar, K., Ghosh, S., Das, D., 2014. Thermophilic biohydrogen production using pre-treated algal biomass as substrate. *Biomass and Bioenergy* 61, 157–166.
- Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., Ding, K., Peng, P., Addy, M., Cheng, Y., Anderson, E., Wang, Y., Liu, Y., Lei, H., Li, B., 2019. Biofuels: Introduction, in: *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*. Elsevier, pp. 3–43.
- Sahota, S., Shah, G., Ghosh, P., Kapoor, R., Sengupta, S., Singh, P., Vijay, V., Sahay, A., Vijay, V.K., Thakur, I.S., 2018. Review of trends in biogas upgradation technologies and future perspectives. *Bioresour. Technol. Reports* 1, 79–88.
- Salas-Montantes, C.J., González-ortega, O., Ochoa-alfaro, A.E., Camarena-rangel, R., Paz-maldonado, L.M.T., Rosales-mendoza, S., Rocha-uribe, A., Soria-guerra, R.E., Soria-guerra, R.E., 2018. Lipid accumulation during nitrogen and sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* overexpressing a transcription factor 1721–1733.
- Sánchez-García, L., Cabello, J., Jiménez-García, L.F., Evah, S., Morales-Ibarría, M., 2020. Enhancing the lipid content of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM by controlled acidification under indoor and outdoor conditions. *Sometido a Algal Res.*
- Sankaran, R., Parra Cruz, R.A., Pakalapati, H., Show, P.L., Ling, T.C., Chen, W.-H., Tao, Y., 2020. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresour. Technol.* 298, 122476.

- Santos, N.O., Oliveira, S.M., Alves, L.C., Cammarota, M.C., 2014. Methane production from marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Bioresour. Technol.* 157, 60–67.
- Scarlat, N., Dallemand, J.F., Fahl, F., 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renew. Energy* 129, 457–472.
- SENER, 2016. *Prospectiva de Energías Renovables 2016-2030*. Mexico.
- SENER, 2008. *Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos*. Mexico.
- Shah, F.A., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I.A., Shah, M.M., 2015. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 627–642.
- Sharma, S., Ghoshal, S.K., 2015. Hydrogen the future transportation fuel: From production to applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 43, 1151–1158.
- Show, K.-Y., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8524–8533.
- Singh, R., Singh, A., Rathore, D., 2017. *Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective*. Springer India, New Delhi.
- Sittijunda, S., Reungsang, A., 2020. Methane Production from the Co-digestion of Algal Biomass with Crude Glycerol by Anaerobic Mixed Cultures. *Waste and Biomass Valorization* 11, 1873–1881.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S.-H., Kobayashi, T., Xu, K.Q., Lakner, G., Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2016. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 41, 3820–3836.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Kobayashi, T., Xu, K., Kim, S.-H., 2017. Effects of various dilute acid pretreatments on the biochemical hydrogen production potential of marine macroalgal biomass. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 27600–27606.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Kobayashi, T., Xu, K., Kim, S.-H., Nguyen, D.D., Chang, S.W., 2018. Co-digestion of untreated macro and microalgal biomass for biohydrogen production: Impact of inoculum augmentation and microbial insights. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 11484–11492.
- Solé-Bundó, M., Carrère, H., Garfí, M., Ferrer, I., 2017. Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). *Algal Res.* 24, 199–206.
- Solé-Bundó, M., Passos, F., Romero-Güiza, M.S., Ferrer, I., Astals, S., 2019. Co-digestion strategies to enhance microalgae anaerobic digestion: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 112, 471–482.
- Solé-Bundó, M., Salvadó, H., Passos, F., Garfí, M., Ferrer, I., 2018. Strategies to Optimize Microalgae Conversion to Biogas: Co-Digestion, Pretreatment and Hydraulic Retention Time. *Molecules* 23, 2096.
- Sousa, J.A.B., Sorokin, D.Y., Bijmans, M.F.M., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2015. Ecology and application of haloalkaliphilic anaerobic microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9331–9336.

- Stanmore, B.R., 2010. Generation of Energy from Sugarcane Bagasse by Thermal Treatment. *Waste and Biomass Valorization* 1, 77–89.
- Sun, M.-T., Fan, X.-L., Zhao, X.-X., Fu, S.-F., He, S., Manasa, M.R.K., Guo, R.-B., 2017. Effects of organic loading rate on biogas production from macroalgae: Performance and microbial community structure. *Bioresour. Technol.* 235, 292–300.
- Taherdanak, M., Zilouei, H., Karimi, K., 2016. The influence of dilute sulfuric acid pretreatment on biogas production from wheat plant. *Int. J. Green Energy* 13, 1129–1134.
- Takeda, H., 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry* 42, 673–675.
- Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J.E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., Lay, C.-H., Chu, C.-Y., Leu, H.-J., Marone, A., Lin, C.-Y., Kim, D.-H., Trably, E., Ruiz-Filippi, G., 2015. Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 14, 761–785.
- Tartakovsky, B., Lebrun, F.M., Guiot, S.R., 2015. High-rate biomethane production from microalgal biomass in a UASB reactor. *Algal* 7, 86–91.
- Tartakovsky, B., Matteau-Lebrun, F., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Methane production from the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD in a continuous anaerobic reactor. *Algal Res.* 2, 394–400.
- Tedesco, S., Daniels, S., 2018. Optimisation of biogas generation from brown seaweed residues: Compositional and geographical parameters affecting the viability of a biorefinery concept. *Appl. Energy* 228, 712–723.
- Tian, H., Fotidis, I.A., Mancini, E., Treu, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., Angelidaki, I., 2018. Acclimation to extremely high ammonia levels in continuous biomethanation process and the associated microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 247, 616–623.
- Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Lall, S.P., 2015. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 27, 1109–1119.
- Toledo-Cervantes, A., Estrada, J.M., Lebrero, R., Muñoz, R., 2017. A comparative analysis of biogas upgrading technologies: Photosynthetic vs physical/chemical processes. *Algal Res.* 25, 237–243.
- Toledo-Cervantes, A., Garduño Solórzano, G., Campos, J.E., Martínez-García, M., Morales, M., 2018. Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnol. Reports* 17, 16–23.
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130, 652–658.
- Tran, K.C., Mendoza Martin, J.L., Heaven, S., Banks, C.J., Acien Fernandez, F.G., Molina Grima, E., 2014. Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open

- raceway. *Algal Res.* 5, 95–102.
- VDI 4630, 2016. Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests.
- Verbeeck, K., De Vrieze, J., Biesemans, M., Rabaey, K., 2019. Membrane electrolysis-assisted CO₂ and H₂S extraction as innovative pretreatment method for biological biogas upgrading. *Chem. Eng. J.* 361, 1479–1486.
- Versteegh, G.J.M., Blokker, P., 2004. Resistant macromolecules of extant and fossil microalgae. *Phycol. Res.* 52, 325–339.
- Vivekanand, V., Mulat, D.G., Eijssink, V.G.H., Horn, S.J., 2018. Synergistic effects of anaerobic co-digestion of whey, manure and fish ensilage. *Bioresour. Technol.* 249, 35–41.
- Voigt, J., Stolarczyk, A., Zych, M., Malec, P., Burczyk, J., 2014. The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 215–216, 39–47.
- Wang, A., Sun, D., Cao, G., Wang, H., Ren, N., Wu, W.-M., Logan, B.E., 2011. Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell. *Bioresour. Technol.* 102, 4137–4143.
- Wang, J., Yin, Y., 2018. Fermentative hydrogen production using pretreated microalgal biomass as feedstock. *Microb. Cell Fact.* 17, 22.
- Wang, Q., Gong, Y., Liu, S., Wang, D., Liu, R., Zhou, X., Nghiem, L.D., Zhao, Y., 2019. Free Ammonia Pretreatment To Improve Bio-hydrogen Production from Anaerobic Dark Fermentation of Microalgae. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 1642–1647.
- Wang, S., Hou, X., Su, H., 2017. Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. *Sci. Rep.* 7, 1149.
- Wang, X., Lu, X., Li, F., Yang, G., 2014. Effects of Temperature and Carbon-Nitrogen (C/N) Ratio on the Performance of Anaerobic Co-Digestion of Dairy Manure, Chicken Manure and Rice Straw: Focusing on Ammonia Inhibition. *PLoS One* 9, e97265.
- Ward, a. J., Lewis, D.M., Green, F.B., 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Res.* 5, 204–214.
- Wasajja, H., Lindeboom, R.E.F., van Lier, J.B., Aravind, P.V., 2020. Techno-economic review of biogas cleaning technologies for small scale off-grid solid oxide fuel cell applications. *Fuel Process. Technol.* 197, 106215.
- Wieczorek, N., Kucuker, M.A., Kuchta, K., 2014. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two-stage combined process. *Appl. Energy* 132, 108–117.
- Xia, A., Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Song, W., Zhou, J., Cen, K., 2014a. Enhancement of energy production efficiency from mixed biomass of *Chlorella pyrenoidosa* and cassava starch through combined hydrogen fermentation and methanogenesis. *Appl. Energy* 120, 23–30.

- Xia, A., Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Song, W., Zhou, J., Cen, K., 2014b. Effects of changes in microbial community on the fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from *Chlorella pyrenoidosa* biomass in semi-continuous operation. *Energy* 68, 982–988.
- Xia, A., Cheng, J., Song, W., Su, H., Ding, L., Lin, R., Lu, H., Liu, J., Zhou, J., Cen, K., 2015a. Fermentative hydrogen production using algal biomass as feedstock. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 51, 209–230.
- Xia, A., Herrmann, C., Murphy, J.D., 2015b. How do we optimize third-generation algal biofuels? *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 9, 358–367.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X., 2011. Thermo-alkaline pretreatment of lipid-extracted microalgal biomass residues enhances hydrogen production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 454–460.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X., 2010. Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 9618–9623.
- Yap, B.H.J., Crawford, S.A., Dagastine, R.R., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2016. Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1671–1680.
- Yen, H.W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134.
- Yun, Y.M., Jung, K.W., Kim, D.H., Oh, Y.K., Shin, H.S., 2012. Microalgal biomass as a feedstock for bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15533–15539.
- Zabed, H.M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Zhang, Y., Qi, X., 2020. Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 117, 109503.
- Zahan, Z., Othman, M.Z., Muster, T.H., 2018. Anaerobic digestion/co-digestion kinetic potentials of different agro-industrial wastes: A comparative batch study for C/N optimisation. *Waste Manag.* 71, 663–674.
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl. Energy* 92, 733–738.
- Zamorano-López, N., Borrás, L., Seco, A., Aguado, D., 2020. Unveiling microbial structures during raw microalgae digestion and co-digestion with primary sludge to produce biogas using semi-continuous AnMBR systems. *Sci. Total Environ.* 699, 134365.
- Zhang, J., Bao, J., 2018. Lignocellulose Pretreatment Using Acid as Catalyst, in: *Handbook of Biorefinery Research and Technology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–14.
- Zhang, Q., Tang, L., Zhang, J., Mao, Z., Jiang, L., 2011. Optimization of thermal-dilute sulfuric acid pretreatment for enhancement of methane production from cassava residues. *Bioresour. Technol.* 102, 3958–3965.
- Zhang, Y., Caldwell, G.S., Sallis, P.J., 2019. Semi-continuous anaerobic co-digestion of marine microalgae with potato processing waste for methane production. *J. Environ. Chem. Eng.* 7,

102917.

- Zhao, Y., Sun, F., Yu, J., Cai, Y., Luo, X., Cui, Z., Hu, Y., Wang, X., 2018. Co-digestion of oat straw and cow manure during anaerobic digestion: Stimulative and inhibitory effects on fermentation. *Bioresour. Technol.* 269, 143–152.
- Zhong, W., Chi, L., Luo, Y., Zhang, Zhongzhi, Zhang, Zhenjia, Wu, W.M., 2013. Enhanced methane production from Taihu Lake blue algae by anaerobic co-digestion with corn straw in continuous feed digesters. *Bioresour. Technol.* 134, 264–270.
- Zhou, J., Yang, J., Yu, Q., Yong, X., Xie, X., Zhang, L., Wei, P., Jia, H., 2017. Different organic loading rates on the biogas production during the anaerobic digestion of rice straw: A pilot study. *Bioresour. Technol.* 244, 865–871.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.